



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Faculdade de Engenharia

Allan dos Santos Argolo

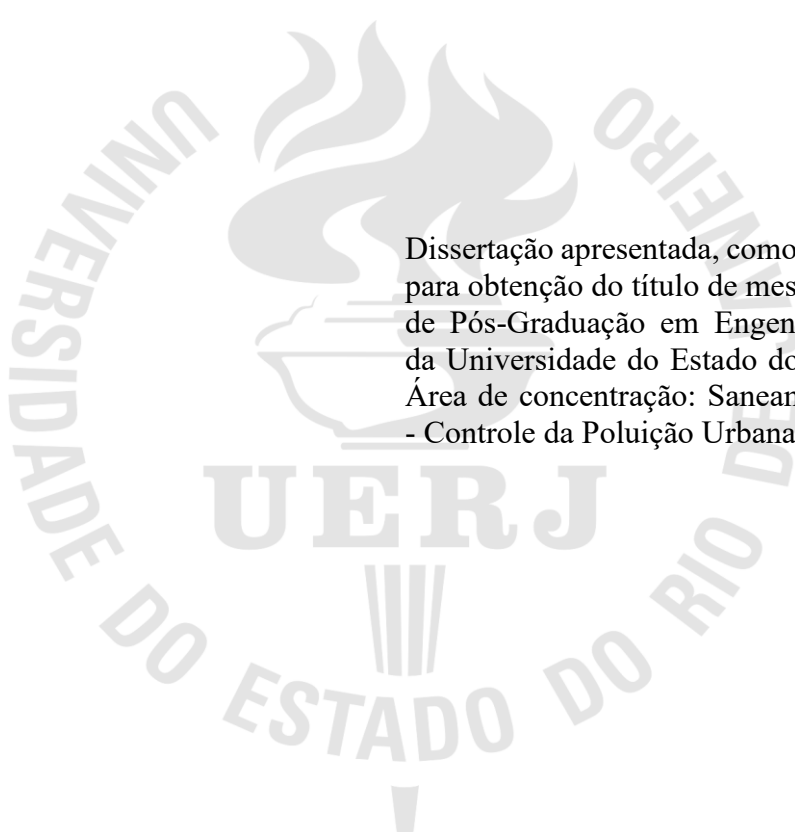
**Influência da matéria orgânica e da interação de estrogênios na
quantificação de atividade estrogênica e sua interferência em matrizes
ambientais**

Rio de Janeiro

2022

Allan dos Santos Argolo

Influência da matéria orgânica e da interação de estrogênios na quantificação de atividade estrogênica e sua interferência em matrizes ambientais



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Saneamento Ambiental - Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Orientadora: Prof.^a Dra. Daniele Maia Bila

Rio de Janeiro

2022

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

A693 Argolo, Allan dos Santos.
Influência da matéria orgânica e da interação de estrogênios na
quantificação de atividade estrogênica e sua interferência em matrizes
ambientais / Allan dos Santos Argolo. – 2022.
127f.

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

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

CDU 62:502.3

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

Data

Allan dos Santos Argolo

Influência da matéria orgânica e da interação de estrogênios na quantificação de atividade estrogênica e sua interferência em matrizes ambientais

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Saneamento Ambiental - Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2022.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a. Daniele Maia Bila, D. SC. (Orientadora)

Faculdade de Engenharia – UERJ

Prof. Dr.^a. Renata de Oliveira Pereira

Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFJF

Prof. Dr.^a. Milena Guedes Maniero Ferreira

Pontifícia Universidade Católica de Campinas – PUC-Campinas

Prof. Dr. André Luís de Sá Salomão

Faculdade de Engenharia – UERJ

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Aos que se foram, aos que estão e aos que virão.

AG/RADECIMENTOS

À Deus, pela criação, vida, potencialidades e por seu infinito amor. À espiritualidade amiga, pela proteção, amparo e obstinação.

Aos meus pais Ubirajara e Celiana, pelo amor, pela paciência, pela dedicação, pelo apoio e incentivo incondicionais.

À minha irmã Karenn e ao meu amigo-irmão Marcionilo, pelo companheirismo atemporal que ignora as distâncias.

À professora Daniele Bila, pela orientação de quase 8 anos, pelos ensinamentos, pela confiança e pelo exemplo como formadora de “gente”.

Aos professores Renata de Oliveira Pereira, Milena Guedes Maniero Ferreira e André Luís de Sá Salomão por aceitarem fazer parte da banca.

À amiga Giselle Gomes, pelas conversas pessoais e acadêmicas, pela parceria de longa data e auxílio com o ensaio YES.

Aos técnicos Sidnei e Daniela, pela amizade e auxílio com as análises de substâncias húmicas e carbono orgânico total.

Às amigas Stella e Karina, pelo carinho e pela amizade pura e sincera.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia Sanitária (LES), em especial às divas Camilla, Fabiana, Layla, Louise, Tainá, Thaynara (em ordem alfabética, que fique claro) e novamente Giselle, Sidnei e Stella, pela amizade, pelas discussões sempre relevantes, academicamente ou não, e pelos momentos e compartilhamentos de dilemas e alegrias.

Aos companheiros de diretoria da Associação Esperantista do Rio de Janeiro e da Organização da Juventude Esperantista Brasileira, e de organização da Confraternização de Mocidades Espíritas do Estado do Rio de Janeiro, pela compreensão e apoio.

À Companhia Estadual de Águas e Esgotos do Rio de Janeiro – CEDAE, pela disponibilização de amostras de afluente e efluente de ETE.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação até hoje, meu muito obrigado.

Portanto, não vos inquieteis com o amanhã, pois o amanhã se inquietará consigo mesmo!

Basta a cada dia o seu mal.

Matheus 6:34

RESUMO

ARGOLO, Allan dos Santos. *Influência da matéria orgânica e da interação de estrogênios na quantificação de atividade estrogênica e sua interferência em matrizes ambientais*. 2022. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A presença de desreguladores endócrinos estrogênicos em matrizes ambientais aquosas tem sido motivo de preocupação nas últimas décadas e bioensaios são recomendados como ferramentas para o seu monitoramento. Contudo, a ocorrência de misturas de diferentes substâncias, suas propriedades físico-químicas e as características da matriz ambiental podem influenciar na resposta do bioensaio. Este estudo objetivou avaliar essa influência na resposta do ensaio de ativação transcricional de receptor de estrogênio *Yeast Estrogen Screen* (YES). Uma análise de misturas binárias de 17β -estradiol (E2), 17α -etinilestradiol (EE2), estrona (E1) e estriol (E3) foi realizada com o desenho de proporção fixa parcial, cujo resultado foi ajustado ao modelo de adição de concentração e estendidos aos modelos de sinergismo/antagonismo e desvios dependente do nível e da proporção da dose. Misturas de E2 e ácido húmico (HA) foram avaliadas pela abordagem de Schild para investigar a interação de estrogênios com a matéria orgânica dissolvida (MOD). Amostras ambientais de lixiviado de aterro sanitário e afluente e efluente de estação de tratamento de esgoto (ETE) foram avaliadas com o ensaio YES para atividade (anti)estrogênica nas fases dissolvida e particulada e os resultados foram estatisticamente confrontados com os parâmetros físico-químicos das amostras com análise de componentes principais (ACP). Desvios de sinergismo foram obtidos para todas as misturas sintéticas de estrogênios, exceto EE2+E1, e principalmente nas menores concentrações do ensaio. Apesar da (não-)interação no meio, o sinergismo *in vitro* pode ser recorrente em resultados de equivalente estradiol (Eq-E2) de amostras concentradas. As concentrações-teste de HA reduziram expressivamente a resposta do E2 no ensaio, mesmo em baixos níveis, o que foi associado à redução da biodisponibilidade de estrogênios no ensaio *in vitro*. Amostras de lixiviado tiveram Eq-E2 total na faixa de 1282–2591 ng L⁻¹, enquanto afluente e efluente de ETE estiveram nas faixas de 12,1–41,4 e <LD–2,3 ng L⁻¹, sendo a redução média de atividade estrogênica igual a 92%. A contribuição da fase particulada para o Eq-E2 total foi de 23% a 100% entre as matrizes, apesar de a citotoxicidade ter sido recorrente nos extratos de sólidos suspensos > 0,7 µm. A atividade antiestrogênica também foi observada nas fases dissolvida e particulada e pode também ter mascarado o potencial estrogênico das amostras. A ACP não elucidou correlações positivas para sustentar um padrão de distribuição multifase dos compostos estrogênicos e supõe-se que parâmetros físico-químicos não sejam preditivos para isso. Contudo, as características dos sólidos e da matéria orgânica subsidiaram a interpretação dos resultados e estudos mais robustos podem ser empregados. Conclui-se que o ensaio *in vitro* YES está sujeito a fatores intrínsecos à amostra que podem influenciar no potencial estrogênico obtido a partir do ensaio. Portanto, recomenda-se que a interpretação dos resultados seja realizada em conjunto com parâmetros físico-químicos de caracterização de matéria orgânica, citotoxicidade e atividade antiestrogênica.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos. Sinergismo. Antagonismo. Matéria orgânica dissolvida. *Yeast Estrogen Screen*.

ABSTRACT

ARGOLO, Allan dos Santos. *Influence of organic matter and interactions between estrogens on the estrogenic activity quantification and their interference in environmental matrices*. 2022. 127 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

The presence of estrogenic endocrine disruptors in aquatic environmental matrices has been a concern during the last decades and bioassays are recommended tools for their monitoring. However, the occurrence of mixture of different substances, their physical-chemical properties and the environmental matrix characteristics may influence the resultant response. This study aimed to assess this influence on the estrogen receptor transcriptional activation assay Yeast estrogen Screen (YES). A binary mixture analysis of 17β -estradiol (E2), 17α -ethinylestradiol (EE2), estrone (E1) and estriol (E3) was performed with partial fixed-ratio design, whose results were adjusted to a concentration addition model and further extended to synergism/antagonism, dose level and dose ratio dependent deviation models. Mixtures of E2 and humic acid (HA) were evaluated through the Schild approach in order to investigate the interactions of estrogens and dissolved organic matter (DOM). Environmental samples from municipal landfill leachate and wastewater treatment plant (WWTP) influent and effluent were screened with the YES assay for (anti)estrogenic activity at both dissolved and particulate phases and results were statistically confronted with physical-chemical parameters of samples through principal component analysis (PCA). Synergism deviations were obtained for all estrogen mixtures, except from EE2+E1, mainly at the lowest test concentrations. Despite (non)interaction at the environment, *in vitro* synergism may be recurrent in estradiol-equivalent (E2-Eq) results of enriched samples. The HA test concentrations deeply reduced the E2 response in the assay, even at low levels. Humic substances may not only reduce the estrogen bioavailability, but also interfere within the assay mechanism through enzymatic inhibition thus masking the sample estrogenic potential. Landfill leachate had total E2-Eq in the range 1282–2591 ng L⁻¹, while WWTP influent and effluent were in the range 12,1–41,4 e <DL–2,3 ng L⁻¹ and the average estrogenicity reduction was 92 %. The contribution of particulate phase to total E2-Eq were 33% to 100% between matrices, though cytotoxicity recurrently occurred in extracts from suspended solids > 0,7 μ m. Antiestrogenic activity was also observed in dissolved and particulate phases and might also have masked the estrogenic potential of samples. The PCD did not resulted in positive correlations that supported a multiphase distribution pattern of estrogenic compounds and it is supposed that physical-chemical parameters are not predictive for that. Nevertheless, the solids and organic matter characteristics supported the data interpretation and more robust studies may be performed towards it. In conclusion, the *in vitro* YES assay is subjected to factors intrinsic to the environmental sample that can influence on the estrogenic potential obtained by the assay. Therefore, the interpretation of results is recommended to be performed together with organic matter characterization parameters, cytotoxicity and antiestrogenic activity.

Keywords: Endocrine disruptors. Synergism. Antagonism. Dissolved organic matter. Yeast estrogen Screen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema simplificado do mecanismo de ação de hormônios e desreguladores endócrinos.....	21
Figura 2: Fórmula estrutural do ciclo-pentano-peridrofenantreno (a), do 17 β -estradiol (b), da estrona (c) e do 17 α -etinilestradiol (d).	22
Figura 3: Representação do modelo de ligação agonista (Estradiol) e antagonista (Raloxifeno) do receptor de estrogênio.....	23
Figura 4: Esquema do sistema de expressão de atividade estrogênica pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante (ensaio YES).....	34
Figura 5: Exemplo de estrutura química do ácido húmico.....	37
Figura 6: Representação esquemática de uma isobolograma.....	40
Figura 7: Relações dose-resposta de misturas binárias de substâncias simples em representação tridimensional e linhas de contorno características (isobologramas).....	41
Figura 8: Fluxograma de blocos conceituais representando a metodologia geral do estudo. ..	42
Figura 9: Procedimento para atingir a concentração adequada de células de levedura.....	44
Figura 10: Exemplo de arranjo usual de amostras na placa de 96 poços para o ensaio YES...	46
Figura 11: Exemplo de arranjo na placa de 96 poços para a avaliação de misturas com o ensaio YES.....	51
Figura 12 – Esquema da placa de diluição para preparo do ensaio YES com misturas aquosas de 17 β - estradiol e ácido húmico.....	57
Figura 13 – Foto dos extratos das amostras sintéticas submetidas a extração em fase sólida para avaliação da influência de matéria orgânica dissolvida no ensaio YES.....	60
Figura 14 – Esquema de coleta das frações das amostras sintéticas submetidas a extração em fase sólida para análise com o ensaio YES.....	61
Figura 15 – Vista aérea da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Alegria e detalhe dos locais de coleta de amostras.....	62
Figura 16 – Fluxograma detalhado do protocolo de preparo de amostras para avaliação de atividade estrogênica e antiestrogênica das fases dissolvida e particulada de amostras ambientais.....	66
Figura 17 –Curvas dose-resposta dos estrogênios 17 β -estradiol (E2), estrona (E1), estriol (E3) e 17 α -etinilestradiol (EE2).	69

Figura 18 – Dados experimentais e superfícies de respostas em absorvância corrigida dos modelos de adição de concentração (CA) e de sinergismo dependente do nível da dose (DL) para a mistura E2+EE2 avaliada com o ensaio YES.....	70
Figura 19 – Isobogramas de absorvância corrigida dos modelos mais significativos da análise de misturas binárias de estrogênios avaliadas com o ensaio YES.....	72
Figura 20 – Pré-investigação da resposta das concentrações de solução de ácido húmico (HA) de 3 – 144 mg _c L ⁻¹ em valores absorvância.....	77
Figura 21 – Resultados da análise de misturas de 17β-estradiol (E2) e ácido húmico (HA) avaliadas com o ensaio YES aplicando o método de Schild modificado.....	78
Figura 22 – Curvas dose-resposta das duplicatas 1 e 2 das soluções de 17β-estradiol (E2) e ácido húmico (HA) e mistura submetidas a extração em fase sólida e avaliadas com o ensaio YES.	80
Figura 23 – Curvas dose-resposta do extrato, percolado e <i>cleanup</i> de amostra sintética com 17β-estradiol (E2) e ácido húmico (HA) avaliados com o ensaio YES.....	81
Figura 24 – Detalhamento da distribuição dos sólidos suspensos totais (SST) nas amostras ambientais avaliadas.....	84
Figura 25 – Percentual de carbono orgânico particulado nos sólidos suspensos nas amostras ambientais avaliadas.....	85
Figura 26 – Valores de constituintes orgânicos agregados das amostras ambientais avaliadas.	85
Figura 27 – Foto da placa de ensaio da amostra B2 indicando diluições com citotoxicidade.	87
Figura 28 – Exemplos de curva dose-resposta padrão do controle positivo 17β-estradiol diluído em (a) etanol e (b) água ultrapura obtidas no ensaio YES.	88
Figura 29 – Resultados de atividade estrogênica total em equivalente estradiol (ng L ⁻¹) para alíquotas da amostra de lixiviado bruto de aterro sanitário de RSU. Barras de erro indicam desvio padrão (n = 2).....	89
Figura 30 – Distribuição percentual entre as fases dissolvida e particulada de atividade estrogênica total para alíquotas da amostra de lixiviado bruto de aterro sanitário de RSU.	90
Figura 31 – Resultados de atividade estrogênica total em equivalente estradiol (ng L ⁻¹) para amostras de afluente e efluente de ETE.....	91
Figura 32 – Distribuição percentual entre as fases dissolvida e particulada de atividade estrogênica total para amostras de afluente e efluente de ETE.	93
Figura 33 – Curva dose-resposta do extrato dos sólidos suspensos maiores que 0,7 μm da amostra BC para avaliação da atividade antiestrogênica.....	95

Figura 34 – Análise de Componentes Principais aplicada para resultados das amostras de lixiviado, afluente e efluente de ETE.	97
Figura 35 – Análise de Componentes Principais aplicada para resultados das amostras de afluente e efluente de ETE.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos orgânicos avaliados quanto à atividade estrogênica e antiestrogênica via atividade transcricional do receptor de estrogênio em leveduras.	24
Tabela 2 – Propriedades físico-químicas de algumas substâncias estrogênicas.	28
Tabela 3 – Ocorrência de compostos estrogênicos em águas bruta e tratadas de sistemas de abastecimento no Brasil.	29
Tabela 4 – Ocorrência de compostos estrogênicos em esgotos bruto e tratado no Brasil.	31
Tabela 5 – Ocorrência de compostos estrogênicos em lixiviados bruto e tratado de aterro sanitário de resíduo sólido urbano no Brasil.	32
Tabela 6 – Concentração da solução estoque e faixa de concentração das curvas individuais dos compostos estrogênicos avaliados.	49
Tabela 7 – Arranjo experimental de proporção fixa parcial aplicado para a análise de misturas binárias de substâncias estrogênicas.	50
Tabela 8 – Interpretação dos parâmetros <i>a</i> e <i>b</i> adicionais à função do modelo de referência de adição de concentração (CA), que definem a função de desvio.	53
Tabela 9 – Concentração das soluções de ácido húmico utilizadas para o ensaio de misturas com a curva de 17 β -estradiol de 21,28 a 2724 ng L ⁻¹	56
Tabela 10 – Soluções sintéticas submetidas a extração em fase sólida para avaliação da influência de matéria orgânica dissolvida no ensaio YES.	59
Tabela 11 – Identificação e descrição de amostras ambientais avaliadas com o ensaio YES para quantificação de atividade estrogênica total e avaliação qualitativa de atividade antiestrogênica.	63
Tabela 12 – Metodologia dos parâmetros físico-químicos avaliados na caracterização das amostras ambientais.	64
Tabela 13 – Parâmetros da curvas dose-resposta obtidas para os compostos estrogênicos utilizados nas misturas binárias.	70
Tabela 14 – Síntese da análise de misturas binárias de estrogênios com o ensaio in vitro YES. Valores em negrito representam o modelo mais significativo para a mistura.	71
Tabela 15 – Caracterização físico-química das amostras ambientais de lixiviado bruto de aterro sanitário de RSU, afluente e efluente de ETE.	83
Tabela 16 – Síntese da avaliação da atividade antiestrogênica para as frações das amostras de afluente e efluente de ETE realizada com o ensaio YES.	95

Tabela 17 – Matriz de coeficientes de correlação Pearson (ρ) obtidos a partir dos resultados das amostras de lixiviado, afluyente e efluente de ETE.	98
Tabela 18 – Autovalores da matriz de correlação da ACP para resultados das amostras de lixiviado, afluyente e efluente de ETE.	98
Tabela 19 – Matriz de coeficientes de correlação Pearson (ρ) obtidos a partir dos resultados das amostras de afluyente e efluente de ETE.....	100
Tabela 20 – Autovalores da matriz de correlação da ACP para resultados das amostras de afluyente e efluente de ETE.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ACP	Análise de componentes principais
CA	Adição de concentração
CE50	Concentração de efeito mediano
COD	Carbono orgânico dissolvido
COP	Carbono orgânico particulado
COT	Carbono orgânico total
CPR	chlorophenol red
CPRG	chlorophenol red- β -D-galactopyranoside
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DE	Desreguladores endócrinos
DL	Desvio dependente do nível da dose
DQO	Demanda química de oxigênio
DR	Desvio dependente da proporção da dose
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
E3	Estriol
EE2	17 α -etinilestradiol
EFS	Extração em fase sólida
Eq-E2	Equivalente 17 β -estradiol
ERE	Elemento de resposta estrogênica
ETE	Estação de tratamento de esgoto
FD	Fator de diluição
FT	Força tóxica
HA	Ácido húmico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
LD	Limite de detecção
MOD	Matéria orgânica dissolvida
MON	Matéria orgânica natural
MP	Material particulado

PR	Potência relativa
REh	Receptor de estrogênio humano
RSU	Resíduo sólido urbano
S/A	Sinergismo/antagonismo
SHA	Substâncias húmicas aquáticas
SS	Soma residual dos quadrados
SST	Sólidos suspensos totais
SUVA	<i>Specific ultraviolet absorbance</i>
UNT	Unidade nefelométrica de turbidez
UT	Unidade tóxica
YES	<i>Yeast estrogen screen</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1. OBJETIVOS	19
1.1 Objetivo Geral	19
1.2 Objetivos Específicos	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Desreguladores endócrinos.....	20
2.1.1 Definições e classificações.....	20
2.1.2 Mecanismos de ação dos DE.....	21
2.1.3 Atividade estrogênica e antiestrogênica	22
2.1.4 Propriedades físico-químicas dos DE estrogênicos.....	27
2.1.5 Ocorrência de DE estrogênicos em matrizes ambientais aquosas.....	28
2.2 Avaliação da atividade estrogênica em matrizes ambientais	32
2.2.1 Bioensaios de atividade estrogênica.....	32
2.2.2 O ensaio <i>Yeast Estrogen Screen</i> (YES).....	33
2.3 Interações entre DE estrogênicos e matéria orgânica dissolvida (MOD)	35
2.3.1 Matéria orgânica dissolvida em matrizes ambientais.....	35
2.3.2 Mecanismos de interação com estrogênios	36
2.4 Análise de misturas de substâncias	38
3. METODOLOGIA	42
3.1 Ensaio Yeast Estrogen Screen	43
3.1.1 Reagentes e preparo de soluções	43
3.1.2 Cultivo da levedura, pré-inóculo e inóculo	43
3.1.3 Preparo do meio de análise.....	44
3.1.4 Procedimentos do ensaio YES	45
3.1.5 Processamento de dados e análise dos resultados	46
3.2 Etapa 1: Ensaios com substâncias simples	49
3.2.1 Análise de misturas binárias de estrogênios.....	49
3.2.1.1 <i>Preparo de soluções e arranjo experimental</i>	49
3.2.1.2 <i>Processamento de dados e análise dos resultados</i>	51
3.2.2 Avaliação da influência da matéria orgânica dissolvida	54
3.2.2.1 <i>Preparo de soluções</i>	54

3.2.2.2	<i>Análise de soluções aquosas</i>	55
3.2.2.3	<i>Análise de extratos de soluções</i>	59
3.3	Etapa 2: Ensaio com amostras ambientais	61
3.3.1	Origem, coleta e identificação de amostras ambientais	61
3.3.2	Caracterização físico-química de amostras ambientais	64
3.3.3	Preparo de amostras ambientais para o ensaio YES	65
3.3.4	Atividade estrogênica e antiestrogênica de amostras ambientais	67
3.3.5	Análise estatística global dos resultados	68
4.	RESULTADOS	69
4.1	Etapa 1: Ensaio com substâncias simples	69
4.1.1	Análise de misturas binárias de estrogênios	69
4.1.2	Avaliação da influência da matéria orgânica dissolvida	77
4.2	Etapa 2: Ensaio com amostras ambientais	82
4.2.1	Caracterização físico-química de amostras ambientais	82
4.2.2	Inibição do crescimento da levedura no ensaio YES	87
4.2.3	Atividade estrogênica de amostras ambientais	88
4.2.3.1	<i>Lixiviado de aterro sanitário de RSU</i>	88
4.2.3.2	<i>Afluente e Efluente de ETE</i>	91
4.2.4	Atividade antiestrogênica de amostras ambientais	94
4.2.5	Análise de Componentes Principais	97
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
	REFERÊNCIAS	104
	APÊNDICE 1 – Superfícies e dados experimentais dos modelos mais significativos obtidos para as misturas de estrogênios	116
	APÊNDICE 2 – Síntese dos resultados de atividade estrogênica e antiestrogênica obtidos com o ensaio YES para amostras ambientais	117
	APÊNDICE 3 – Curvas dose-resposta das amostras ambientais avaliadas com o ensaio YES para atividade estrogênica e antiestrogênica	118
	ANEXO 1 – Preparo de soluções do ensaio YES (Gomes, 2020)	126

INTRODUÇÃO

Desreguladores endócrinos (DE) são micropoluentes encontrados em baixas concentrações no meio ambiente e ainda assim podem causar efeitos adversos ao sistema endócrino de animais e humanos. Dentre os DE, aqueles que atuam na via metabólica de hormônios sexuais têm sido largamente estudados, devido a possíveis consequências na reprodução e desenvolvimento dos seres (MARTYNIUK *et al.*, 2022), destacando-se agonistas e antagonistas do receptor de estrogênio.

A ocorrência de DE em matrizes ambientais têm sido motivo de preocupação nas últimas décadas em nível global, sendo detectados em águas superficiais e subterrâneas, afluentes, efluentes e lodos de estações de tratamento de esgoto (ETE), sedimentos e solos (BARBOSA *et al.*, 2016; DU *et al.*, 2020; LEUSCH *et al.*, 2018; NIE *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2018). Essa constatação demanda o conhecimento dos diversos aspectos dessa problemática, seja no risco ao meio ambiente ou à saúde humana (HO *et al.*, 2022).

Apesar de sua ubiquidade em matrizes ambientais, DE estrogênicos não fazem parte dos programas de monitoramento ambiental usuais. Nesse contexto, ferramentas bioanalíticas são apontadas como promissoras para composição de monitoramentos ambientais e no subsídio a avaliação de risco de substâncias químicas (DINGEMANS *et al.*, 2019; SCHUIJT *et al.*, 2021). Assim, em complemento à quantificação química de compostos estrogênicos em amostras ambientais, uma série de bioensaios *in vitro* foram desenvolvidos, permitindo a avaliação da resposta biológica do receptor de estrogênio humano a uma determinada amostra complexa, incluindo possíveis interações de diferentes poluentes (GÓMEZ *et al.*, 2021; MARTYNIUK *et al.*, 2022).

Contudo, a própria complexidade da matriz e seus efeitos na resposta do bioensaio constituem um desafio. Por exemplo, a coocorrência de diversos DE em uma mesma amostra, em variadas razões e concentrações, sugere a possibilidade da existência de sinergismos ou antagonismos no ensaio, além da aditividade entre as substâncias (SKLEDAR e MAŠIČ, 2020; YU *et al.*, 2019). Nesse sentido, o conhecimento dos efeitos de misturas pode subsidiar estratégias específicas para o uso do bioensaio e estabelecimento de concentrações limite baseadas em efeito (ALTENBURGER *et al.*, 2019; MARTIN *et al.*, 2021).

A ação dos DE, seu comportamento e seu destino no meio também estão diretamente relacionados às suas propriedades físico-químicas. As relativamente altas lipofilicidade e capacidade de sorção indicam afinidade com a matéria orgânica dissolvida e particulada,

sugerindo um inerente mecanismo de fracionamento em matrizes ambientais aquosas (BIRKETT e LESTER, 2003). Portanto, a avaliação multifase das substâncias também deve ser considerada para conhecimento do total potencial das amostras (HUANG *et al.*, 2019a; YARAHMADI *et al.*, 2018).

Ademais, o mecanismo de interação entre DE estrogênios e a matéria orgânica dissolvida (MOD) resulta na formação de complexos que não são reconhecidos pelo receptor de estrogênio, o que pode reduzir a biodisponibilidade do poluente no bioensaio, havendo um efeito de antagonismo aparente ocasionado pela MOD e redução do efeito observado (NEALE *et al.*, 2015; MA e YATES, 2018).

Nesse sentido, destaca-se a importância do conhecimento acerca dos diferentes mecanismos de interação entre os poluentes na matriz e seus possíveis efeitos, seja no meio ambiente ou no bioensaio, com vistas a segura avaliação da atividade estrogênica da amostra e controle de poluição ambiental.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da interação entre estrogênios e matéria orgânica na quantificação de atividade estrogênica e a influência das fases dissolvida e particulada de amostras ambientais pelo ensaio *in vitro* YES.

1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de misturas binárias de substâncias estrogênicas pelo ensaio *in vitro* YES.
- Avaliar a influência de substâncias húmicas na biodisponibilidade de 17 β -estradiol no ensaio *in vitro* YES.
- Investigar a influência da matéria orgânica (dissolvida e particulada) no fracionamento de substâncias estrogênicas com o ensaio *in vitro* YES.
- Avaliar o efeito estrogênico e antiestrogênico das fases dissolvida e particulada das matrizes lixiviado de aterro sanitário de resíduos sólidos urbanos e afluente e efluente de estação de tratamento de esgoto com o ensaio *in vitro* YES.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Desreguladores endócrinos

2.1.1 Definições e classificações

A poluição ambiental têm sido um problema constante devido ao aumento da pressão antrópica sobre o ambiente. O aumento da população atrelado a alta demanda por produtos das mais variadas classes levaram ao aumento da síntese e produção de compostos químicos. Em paralelo, o aprimoramento das técnicas de química analítica permitiu a identificação desses compostos nos variados compartimentos ambientais até mesmo em baixas concentrações, na ordem de μg a ng L^{-1} .

Apesar de sua ubiquidade no meio e possível risco aos ecossistemas, grande parte dessas substâncias ainda não são legisladas, ou seja, não estão incluídas em programas de monitoramento com concentrações limite estabelecidas por legislação, e são referidas pela comunidade científica como contaminantes emergentes (MONTAGNER *et al.*, 2019; STARLING *et al.*, 2019). Não obstante, alguns compostos que suscitam preocupação à saúde humana ou à comunidade científica têm sido adicionados a listas de vigilância da União Europeia para monitoramento de água superficial (COMISSÃO EUROPEIA, 2020) e de água potável (COMISSÃO EUROPEIA, 2022).

Dentro do amplo grupo de contaminantes emergentes, destaca-se a classe dos desreguladores endócrinos (DE), definidos como substâncias exógenas ou misturas que alteram uma ou várias funções do sistema endócrino e têm, conseqüentemente, efeitos adversos sobre a saúde num organismo intacto, sua descendência ou (sub)populações (BERGMAN *et al.*, 2013).

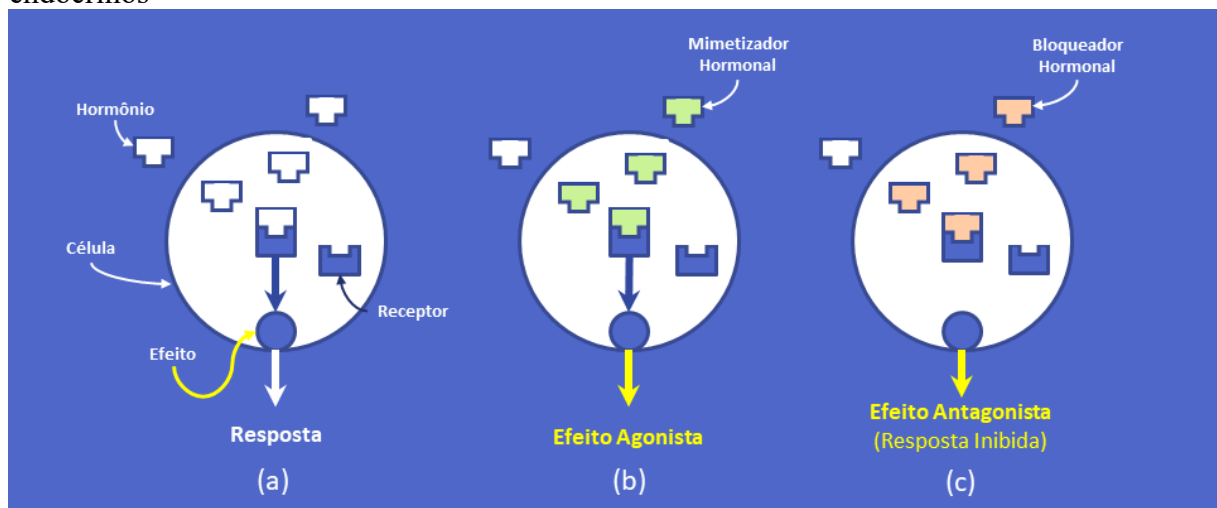
De modo geral, essas substâncias podem ser agrupadas em duas classes: (i) naturais, compreendendo, entre outros, hormônios femininos e fitoestrogênios; e (ii) sintéticas, compreendendo pesticidas e seus subprodutos, dioxinas, policlorados de bifenilas (PCB), alquilfenóis e seus subprodutos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAP), ftalatos, bisfenol-A (BPA), metais pesados e fármacos, como estrogênios sintéticos (BILA E DEZOTTI, 2007; KABIR *et al.*, 2015).

2.1.2 Mecanismos de ação dos DE

O sistema endócrino consiste em uma série de glândulas e tecidos que secretam substâncias químicas que regulam funções básicas dos seres vivos como crescimento, reprodução, manutenção, homeostase e metabolismo. Essas substâncias são os hormônios, cujo mecanismo de ação é a ligação a um receptor específico para equilibrar as funções biológicas dos organismos. Assim, quando um hormônio se liga ao sítio do receptor hormonal (Figura 1.a), produz-se a resposta desejada.

De forma simplificada, a desregulação endócrina ocorre quando uma substância exógena, por afinidade bioquímica, realiza essa ligação em detrimento do hormônio (Figura 1.b e 1.c). O efeito agonista (Figura 1.b) é definido pela ação do DE como mimetizador hormonal, o que produz uma resposta diferente da natural. Por outro lado, no efeito antagonista (Figura 1.c), o DE atua como um bloqueador, inibindo a resposta e a função esperada (BIRKETT e LESTER, 2003).

Figura 1: Esquema simplificado do mecanismo de ação de hormônios e desreguladores endócrinos



(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 da natural; (c) DE se liga ao sítio do receptor bloqueando-o e inibindo qualquer resposta. Fonte: Adaptado de Birket e Lester (2003).

Outros exemplos de desregulação endócrina, além da mimetização e do bloqueio hormonal, são: a estimulação, que causa a amplificação tanto de hormônios naturais quanto exógenos; o *flushing* hormonal, que acelera a eliminação dos hormônios causando sua depleção; e a destruição, que leva a alteração estrutural dos hormônios, impedindo-o de realizar sua função (BIRKETT e LESTER, 2003).

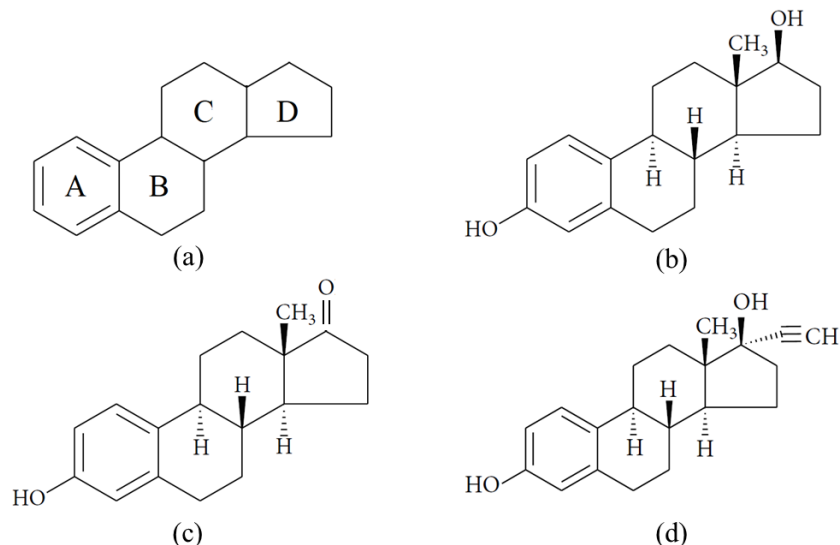
2.1.3 Atividade estrogênica e antiestrogênica

A ação dos desreguladores endócrinos ocorre, em grande parte, através da ligação ao receptor hormonal. Desse modo, as substâncias exógenas com capacidade de produzir um efeito agonista *in vitro* ou *in vivo* análogo ao dos estrogênios naturais, como o 17 β -estradiol, são definidas como substâncias estrogênicas e possuem atividade estrogênica. Já aquelas que antagonizam a resposta de estrogênios naturais são substâncias antiestrogênicas e possuem atividade antiestrogênica.

Os DE estrogênicos podem ser classificados como: (i) estrogênios naturais, compreendendo os hormônios estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3), além dos fitoestrogênios; ou (ii) xenoestrogênios, compreendendo os fármacos dietilestilbestrol (DES) e o 17 α -etinilestradiol (EE2), e outros produtos químicos como plastificantes, produtos de degradação de surfactantes não-iônicos (compostos alquilfenólicos), ftalatos, certos pesticidas, entre outros (BECK *et al.*, 2006).

Hormônios esteroides naturais são biosintetizados a partir do colesterol por um processo conhecido como esteroidogênese, possuindo uma estrutura química básica de 17 átomos de carbono dispostos em quatro anéis (A, B, C, D) ligados entre si, que formam a estrutura lipídica conhecida como ciclo-pentano-peridrofenantreno (Figura 2.a). Os diferentes esteroides são configurados a partir de adições na estrutura básica, podendo conter grupamentos metila, carbonila e hidroxilas (Figura 2.b, 2.c e 2.d).

Figura 2: Fórmula estrutural do ciclo-pentano-peridrofenantreno (a), do 17 β -estradiol (b), da estrona (c) e do 17 α -etinilestradiol (d).

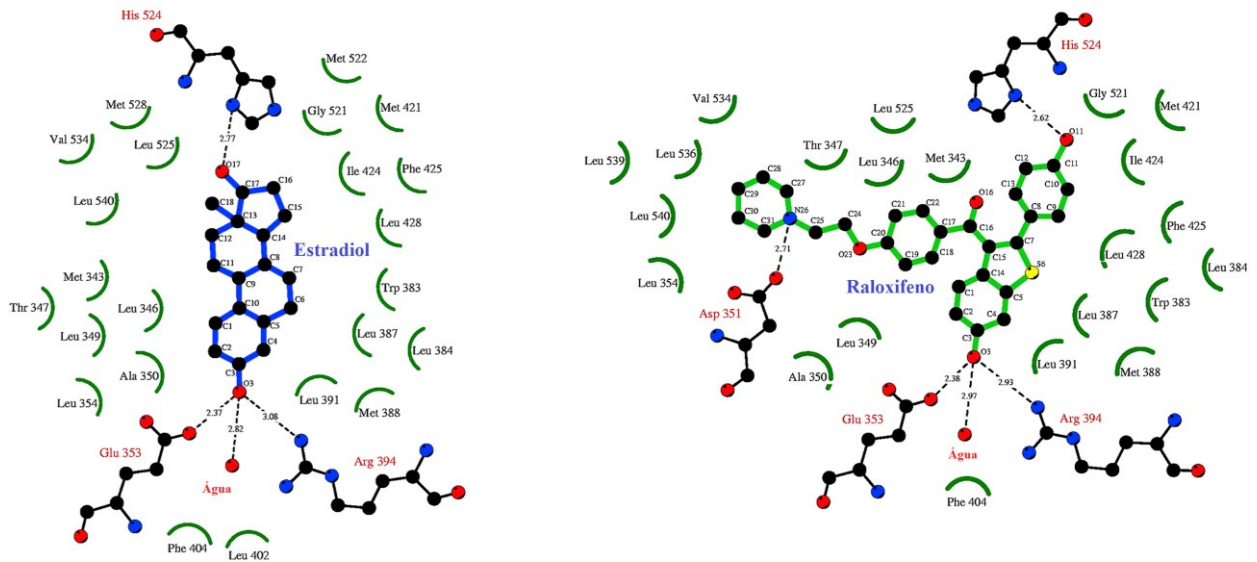


A afinidade química para a ligação ao receptor de estrogênio decorre essencialmente do anel fenólico (A), que nos estrogênios possui o grupamento hidroxila no carbono C3 (BIRKETT e LESTER, 2003). Outrossim, estudos apontam que a orientação do anel (D) também influencia na atividade biológica (DAUX *et al.*, 1984 *apud* BIRKETT e LESTER, 2003), o que leva a crer que a configuração geral da molécula de um DE é fundamental para a sua capacidade de produzir uma resposta hormonal.

No caso do 17β -estradiol, a ligação com o receptor de estrogênio humano se dá pela formação de ligações de hidrogênio entre a molécula e a região do domínio C-terminal do receptor (*ligand-binding domain*, LBD), como ilustrado na Figura 3. O grupamento hidroxila do carbono C3 se liga aos aminoácidos Glu353 e Arg394 da região LBD, ao passo que a hidroxila do anel D se liga ao aminoácido His254 (GAO *et al.*, 2012; ITZEL *et al.*, 2019).

Semelhantemente, o antagonista Raloxifeno se liga aos mesmos aminoácidos e, adicionalmente, liga-se ao aminoácido Asp 351, prevenindo o “fechamento” do receptor e bloqueando a resposta (ITZEL *et al.*, 2019).

Figura 3: Representação do modelo de ligação agonista (Estradiol) e antagonista (Raloxifeno) do receptor de estrogênio.



Moléculas de Estradiol (agonista) e Raloxifeno (antagonista) ligam-se aos aminoácidos da região do domínio C-terminal (LBD) do receptor de estrogênio por ligações de hidrogênio (linhas tracejadas). Fonte: Brzozowski *et al.* (1997).

A atividade estrogênica é facultada a substâncias que guardam semelhanças morfológicas com o estrogênio natural, elucidando respostas com maior ou menor intensidade a depender do nível dessa semelhança, o que de toda forma está relacionada à afinidade bioquímica com o receptor de estrogênio.

Assim, os agonistas podem ser: (i) plenos, com alta eficiência produzindo a resposta completa enquanto ocupam uma proporção relativamente pequena de receptores; (ii) parciais, com menor eficiência produzindo uma resposta inferior à máxima, independentemente da concentração e da quantidade de receptores, ou (iii) inversos, que produzem resposta inversa ainda que se ligando ao receptor como um agonista (KATZUNG *et al.*, 2014)

Com relação às substâncias que produzem efeito antagonista ou antiestrogênico, isto é, são capazes de reduzir o efeito agonista, podem ser divididos em (i) competitivas, que se ligam ao receptor como um agonista, bloqueando-o e (ii) não competitivas, que se ligam a uma região do receptor não relacionada ao modelo agonista e impedem a ativação do mesmo por outra substância (KATZUNG *et al.*, 2014).

A Tabela 1 apresenta a avaliação de alguns compostos orgânicos quanto à atividade estrogênica e antiestrogênica via atividade transcricional do receptor de estrogênio em leveduras. Salienta-se que o potencial (anti)estrogênico dos compostos pode variar de acordo com o bioensaio empregado.

Tabela 1 – Compostos orgânicos avaliados quanto à atividade estrogênica e antiestrogênica via atividade transcricional do receptor de estrogênio em leveduras.

Compostos de ocorrência natural			
Composto	Classe	E	A
Apigenina	Flavonoides	+	–
Daidzein		+	–
Flavona		–	+
Genisteína		+	–
Kaempferol		+	–
4-Androstene-3,17-diona		Hormônios	–
6 α -Metil-17 α -hidroxi-progesterona	–		+
Corticosterona	–		+
Di-hidrotestosterona	+		–
Estradiol	+		–
Estradiol-3-benzoato	+		–
Estrona	+		–
Progesterona	–		+
Testosterona	+		+

Continua

Continuação

Tabela 1 – Compostos orgânicos avaliados quanto à atividade estrogênica e antiestrogênica via atividade transcricional do receptor de estrogênio em leveduras.

Composto	Classe	E	A
Ácido deoxicólico	Outros	–	–
Coumestrol		+	–
Resveratrol		–	–
Compostos sintéticos			
Composto	Classe	E	A
1 α , 25-Di-hidroxitamina D3 (Calcitriol)	Fármacos	–	+
Bicalutamide		–	+
Cetoconazol		–	–
Acetato de ciproterona		–	+
Citrato de clomifeno		+	+
Dexametasona		–	–
Dietilestilbestrol		+	–
Dietilestilbestrol-dipropionato		+	–
Espironolactona		–	–
Etinilestradiol		+	–
Finasterida		–	–
Fluoximesterona		–	–
Hidroxitamoxifeno		+	–
ICI 182,780		+	–
Metiltestosterona		+	+
Metiltrienolona (R1881)		+	–
Mifepristone		–	–
Nilutamida		–	–
Tamoxifeno		*	+
Trembolona		+	–
Vitamina D3 (Colecalciferol)		–	+
4,4'-(1,3-Fenileno-diisopropilideno) bisfenol	Fenólicos	+	*
4,4'-bifenol		+	–
4,4'-ciclo-hexilideno-bisfenol		+	*

Continua

Continuação

Tabela 1 – Compostos orgânicos avaliados quanto à atividade estrogênica e antiestrogênica via atividade transcricional do receptor de estrogênio em leveduras.

Composto	Classe	E	A
4,4'-Di-hidroxidifenil-metano	Fenólicos	+	*
Bisfenol S		–	+
4-n-octilfenol		–	+
4-t-Butilpirocatecol		+	+
4-tert-octilfenol		+	*
Bisfenol A		+	-
Bisfenol A-dimetacrilato		+	-
Benzilbutilftalato	Ftalatos	+	–
Bis(2-etilhexil) ftalato (DEHP)		–	–
Dibutilftalato		+	–
Diisononil ftalato (DINP)		–	–
Di-n-propilftalato		+	
Ftalato de di-n-amilftalatodipentilo		–	+
4,4'-DDD (diclorodifenil-dicloroetano)	Pesticidas	–	–
Atrazina		–	–
Clordecona (kepone)		*	–
Diidroximetoxicloro (HPTE)		+	–
Fenarimol		+	–
Linuron		–	–
Methoxiclor		+	–
o, p'-DDT (1,1,1-tricloro-2- (2-clorofenil) -2- (4-clorofenil) etano)		+	–
p, p'-DDE (1,1' - (2,2-dicloroetano-1,1-diil) bis (4-clorobenzeno))		–	–
Procloraz		–	+
Procymidon		–	–
Vinclozolina		–	–

Continua

Continuação

Tabela 1 – Compostos orgânicos avaliados quanto à atividade estrogênica e antiestrogênica via atividade transcricional do receptor de estrogênio em leveduras.

Composto	Classe	E	A
2,4-Di-hidroxibenzo-fenona	Outros	+	*
2-Etil-hexil-p-hidroxibenzoato		+	*
Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético		–	+
Benzofenona		+	+
Cicloheximida		–	+

(E): atividade estrogênica; (A): atividade antiestrogênica; (+) positivo; (–) negativo; (*) avaliação impossibilitada devido a citotoxicidade. Fonte: Adaptado de Kolle *et al.* (2010).

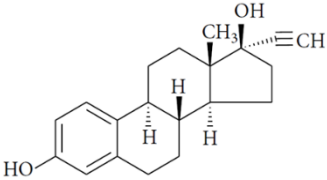
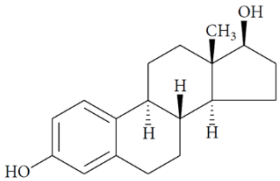
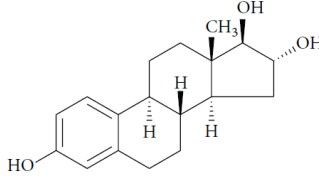
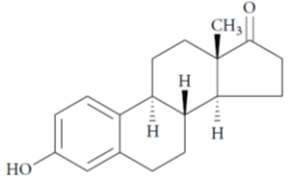
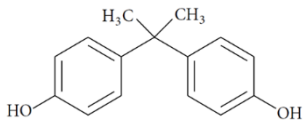
2.1.4 Propriedades físico-químicas dos DE estrogênicos

A ação dos DE, seu comportamento e seu destino no meio estão diretamente ligados as suas propriedades físico-químicas. A maioria das substâncias estrogênicas são compostos hidrofóbicos apolares, com tendência à partição em meio líquido, o que os leva a adsorverem-se a superfícies sólidas ou a biota (BIRKETT e LESTER, 2003).

O grau de hidrofobicidade/lipofilicidade de determinada substância é representado pelo coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), mas também está relacionado à polaridade da substância e aumenta conforme o peso molar da substância. A capacidade de sorção pode ser mensurada pelo coeficiente de partição carbono orgânico-água (K_{oc}), que também aumenta conforme a hidrofobicidade e o $\log K_{ow}$ (MA e YATES, 2018), ainda que a presença de carbono orgânico não seja um pré-requisito para a sorção ao material particulado (LAI *et al.*, 2000).

A partir da Tabela 2, observa-se que compostos estrogênicos usuais têm características lipofílicas, hidrofóbicas e, quando solúveis em água, podem ser transferidos da fase aquosa para a fase sólida por meio de sorção a sólidos suspensos. Assim, é previsível que a sorção ao solo, a sedimento ou a lodo biológico seja um processo significativo (LAI *et al.*, 2000).

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas de algumas substâncias estrogênicas.

Composto	Estrutura química	Massa molar (g mol ⁻¹)	Log K _{ow}	Log K _{oc}	Solubilidade (mg L ⁻¹)
17 α -etinilestradiol (EE2)		296,4	4,15	3,67	4,8
17 β -estradiol (E2)		272,4	3,94	3,52	13,0
Estriol (E3)		288,4	2,81	3,29	13,0
Estrona (E1)		270,4	3,43	3,69	13,0
Bisfenol-A (BPA)		228,0	3,32	2,50	120,0

Fonte: Adaptado de Vega-Morales *et al.* (2013).

2.1.5 Ocorrência de DE estrogênicos em matrizes ambientais aquosas

DE estrogênicos estão presentes nas mais diversas matrizes ambientais, incluindo águas superficiais e subterrâneas, água potável, efluentes, sedimentos, lodos de estação de tratamento de esgoto (ETE) (BARBOSA *et al.*, 2016; LEUSCH *et al.*, 2018; NIE *et al.*, 2015), solos (ZHANG *et al.*, 2018) e até mesmo partículas atmosféricas (SALGUEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2015).

As fontes e rotas de contaminação são conhecidas, a partir de atividades domésticas, industriais e agroindustriais (AQUINO *et al.*, 2013; BARBOSA *et al.*, 2016), aliadas a uma

incompleta degradação ou remoção desses contaminantes pelas estações de tratamento de efluentes (LUO *et al.*, 2014; TANG *et al.*, 2021) ou ainda a completa falta de tratamento e inadequada destinação final de resíduos, uma realidade em países em desenvolvimento.

As Tabelas 3, 4 e 5 apresentam um breve panorama da ocorrência de compostos estrogênicos em matrizes ambientais aquosas no Brasil.

Tabela 3 – Ocorrência de compostos estrogênicos em águas bruta e tratadas de sistemas de abastecimento no Brasil.

Composto	Matriz	Local	Concentração (ng L ⁻¹)	Referência
E1	Água bruta	Sistema Rio das Velhas (MG)	< LD – 36,28	(DIAS, 2014)
		Rios Pirai, Paraíba do Sul e Guandu (RJ)	145,26	(FERNANDES, 2018)
		Brasil	< 0,07 – 279,50	(AQUINO <i>et al.</i> , 2021)
	Água tratada	Sistema Rio das Velhas (MG)	< LD – 70,07	(DIAS, 2014)
		Rios Pirai, Paraíba do Sul e Guandu (RJ)	NQ	(FERNANDES, 2018)
		Brasil	< 0,07 – 94,80	(AQUINO <i>et al.</i> , 2021)
E2	Água bruta	Sistema Rio das Velhas (MG)	< LD – 72,85	(DIAS, 2014)
		Rios Pirai, Paraíba do Sul e Guandu (RJ)	164,5	(FERNANDES, 2018)
		Brasil	< 0,25 – 6806,00	(AQUINO <i>et al.</i> , 2021)
	Água tratada	Sistema Rio das Velhas (MG)	< LD – 42,45	(DIAS, 2014)
		Rios Pirai, Paraíba do Sul e Guandu (RJ)	125,99	(FERNANDES, 2018)
		Brasil	< 0,25 – 43,50	(AQUINO <i>et al.</i> , 2021)
EE2	Água bruta	Sistema Rio das Velhas (MG)	< LD – 45,33	(DIAS, 2014)
		Rios Pirai, Paraíba do Sul e Guandu (RJ)	148,48 – 210,59	(FERNANDES, 2018)
		Brasil	< 0,39 – 4390,00	(AQUINO <i>et al.</i> , 2021)
	Água tratada	Sistema Rio das Velhas (MG)	< LD – 22,52	(DIAS, 2014)
		Rios Pirai, Paraíba do Sul e Guandu (RJ)	221,43	(FERNANDES, 2018)
		Brasil	< 0,39 – 623,00	(AQUINO <i>et al.</i> , 2021)

Continua

Continuação

Tabela 3 – Ocorrência de compostos estrogênicos em águas bruta e tratadas de sistemas de abastecimento no Brasil.

Composto	Matriz	Local	Concentração (ng L⁻¹)	Referência
E3	Água bruta	Sistema Rio das Velhas (MG)	< LD – 67,39	(DIAS, 2014)
		Rios Pirai, Paraíba do Sul e Guandu (RJ)	NQ	(FERNANDES, 2018)
	Água tratada	Sistema Rio das Velhas (MG)	< LD – 59,29	(DIAS, 2014)
		Rios Pirai, Paraíba do Sul e Guandu (RJ)	< LD	(FERNANDES, 2018)
BPA	Água bruta	Sistema Rio das Velhas (MG)	< LD – 308,56	(DIAS, 2014)
		Rios Pirai, Paraíba do Sul e Guandu (RJ)	104,00 – 3443,69	(FERNANDES, 2018)
	Água tratada	Sistema Rio das Velhas (MG)	< LD – 2549,14	(DIAS, 2014)
		Rios Pirai, Paraíba do Sul e Guandu (RJ)	122,28 – 1354,86	(FERNANDES, 2018)
4OP	Água bruta	Sistema Rio das Velhas (MG)	< LD – 50,27	(DIAS, 2014)
		Brasil	< 0,10 – 835,10	(AQUINO <i>et al.</i> , 2021)
	Água tratada	Sistema Rio das Velhas (MG)	< LD – 276,58	(DIAS, 2014)
		Brasil	< 0,20 – 276,60	(AQUINO <i>et al.</i> , 2021)
4NP	Água bruta	Sistema Rio das Velhas (MG)	< LD – 1914,30	(DIAS, 2014)
		Brasil	< 0,10 – 1918,00	(AQUINO <i>et al.</i> , 2021)
	Água tratada	Sistema Rio das Velhas (MG)	< LD – 395,98	(DIAS, 2014)
		Brasil	< 0,10 – 2820,00	(AQUINO <i>et al.</i> , 2021)

E1: Estrona, **E2:** 17 β -estradiol, **EE2:** etinilestradiol, **E3:** estriol, **BPA:** Bisfenol-A, **4-OP:** 4-octilfenol, **4-NP:** 4-nonilfenol, **LD:** Limite de detecção, **NQ:** Não quantificado. Fonte: O autor (2022).

Tabela 4 – Ocorrência de compostos estrogênicos em esgotos bruto e tratado no Brasil.

Composto	Matriz	Local	Concentração (ng L ⁻¹)	Referência
E1	Esgoto bruto	Belo Horizonte (MG)	50,5 – 77,8	(KOMOLAFE <i>et al.</i> , 2021)
		Fortaleza (CE)	3050	(PESSOA <i>et al.</i> , 2014)
		EEL/USP - Lorena (SP)	5148	(TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2018)
		Curitiba (PR)	870 – 1380	(FROEHNER <i>et al.</i> , 2011)
	Esgoto tratado	Belo Horizonte (MG)	0,1 – 16	(KOMOLAFE <i>et al.</i> , 2021)
		Fortaleza (CE)	2080	(PESSOA <i>et al.</i> , 2014)
		EEL/USP - Lorena (SP)	5062	(TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2018)
		Curitiba (PR)	< LD	(FROEHNER <i>et al.</i> , 2011)
E2	Esgoto bruto	Belo Horizonte (MG)	< LD	(KOMOLAFE <i>et al.</i> , 2021)
		Fortaleza (CE)	776	(PESSOA <i>et al.</i> , 2014)
		EEL/USP - Lorena (SP)	7434	(TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2018)
		Curitiba (PR)	1330 – 2270	(FROEHNER <i>et al.</i> , 2011)
	Esgoto tratado	Belo Horizonte (MG)	< LD	(KOMOLAFE <i>et al.</i> , 2021)
		Fortaleza (CE)	397	(PESSOA <i>et al.</i> , 2014)
		EEL/USP - Lorena (SP)	4191	(TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2018)
		Curitiba (PR)	490 – 760	(FROEHNER <i>et al.</i> , 2011)
EE2	Esgoto bruto	Belo Horizonte (MG)	< LD	(KOMOLAFE <i>et al.</i> , 2021)
		Fortaleza (CE)	3180	(PESSOA <i>et al.</i> , 2014)
		EEL/USP - Lorena (SP)	5688	(TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2018)
		Curitiba (PR)	600 – 1260	(FROEHNER <i>et al.</i> , 2011)
	Esgoto tratado	Belo Horizonte (MG)	< LD	(KOMOLAFE <i>et al.</i> , 2021)
		Fortaleza (CE)	176	(PESSOA <i>et al.</i> , 2014)
		EEL/USP - Lorena (SP)	2550	(TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2018)
		Curitiba (PR)	< LD – 470	(FROEHNER <i>et al.</i> , 2011)
E3	Esgoto bruto	Belo Horizonte (MG)	625,1 – 1547,9	(KOMOLAFE <i>et al.</i> , 2021)
		EEL/USP - Lorena (SP)	5200	(TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2018)
	Esgoto tratado	Belo Horizonte (MG)	12,5 – 64,3	(KOMOLAFE <i>et al.</i> , 2021)
		EEL/USP - Lorena (SP)	7743	(TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2018)
BPA	Esgoto bruto	Curitiba (PR)	1290 – 84110	(FROEHNER <i>et al.</i> , 2011)
		Belo Horizonte (MG)	1100 – 1544000	(FLORIPES <i>et al.</i> , 2018)
	Esgoto tratado	Curitiba (PR)	< LD – 20	(FROEHNER <i>et al.</i> , 2011)
4-OP	Esgoto bruto	Belo Horizonte (MG)	358000 – 820000	(FLORIPES <i>et al.</i> , 2018)

E1: Estrona, **E2:** 17β-estradiol, **EE2:** etinilestradiol, **E3:** estriol, **BPA:** Bisfenol-A, **4-OP:** 4-octilfenol, **LD:** Limite de detecção. Fonte: O autor (2022).

Tabela 5 – Ocorrência de compostos estrogênicos em lixiviados bruto e tratado de aterro sanitário de resíduos sólidos urbanos no Brasil.

Composto	Matriz	Local	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)
E2	Lixiviado bruto	Região Metropolitana do Rio de Janeiro	237,5 – 2362,6
EE2			38,3 – 2029,4
E3			322,6 – 1567,9
BPA			880,6 – 1513,3
E2	Lixiviado tratado		< LD – 1080,8
EE2			< LD – 9
E3			118,8 – 125,7
BPA			42,8 – 74,8

E2: 17 β -estradiol, **EE2:** etinilestradiol, **E3:** estriol, **BPA:** Bisfenol-A, **4-OP:** 4-octilfenol, **LD:** Limite de detecção. Fonte: França (2016).

2.2 Avaliação da atividade estrogênica em matrizes ambientais

2.2.1 Bioensaios de atividade estrogênica

Uma grande variedade de bioensaios foram desenvolvidos para a quantificação da atividade estrogênica de matrizes ambientais complexas. Estes podem ser divididos em dois grupos: ensaios *in vivo*, com o uso de organismos, e ensaios *in vitro*, com o uso de cultura de células. Em especial, os ensaios *in vitro* apresentam-se como uma alternativa mais econômica, ética e relativamente simples do que os métodos *in vivo* (WANGMO *et al.*, 2018).

Dentro da variedade dos ensaios *in vitro* de atividade estrogênica, tem-se: (i) ensaios de ligantes (*ligand-binding assays*), que detectam interações receptor-ligante. São ensaios competitivos, que quantificam a habilidade de uma substância se ligar ao receptor de estrogênio em detrimento do E2 e, portanto, não há distinção entre agonistas e antagonistas; (ii) ensaios de proliferação de células, conhecidos como *E-screen*. Baseiam-se na proliferação dependente do receptor de estrogênio, principalmente na linhagem de células do carcinoma humano MCF-7; (iii) ensaios com gene repórter, que consistem na transfecção de um construto repórter em células de mamíferos ou leveduras (GEA *et al.*, 2022; WANGMO *et al.*, 2018).

Ensaios de gene repórter podem ainda ser divididos dois grupos. No primeiro, as linhagens de células já contêm o receptor de estrogênio endógeno, cuja ativação é avaliada a partir da expressão do respectivo gene repórter. Metodologias deste grupo usualmente

utilizados para amostras ambientais são os ensaios MELN com células MCF-7 e T47D-KBluc e T47Dluc de células T47D (WANGMO *et al.*, 2018).

No segundo grupo não contém o receptor de estrogênio endógeno, e necessitam da transfecção tanto de um construto de expressão do receptor de estrogênio, quanto de um construto repórter para o elemento de resposta de estrogênio (ERE). Exemplos usuais de ensaios com células de mamíferos são o ER-CALUX[®] e o com a linhagem hERa-HeLa-9903. Além disso, ensaios com leveduras estão disponíveis com estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* (YES), *Arxula adenivorans* (A-YES) e *Photobacterium luminescens* (BLYES) (WANGMO *et al.*, 2018).

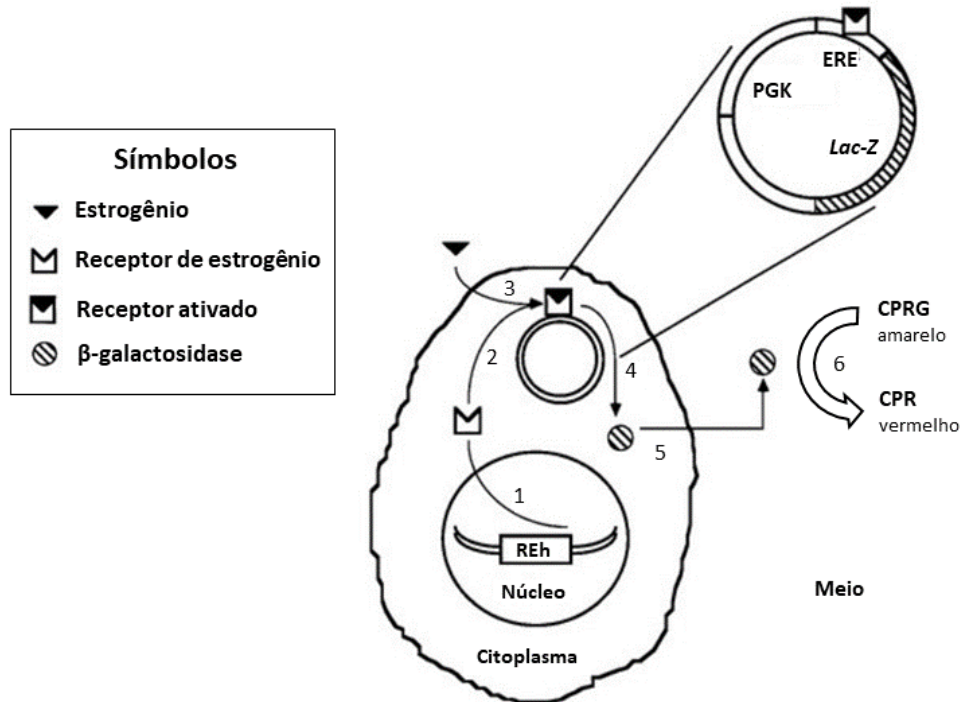
A avaliação da atividade estrogênica por cada metodologia ocorre por um submecanismo específico, podendo ser medida como luminescência, fluorescência ou absorvância (WANGMO *et al.*, 2018).

2.2.2 O ensaio *Yeast Estrogen Screen* (YES)

O ensaio YES (*Yeast Estrogen Screen*), é um bioensaio de ativação transcricional do receptor de estrogênio que utiliza um gene repórter do receptor de estrogênio humano (RE α) integrado ao genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A estirpe foi construída por técnicas de engenharia genética e encontra-se disponibilizada pela Glaxo Group Research (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996).

O ensaio baseia-se na expressão, em presença de amostra com potencial atividade estrogênica, de um receptor de estrogênio humano que, após ativação pela ligação do composto estrogênico, tem-se o estímulo do ativador transcricional e a expressão do gene repórter. O processo resulta na expressão e 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), modificando sua cor. A Figura 4 ilustra esse mecanismo.

Figura 4: Esquema do sistema de expressão de atividade estrogênica pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante (ensaio YES).



(1) Expressão do receptor de estrogênio humano (REh) na forma capaz de (2) acoplar-se aos elementos de resposta de estrogênios (ERE) dentro de um promotor híbrido na expressão de um plasmídeo. (3) Ativação do receptor pela ligação da substância estrogênica. (4) Expressão do gene receptor da lac-Z, que induz a produção da enzima β-galactosidase. (5) Excreção da enzima no meio. (6) Metabolização do substrato cromogênico CPRG (amarelo) em um produto avermelhado. Fonte: Routledge e Sumpter, 1996.

Uma vez que a resposta do ensaio é colorimétrica, sua mensuração é feita por espectrofotometria. Ao avaliar amostras ambientais ou substâncias simples, as respostas são comparadas com as de um controle positivo, no caso o 17 β-estradiol (E2), de modo que os resultados são expressos em concentração de equivalente 17β-estradiol (Eq-E2) (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996).

Algumas particularidades do ensaio devem ser levadas em consideração, tratando-se da análise de amostras ambientais. Avaliando uma matriz complexa, é possível a presença de substâncias que sejam tóxicas à levedura. Nesse caso, a chamada citotoxicidade impedirá o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* e influenciará negativamente na resposta do ensaio, ainda que a amostra contenha substâncias estrogênicas (FRISCHE *et al.*, 2009). Contudo, esse mascaramento da atividade estrogênica pode ser vencido tanto pela diluição dos extratos das amostras como por métodos específicos de *clean-up* (remoção de interferentes) na preparação da amostra (CITULSKI e FARAHBAKHS, 2012).

Além disso, por tratar-se de um ensaio extremamente sensível, é imprescindível a utilização de reagentes adequados, o cuidado no preparo das soluções e o uso de material

descartável estéril (placas, ponteiras, frascos de cultivo) e vidrarias esterilizadas, de modo a evitar qualquer fonte de contaminação que influencie na resposta do ensaio.

Outros fatores que influenciam no ensaio são: (i) o tempo de incubação, que pode interferir nos resultados do controle positivo, da amostra e do controle negativo; (ii) o uso de solventes diferentes do etanol absoluto, que pode causar toxicidade à levedura; (iii) a variação na densidade celular inicial e a fase de crescimento em que ela se encontra, que pode levar a flutuação na sensibilidade do ensaio, alterar a concentração de efeito mediana (CE50) do controle positivo e os resultados de equivalente estradiol (Eq-E2) (GOMES, 2020).

Muitos estudos fazem a correlação de bioensaios com análises químicas, encontrando resultados geralmente com maior magnitude nos primeiros. Há de se considerar, em matrizes ambientais, a eventualidade de sinergismos entre as diversas substâncias. Nesse caso, a estrogenicidade pode ser facilmente quantificada pelo ensaio YES, mas ainda é um desafio para ser predita a partir de métodos analíticos, apesar de trabalhos na literatura acerca disso (EZECHIAȘ, 2021; JOHNSON *et al.*, 2013; RAMIREZ *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2019).

Assim, o ensaio YES se mostra como uma ferramenta útil para a identificação e quantificação da atividade estrogênica em matrizes ambientais, com alta especificidade, sensibilidade e de forma prática e econômica.

2.3 Interações entre DE estrogênicos e matéria orgânica dissolvida (MOD)

2.3.1 Matéria orgânica dissolvida em matrizes ambientais

As diferentes matrizes ambientais possuem uma grande variedade de constituintes orgânicos. O termo matéria orgânica natural (MON) é utilizado para representar todos os compostos orgânicos presentes em um determinado reservatório ou ecossistema natural, diferentemente da matéria orgânica viva e compostos de origem antropogênica (BOTERO, 2010). A MON dissolvida é uma complexa mistura de moléculas aromáticas e alifáticas com grande variação de estruturas químicas e distribuição de massa molar, influenciadas por sua origem, condições climáticas e ciclos biogeoquímicos dos ambientes ao redor (MICHAEL-KORDATOU *et al.*, 2015).

Em águas superficiais, cerca de 20 % da MON é constituída de compostos com estrutura química definida, tais como carboidratos, aminoácidos e hidrocarbonetos, enquanto o restante é definido como matéria orgânica refratária, de estrutura química indefinida (BOTERO, 2010). O componente principal da matéria orgânica dissolvida (MOD) em ambientes aquáticos são substâncias húmicas (MA e YATES, 2018), ainda que sejam controlados por fontes autóctones e alóctones (TOMING *et al.*, 2013), isto é, originário ou não do ambiente no qual se encontram.

Substâncias húmicas são usualmente definidas como polímeros amorfos de coloração escura, massa molar relativamente alta e grupos funcionais distintos, formados durante o processo de decomposição de resíduos vegetais e animais, por reações de oxidação e subsequente polimerização da matéria orgânica (STEVENSON, 1994).

A classificação tradicional das substâncias húmicas se dá pela sua solubilidade, sendo (i) ácidos húmicos (HA) a fração solúvel em meio básico e que é precipitada por acidificação, (ii) ácidos fúlvicos (FA) a fração que permanece solúvel após acidificação e (iii) humina a fração insolúvel em toda a faixa de pH (STEVENSON, 1994).

Além de ambientes naturais aquáticos, substâncias húmicas são abundantes em lixiviados de aterro sanitário, decorrente da degradação dos resíduos sólidos e podendo constituir até 60 % da fração orgânica, o que varia de acordo com a idade do aterro (ŠÍR *et al.*, 2012).

No caso de esgotos sanitários, a constituição típica é de proteínas (40 a 60 %), carboidratos (25 a 50 %), gorduras e óleos (cerca de 10 %), ureia, surfactantes, fenóis, pesticidas (típicos de despejos industriais) e outros (PESSÔA e JORDÃO, 2017). A matéria orgânica dissolvida de efluentes de tratamento biológico é constituída de MON derivada dos mananciais originários, produtos microbiológicos formados durante o tratamento, compostos orgânicos traço e subprodutos de desinfecção, além de fragmentos de células e macromoléculas (MICHAEL-KORDATOU *et al.*, 2015).

2.3.2 Mecanismos de interação com estrogênios

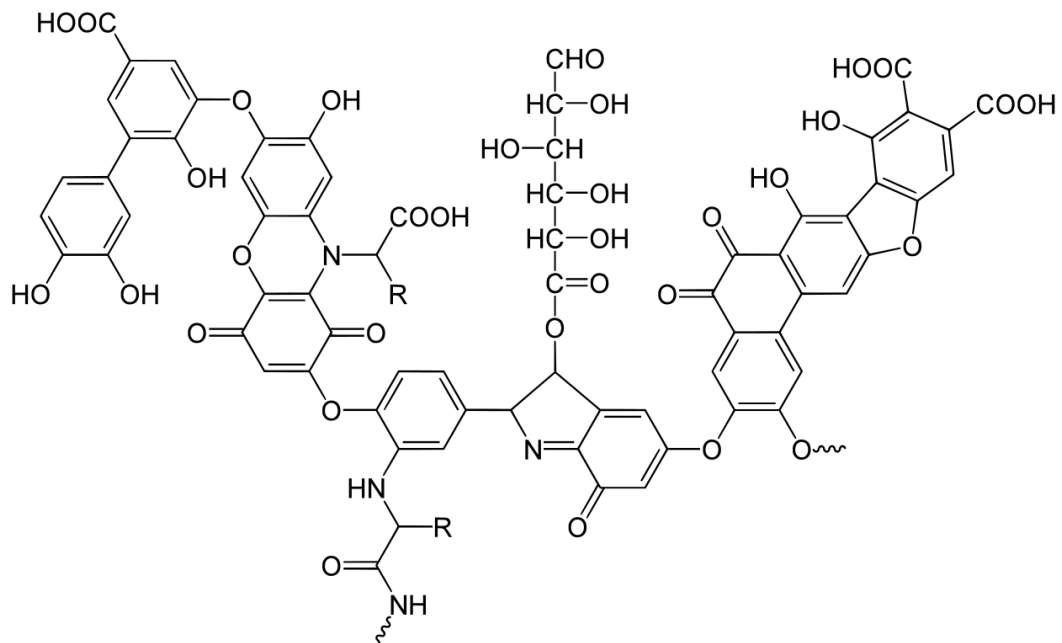
Os mecanismos de interação entre substâncias estrogênicas e a matéria orgânica dissolvida (MOD) presente na matriz são de particular interesse, considerando suas propriedades físico-químicas de moderada hidrofobicidade. Ma e Yates (2018) apontaram que a baixa correlação entre os coeficientes de partição $\log K_{oc}$ e $\log K_{ow}$ de estrogênios indica que

outros mecanismos, além de interações hidrofóbicas, atuam nos fenômenos de sorção, formando complexos estrogênio-MOD.

Estudos sugerem que interações π - π e ligações de hidrogênio sejam os principais mecanismos envolvidos na interação entre estrogênios e matéria orgânica (BEDARD *et al.*, 2014; REN *et al.*, 2017; TONG *et al.*, 2019). No caso do complexo π - π , o sorbato age como doador de elétron π e interage com a matéria orgânica que contém grupamentos aceptores π , tais como quinonas e anéis aromáticos com grupamentos retiradores de elétron (Zhu *et al.*, 2004).

Tong *et al.* (2019) identificaram que ácido húmico (HA) promoveu significativamente a adsorção de E2 em complexos metálicos Mt-HA, o que foi atribuído à presença de numerosos grupamentos funcionais contendo oxigênio na superfície dos complexos, facilitando a criação de ligações de hidrogênio, assim como os grupamentos aromáticos do HA, que possibilitam interações π - π ou partições hidrofóbicas (Figura 5).

Figura 5: Exemplo de estrutura química do ácido húmico.



Fonte: Stevenson (1994).

Ademais, Bedard *et al.* (2014) caracterizaram a ligação entre estrogênios e ácido húmico por espectrometria de ressonância magnética nuclear (NMR) e identificaram que as interações acontecem próximas à hidroxila do anel aromático. Os autores identificaram ainda que o estrogênio ligado ao ácido húmico não estava biologicamente disponível no ensaio YES realizado com a mistura.

Outros autores também têm apontado a redução da biodisponibilidade de substâncias estrogênicas em decorrência da interação com a MOD (KOVACEVIC *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2011; MA e YATES, 2018; NEALE *et al.*, 2015). Dessa forma, amostras ambientais ricas em matéria orgânica podem ter sua atividade estrogênica reduzida quando forem avaliadas por um bioensaio. Nesse sentido, Bai *et al.* (2019) sugeriram que o impacto da MOD natural deve ser considerado quando na avaliação do destino e risco ecológico de DE estrogênicos em águas eutróficas. Por outro lado, o aumento da bioconcentração de estrogênios ocasionado pela MOD de amostras também tem sido reportado (CHEN *et al.*, 2012; ROSENMAI *et al.*, 2018; YOO *et al.*, 2019).

Considerando que os complexos estrogênio-MO resultam na redução do estrogênio livre, reduzindo a atividade estrogênica da amostra avaliada por bioensaio, tem-se a lacuna se a análise química pelo método cromatográfico é capaz de identificar esses compostos. Segundo a revisão de Ma e Yates (2018), a interação entre MOD e fármacos e produtos de higiene pessoal é relativamente fraca e as ligações podem ser separadas por técnicas cromatográficas.

No caso de estrogênios, ainda que a afinidade seja mais forte, padrões internos ou *surrogates* podem ser usados, no caso de espectrômetro de massas (CHEN *et al.*, 2019). Portanto, é provável uma diferença entre a atividade estrogênica de uma amostra ambiental medida por um bioensaio e o valor esperado com base em concentrações medidas por técnica cromatográfica, em decorrência de interações com a MOD.

2.4 Análise de misturas de substâncias

Matrizes ambientais são sempre compostas de uma mistura de substâncias que interagem entre si. Nesse sentido, o provável efeito de misturas deve ser considerado na avaliação da bioatividade de desreguladores endócrinos e na consideração de riscos ambientais. Em geral, estudos sobre o tema são desenvolvidos com uma comparação entre o efeito observado de misturas de substâncias e o efeito esperado calculado a partir dos compostos individuais. Métodos *in vitro* ou *in vivo* são confrontados com modelos matemáticos *in silico* (HAMID *et al.*, 2021).

A comparação é feita a partir da hipótese nula de que o efeito da mistura das substâncias é bem representado por modelos aditivos, isto é, supõe-se a aditividade ou não interação.

Desvios em relação aos modelos são definidos como interações sinérgicas ou antagônicas, representando efeitos superiores ou inferiores ao previsto pelo modelo

Dois modelos matemáticos clássicos advindos da farmacologia são utilizados, a saber, o de adição de concentração (CA), formulado por Loewe e Muischnek (1926) (Equação 1), e de ação independente (IA), formulado por Bliss (1939) (Equação 2), que representam, respectivamente, substâncias que produzem um efeito a partir do mesmo mecanismo de ação ou a partir de mecanismos distintos (MARTIN *et al.*, 2021; RAMIREZ *et al.*, 2014).

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{ECx_i} = 1 \quad (1)$$

$$Y = u_{max} \prod_{i=1}^n q_i(c_i) \quad (2)$$

Onde:

c_i é a concentração da substância i na mistura;

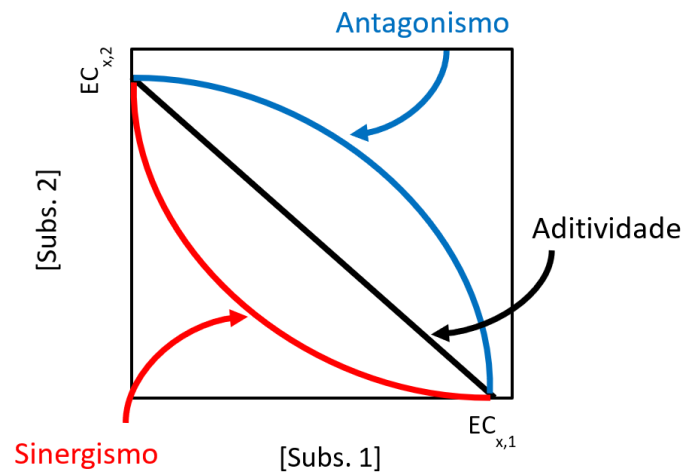
ECx_i é a concentração da substância i que elucida x % do efeito máximo;

$q_i(c_i)$ é a probabilidade de não resposta de c_i ;

u_{max} é o efeito máximo.

Graficamente, os desvios em relação a aditividade de misturas binárias de substâncias simples podem ser observados em isobogramas (Figura 6), constituídas por linhas de contorno da superfície de resposta. As curvas representam o efeito de misturas das combinações (x, y) das substâncias e formam linhas retas no caso de aditividade, enquanto concavidades voltadas para cima indicam sinergismo e concavidades voltadas para baixo indicam antagonismo (RAMIREZ *et al.*, 2014).

Figura 6: Representação esquemática de uma isobolograma.



Fonte: O autor, 2022.

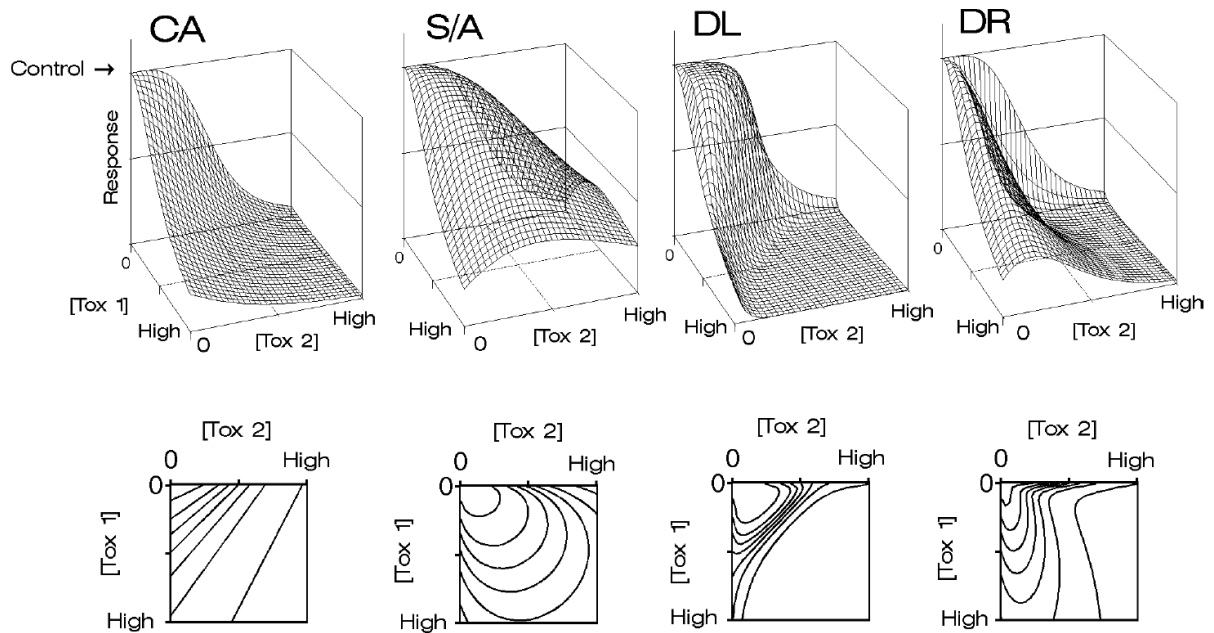
Segundo revisão de Martin *et al.* (2021), que avaliou estudos sobre misturas de substâncias publicados entre 2007 e 2017, 28,3 % dos 1220 experimentos considerados reportaram aditividade, enquanto sinergismo e antagonismo foram reportados para 24,3 % e 19,2 % dos experimentos, respectivamente. Em 28,2 % dos estudos foram reportados efeitos de interação, potenciação ou outras avaliações. No caso de desreguladores endócrinos, mais de 60 % dos estudos foram conduzidos com ensaios *in vitro*. Em grande parte, os estudos são conduzidos com misturas binárias de substâncias (HAMID *et al.*, 2021; MARTIN *et al.*, 2021) o que, apesar de não ser representativo para amostras ambientais complexas, é justificável considerando a complexidade dos modelos e a importância de se avaliar a toxicidade dos diversos contaminantes. Não obstante, os componentes mais bioativos da mistura complexa podem ser identificados e avaliados (ALTENBURGUER *et al.*, 2019)

Em estudos com mistura, especial relevância têm as faixas de concentração utilizadas e o desenho experimental aplicado, que em geral visa minimizar o número de experimentos/combinções. Desenhos experimentais usuais são (i) fatorial completo, no qual o número de combinações é igual ao número de concentrações elevado ao número de misturas. (ii) combinacional ou ortogonal de Taguchi, que pode aumentar o número de experimentos exponencialmente com as concentrações e (iii) diagonal, que minimiza o total de combinações a partir de razões equipotenciais (HAMID *et al.*, 2021).

A escolha do desenho experimental deve considerar a robustez do experimento para que as combinações sejam representativas das misturas com custo reduzido e elevada eficiência. Por outro lado, as concentrações e as razões das concentrações são fundamentais para a elucidação de resposta específica no ensaio.

Diferentes interações podem ocorrer em diferentes faixas de concentração ou razão de uma mesma mistura (JONKER *et al.*, 2005). Assim, a característica e intensidade dos desvios em relação a aditividade podem depender do nível da dose (concentração) ou da razão (proporção) da dose (Figura 7).

Figura 7: Relações dose-resposta de misturas binárias de substâncias simples em representação tridimensional e linhas de contorno características (isobogramas).

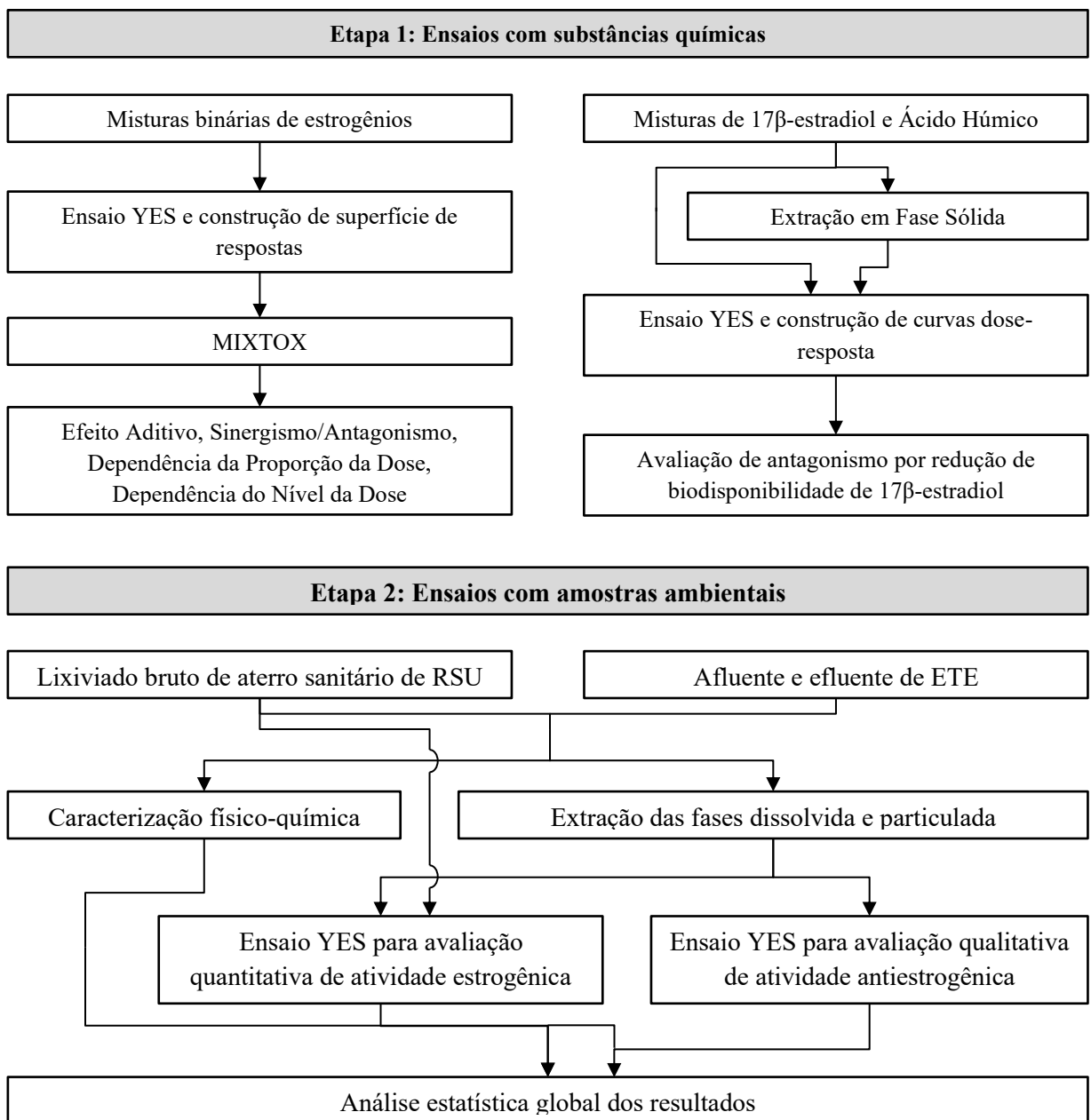


Superfícies características do modelo de adição de concentração (CA), desvio antagonista (S/A), desvio dependente do nível da dose (DL) com antagonismo em baixas concentrações e sinergismo em altas concentrações, desvio dependente da razão/proporção da dose (DR) com antagonismo quando a substância 1 está em maior proporção e sinergismo quando a substância 2 está em maior proporção na mistura. Fonte: Jonker *et al.* (2005).

3. METODOLOGIA

O presente estudo objetivou investigar a influência da interação entre substâncias estrogênicas e da matéria orgânica dissolvida e particulada de amostras ambientais na quantificação de atividade estrogênica com o ensaio *in vitro* YES. Com vistas a alcançar os objetivos específicos, o estudo foi dividido nos blocos conceituais representados na Figura 8.

Figura 8: Fluxograma de blocos conceituais representando a metodologia geral do estudo.



Fonte: O autor, 2022.

3.1 Ensaio Yeast Estrogen Screen

O ensaio de ativação transcricional *Yeast Estrogen Screen* (YES) foi realizado de acordo com Routledge e Sumpter (1996) segundo metodologia consolidada por Gomes (2020). Contudo, algumas variações de procedimento e de cálculo foram aplicadas de forma a atender etapas específicas deste trabalho. Nesta seção é apresentada a metodologia geral do ensaio e eventuais variações são apresentadas nas respectivas seções as quais foram utilizadas.

3.1.1 Reagentes e preparo de soluções

Os reagentes utilizados no preparo das soluções foram fosfato de potássio monobásico, sulfato de amônio, hidróxido de potássio, sulfato de magnésio, sulfato de ferro, L-leucina, L-histidina, adenina, L-arginina-HCL, L-metionina, L-tirosina, L-isoleucina, L-lisina-HCl, L-fenilalanina, ácido glutâmico, L-valina, L-serina, glicose, ácido L-aspártico, L-treonina, sulfato de cobre (II), tiamina, piridoxina, pantetonato de cálcio, inositol, biotina e CPRG, todos obtidos da Sigma-Aldrich®.

As soluções utilizadas no ensaio (Meio Mínimo, Glicose, Ácido L-aspártico, L-treonina, Sulfato de Cobre, Vitamina, CPRG e Meio de Cultivo) têm o protocolo de preparo apresentadas no ANEXO 1.

3.1.2 Cultivo da levedura, pré-inóculo e inóculo

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

Células de levedura foram mantidas congeladas em tubos criogênicos de 2 mL contendo inóculo (meio de cultivo e células) e glicerol esterilizado na proporção 6:4, armazenados a -20 °C. O pré-inóculo foi realizado 72 horas antes do ensaio, descongelando a levedura e diluindo todo o volume do tubo em 10 mL de meio de cultivo em um frasco de cultivo estéril. Este frasco

foi mantido em incubadora de agitação orbital (modelo Q816M20, Quimis) a 28 °C e 150 rpm por 48 horas.

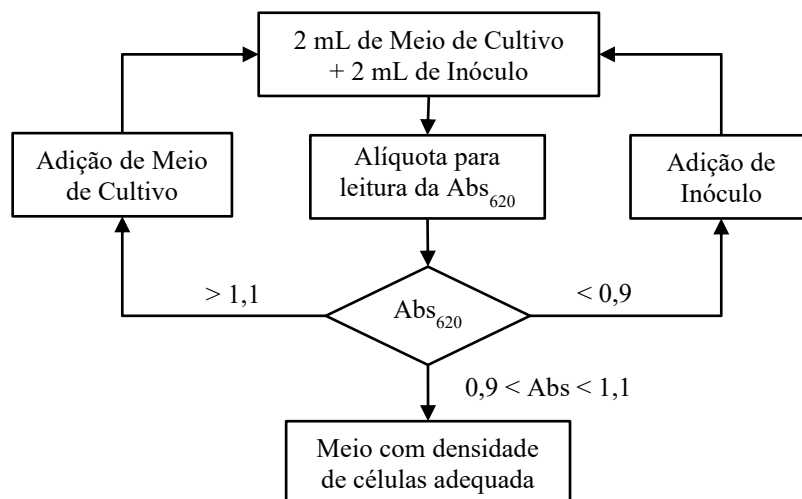
O inóculo da levedura foi realizado 24 horas antes do ensaio adicionando-se 10 mL de meio de cultivo e 100 µL do pré-inóculo a um novo frasco de cultivo. O mesmo foi mantido em incubação nas mesmas condições do pré-inóculo até o ensaio. Toda a manipulação da levedura foi realizada em cabine de segurança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

3.1.3 Preparo do meio de análise

O meio de análise foi preparado em tubos do tipo falcon estéreis ou em frascos de vidro previamente esterilizados, a depender do volume demandado.

Em primeira etapa, prepara-se em um tubo falcon o meio de cultivo com levedura na absorbância à 620 nm igual a $1,0 \pm 0,1$ para que se tenha uma densidade inicial de células adequada para o ensaio. Tal procedimento (Figura 9) é uma adaptação da metodologia original e substitui satisfatoriamente a contagem de células com microscópio (GOMES, 2021).

Figura 9: Procedimento para atingir a concentração adequada de células de levedura



Fonte: O autor, 2022.

Em seguida, o meio de análise foi preparado, adicionando-se em um frasco estéril a proporção de 10 mL do meio de cultivo, 1 mg de CPRG e 10 µL do meio com levedura ($Abs_{620} = 1,0 \pm 0,1$).

3.1.4 Procedimentos do ensaio YES

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

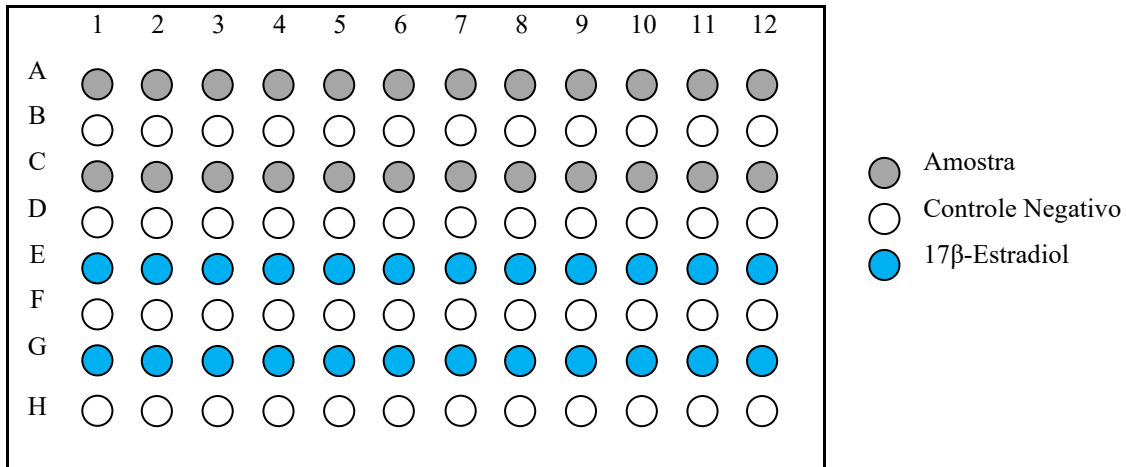
O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços com fundo chato, onde cada linha foi ocupada por uma amostra em 12 concentrações de diluição seriada, pelo controle negativo ou pelo controle positivo. As diluições foram feitas em placa separada especificamente para tal, segundo o roteiro:

- i) Adicionar 100 μL de etanol (grau HPLC) em todos os poços de uma fileira, à exceção do primeiro;
- ii) Adicionar ao primeiro poço 200 μL do extrato da amostra;
- iii) Transferir 100 μL do primeiro poço para o segundo e homogeneizar (realizado com a própria pipeta);
- iv) Transferir 100 μL do segundo poço para o terceiro e homogeneizar;
- v) Continuar o procedimento até o último poço, que terá o volume final de 200 μL .

Após a diluição, 10 μL de cada poço foram transferidos em duplicata para a placa de ensaio, para serem evaporados dentro da capela de fluxo laminar. O procedimento foi realizado para todas as amostras e para o controle positivo. Para o controle negativo (branco) 10 μL de etanol (grau HPLC) foram transferidos 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 10.

Com relação ao controle positivo 17 β -Estradiol (E2), utilizado para gerar a curva padrão que serve de referência comparativa para todo o ensaio, sua diluição foi idêntica às amostras. A solução estoque utilizada consistiu de E2 (> 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 ng L^{-1} a 1,33 ng L^{-1} .

Figura 10: Exemplo de arranjo usual de amostras na placa de 96 poços para o ensaio YES.



Fonte: O autor, 2022.

Com a evaporação dos 10 μL transferidos para cada poço da placa de ensaio, restaram apenas as massas das diluições das amostras. Então, 200 μL do meio de análise foram cuidadosamente adicionados em cada poço da placa. Em seguida, as placas foram fechadas, lacradas, agitadas por 2 minutos em agitador de placas (marca IKA, modelo MS-3) e levadas a estufa para incubação a 30 $^{\circ}\text{C}$ por 72 horas.

Após o período de incubação, 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).

3.1.5 Processamento de dados e análise dos resultados

A partir das leituras das absorvâncias seguiu-se o processamento dos dados e a construção dos gráficos com as curvas dose-resposta do ensaio. Para tanto, foram calculadas as absorvâncias corrigidas com a Equação 3.

$$\text{Abs}_{\text{corr Amostra}} = \text{Abs}_{575 \text{ Amostra}} - (\text{Abs}_{620 \text{ Amostra}} - \text{Abs}_{620 \text{ CN}}) \quad (3)$$

Onde:

$Abs_{575 \text{ Amostra}}$ é a absorvância da amostra em 575 nm;

$Abs_{620 \text{ Amostra}}$ é a absorvância da amostra em 620 nm;

$Abs_{620 \text{ CN}}$ é a absorvância do controle negativo em 620 nm;

$Abs_{\text{corr Amostra}}$ é a absorvância corrigida amostra.

A inibição do crescimento da levedura, observada como a ausência de turbidez no poço ao final do ensaio, pode prejudicar o cálculo acurado da atividade estrogênica da amostra. Logo, o controle da absorvância a 620 nm foi usado como ferramenta de quantificação do efeito inibitório devido a citotoxicidade, de acordo com a Equação 4 proposta por Frische *et al.* (2009).

$$Citotoxicidade = 1 - \left(\frac{Abs_{620 \text{ Amostra}}}{Abs_{620 \text{ CN}}} \right) \quad (4)$$

Onde:

$Abs_{620 \text{ Amostra}}$ é a absorvância da amostra em 620 nm;

$Abs_{620 \text{ CN}}$ é a absorvância do controle negativo em 620 nm;

Com o software Origin[®] 6.0 (OriginLab) foram plotados os gráficos com as curvas dose-resposta, relacionando as médias das $Abs_{\text{corrigida}}$ em função das concentrações (ng L⁻¹ para o E2 e porcentagem para os extratos das amostras) em escala logarítmica. O ajuste sigmoial para a curva padrão do controle positivo foi realizado por regressão não-linear, obtendo os parâmetros A_1 , A_2 , x_0 e p , que estão relacionados, respectivamente, à indução máxima e mínima da β -galactosidase, o CE50 (concentração de efeito mediana) do 17 β -estradiol e a inclinação da curva sigmoial. Estes parâmetros foram aplicados na Equação 5 para interpolação das curvas das amostras com a curva padrão, onde y é a $Abs_{\text{corrigida}}$ da amostra e x é a concentração de 17 β -estradiol equivalente ao efeito observado das substâncias estrogênicas da amostra no ensaio.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x_0/x)^p} + A_2 \quad (5)$$

Onde:

A_1 é a indução máxima da enzima β -galactosidase em absorvância corrigida;

A_2 é a indução mínima da enzima β -galactosidase em absorvância corrigida;

x_0 é a concentração de efeito mediano (CE50) do 17 β -estradiol;

p é a inclinação da curva dose-resposta do 17 β -estradiol;

y é a absorvância corrigida observada da diluição da amostra no ensaio;

x é a concentração de 17β -estradiol equivalente ao efeito y .

O resultado de equivalente estradiol (Eq-E2) (Equação 6) das amostras foi obtido a partir do valor x_i referente à menor concentração-teste que elucidou uma resposta agonista, dividido pelo fator de concentração final da amostra no ensaio, isto é, o fator de concentração aplicado no processo de extração e concentração da amostra dividido pelo fator de diluição do ensaio.

$$Eq-E2 = \frac{x_i}{FC/FD} \quad (6)$$

Onde:

x_i é a concentração de 17β -estradiol equivalente à menor concentração-teste da amostra que elucidou resposta agonista;

FC é o fator de concentração do processo de extração e concentração da amostra;

FD é o fator de diluição utilizado no ensaio;

$Eq-E2$ é o resultado de atividade estrogênica da amostra em equivalente-estradiol.

O limite de detecção do ensaio (LD), isto é, a menor concentração em Eq-E2 detectável no ensaio, foi calculado com a Equação 7 de acordo com Gomes (2020).

$$LD = 1,1 \times x_{j(E2)} \quad (7)$$

Onde:

x_j é a concentração-teste de 17β -estradiol imediatamente inferior à menor concentração-teste de 17β -estradiol que elucidou resposta agonista no ensaio;

LD é o limite de detecção do ensaio.

3.2 Etapa 1: Ensaio com substâncias simples

3.2.1 Análise de misturas binárias de estrogênios

3.2.1.1 *Preparo de soluções e arranjo experimental*

A análise de misturas binárias de substâncias estrogênicas foi realizada com os compostos estrogênios 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2), estrona (E1) e estriol (E3), obtidos da Sigma-Aldrich[®]. As soluções estoque foram preparadas em etanol absoluto (Tedia[®], grau HPLC), de acordo com a Tabela 6. Inicialmente, os compostos individuais foram submetidos ao ensaio YES na faixa de concentração apresentada na Tabela 6 para obtenção dos parâmetros das respectivas curvas dose-resposta.

Tabela 6 – Concentração da solução estoque e faixa de concentração das curvas individuais dos compostos estrogênicos avaliados.

Composto	Concentração da solução estoque ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa de concentração testada na curva individual (ng L^{-1})	Faixa de concentração testada em mistura (ng L^{-1})
17 β -estradiol (E2)	54,48	1,33 – 2724	13,62 – 108,96
17 α -etinilestradiol (EE2)	54,48	1,33 – 2724	13,62 – 103,51
Estrona (E1)	150	3,66 – 7500	37,5 – 292,5
Estriol (E3)	$1,0 \times 10^5$	2440 – $5,0 \times 10^6$	1750 – $1,25 \times 10^4$

Fonte: O autor, 2022.

Em seguida, foi aplicado um desenho experimental de proporção fixa parcial (CASSEE *et al.*, 1998) para que a maior parte das misturas não atingisse o platô superior da curva sigmoidal e ainda assim representassem uma ampla superfície de resposta. O arranjo para cada par de substâncias consistiu de 23 combinações de diferentes proporções dos compostos, tal como apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Arranjo experimental de proporção fixa parcial aplicado para a análise de misturas binárias de substâncias estrogênicas.

Combinação	Força Tóxica (FT)	Unidade Tóxica (UT)	
		Substância 1	Substância 2
1	0,375	0,250	0,125
2		0,125	0,250
3	0,500	0,375	0,125
4		0,250	0,250
5		0,125	0,375
6	0,750	0,625	0,125
7		0,500	0,250
8		0,375	0,375
9		0,250	0,500
10		0,125	0,625
11	1,000	0,875	0,125
12		0,750	0,250
13		0,625	0,375
14	1,000	0,500	0,500
15		0,375	0,625
16		0,250	0,750
17		0,125	0,875
18	1,500	1,000	0,500
19		0,750	0,750
20		0,500	1,000
21	1,750	1,000	0,750
22		0,750	1,000
23	2,000	1,000	1,000

Fonte: O autor, 2022.

As misturas binárias foram preparadas individualmente a partir das soluções estoque em *vials*. A concentração de cada substância na mistura binária foi calculada de acordo com a Equação 8:

$$c_i = UT_i \times CE50_i \times FD \quad (8)$$

Onde:

UT_i é uma das unidades tóxicas das substâncias que compõem a mistura e que somadas resultam na força tóxica FT;

$CE50_i$ é a concentração de efeito mediana da substância i ;

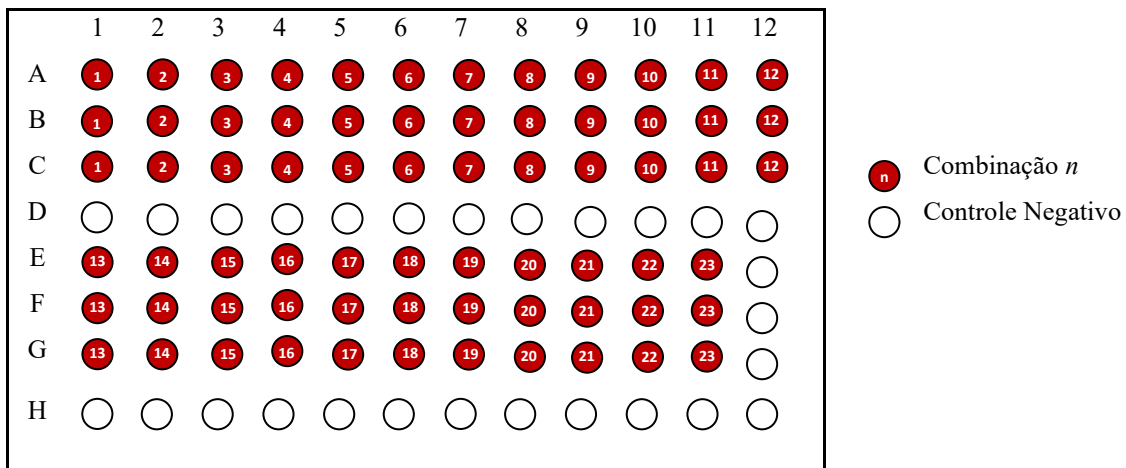
FD é o fator de diluição aplicado no ensaio YES;

c_i é a concentração calculada para a substância i .

As misturas nas concentrações calculadas foram preparadas em 2 mL de etanol absoluto em *vials* descontaminados e, em seguida, foram homogeneizadas e acondicionadas em geladeira ao abrigo da luz para serem submetidas ao ensaio YES dentro de 24 horas.

Para que cada combinação de mistura preparada corresponda a um ponto da superfície de resposta avaliada, 10 μ L de cada mistura foi diretamente transferido em triplicata para a placa de ensaio (Figura 11). Após completa evaporação, 200 μ L do meio de análise foram adicionados a cada poço seguiu-se o procedimento padrão do ensaio.

Figura 11: Exemplo de arranjo na placa de 96 poços para a avaliação de misturas com o ensaio YES.



Fonte: O autor, 2022.

3.2.1.2 Processamento de dados e análise dos resultados

O processamento dos dados do ensaio de misturas foi realizado com a ferramenta MIXTOX no programa Excel (Microsoft), com formulação proposta por Jonker *et al.* (2005). Para tanto, as absorbâncias medidas do ensaio foram inicialmente corrigidas com a Equação 9, que desconta o valor da Abs_{575} do controle negativo a 575 nm e iguala a $Abs_{corrigida}$ do controle negativo a zero.

$$\text{Abs}_{\text{corr}} = \text{Abs}_{575 \text{ Amostra}} - \text{Abs}_{575 \text{ CN}} - (\text{Abs}_{620 \text{ Amostra}} - \text{Abs}_{620 \text{ CN}}) \quad (9)$$

Onde:

$\text{Abs}_{575 \text{ Amostra}}$ é a absorvância da amostra em 575 nm;

$\text{Abs}_{575 \text{ CN}}$ é a absorvância do controle negativo em 575 nm;

$\text{Abs}_{620 \text{ Amostra}}$ é a absorvância da amostra em 620 nm;

$\text{Abs}_{620 \text{ CN}}$ é a absorvância do controle negativo em 620 nm;

Abs_{corr} é a absorvância corrigida amostra.

Em seguida, as médias das absorvâncias corrigidas das 23 combinações de misturas foram analisadas com o modelo conceitual de Adição de Concentração (CA) (Equação 1), que pode ser reescrita e generalizada como a Equação 10 (Jonker *et al*, 2005).

$$\sum_{i=1}^2 \frac{c_i}{f_i^{-1}(Y)} = \exp(G) \quad (10)$$

Onde:

Y é a resposta biológica da mistura medida em absorvância corrigida;

i é uma das substâncias da mistura;

c_i é a concentração da substância i que resulta na resposta biológica Y ;

$f_i^{-1}(Y)$ é a função da relação dose-resposta inversa para a substância i ;

G é o grau de desvio com relação a adição de concentração.

Assim, para $G = 0$, $\exp(G) = 1$ e a equação passa a representar o caso particular da Equação 1.

Os dados medidos foram comparados com os efeitos preditos pelo modelo de referência CA, que foi então estendido para o desvio de sinergismo/antagonismo adicionando-se a função $G(z)$ (Equação 11) à Equação 10 (Jonker *et al*, 2005).

$$G(z_1, z_2) = a \times z_1 \times z_2 \quad (11)$$

Onde:

a é o parâmetro de sinergismo/antagonismo descrito na Tabela 8;

z_i é a quantidade parcial de unidade tóxica de cada substância i da mistura descrita pela Equação 12.

$$z_i = \frac{\frac{c_i}{CE50_i}}{\frac{c_1}{CE50_1} + \frac{c_2}{CE50_2}} \quad (12)$$

Onde:

c_i é a concentração da substância i na mistura;

$CE50_i$ é a concentração de efeito mediana da substância i .

Tabela 8 – Interpretação dos parâmetros a e b adicionais à função do modelo de referência de adição de concentração (CA), que definem a função de desvio.

Sinergismo/antagonismo (S/A)		
A	> 0	Antagonismo
	< 0	Sinergismo
Dependência da proporção da dose (DR)		
A	> 0	Antagonismo, exceto para as proporções de mistura nas quais b_i s negativos significativos indicam sinergismo
	< 0	Sinergismo, exceto para as proporções de mistura nas quais b_i s positivos significativos indicam antagonismo
b_i	> 0	Antagonismo onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo composto i
	< 0	Sinergismo onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo composto i
Dependência do nível da dose (DL)		
A	> 0	Antagonismo em baixos níveis da dose e sinergismo em altos níveis da dose
	< 0	Sinergismo em baixos níveis da dose e antagonismo em altos níveis da dose
b_{DL}	> 1	Mudança S/A em um nível de dose inferior ao CE50
	$= 1$	Mudança S/A no nível do CE50
	$0 < b_{DL} < 1$	Mudança S/A em um nível de dose superior ao CE50
	< 0	Não há mudança, porém a magnitude do S/A depende do nível da dose

Fonte: Adaptado de Jonker *et al.* (2005).

Então, a equação resultante descreve antagonismo ou sinergismo caso o parâmetro a seja positivo ou negativo, respectivamente (Tabela 8). A significância estatística do desvio S/A

em relação ao modelo CA foi testada por máxima verossimilhança e, em caso positivo ($p < 0,05$), os dados foram novamente estendidos para os desvios de Dependência da Proporção da Dose (DR) (Equação 13) e de Dependência do Nível da Dose (DL) (Equação 14), adicionando-se as respectivas funções $G(z)$ à Equação 10.

$$G(z_1, z_2) = (a + b_1 z_1) z_1 z_2 \quad (13)$$

$$G(z_1, z_2) = a \left(1 - b_{DL} \left(\frac{c_1}{CE50_1} + \frac{c_2}{CE50_2} \right) \right) z_1 z_2 \quad (14)$$

Onde:

a é o parâmetro de sinergismo/antagonismo descrito na Tabela 8;

b_i é o parâmetro de dependência da proporção da dose descrito na Tabela 8;

b_{DL} é o parâmetro de dependência do nível da dose descrito na Tabela 8;

c_i é a concentração da substância i na mistura;

$CE50_i$ é a concentração de efeito mediana da substância i ;

z_i é a quantidade parcial de unidade tóxica de cada substância i da mistura.

Por fim, as extensões para os desvios DR e DL tiveram sua significância novamente testada por análise de máxima verossimilhança e os dados de absorbância corrigida obtidos pelos modelos foram utilizados para construção de gráficos de superfície e isobogramas com o software SigmaPlot. A interpretação da análise de misturas se deu a partir dos parâmetros dos modelos desviantes S/A, DR e DL em relação ao modelo de referência CA, de acordo com a Tabela 8.

3.2.2 Avaliação da influência da matéria orgânica dissolvida

3.2.2.1 *Preparo de soluções*

Com o objetivo de avaliar a influência da matéria orgânica dissolvida (MOD) na biodisponibilidade de substâncias estrogênicas pelo ensaio YES, ácido húmico (HA) comercial (Sigma Aldrich) foi utilizado como referência de matéria orgânica e 17 β -estradiol (E2) foi

utilizado como referência de substância estrogênica. Sendo abundante em matrizes ambientais aquosas, HA é frequentemente utilizado como referência de MOD.

A solução estoque de E2 foi inicialmente preparada em etanol na concentração 544,8 mg L⁻¹ e, após duas diluições seriadas em água ultrapura, na concentração final de 108,96 µg L⁻¹. A solução estoque de HA foi inicialmente preparada na concentração de 8000 mg L⁻¹ em água ultrapura com pH 12 ajustado com NaOH. A solução permaneceu em agitação magnética por 24 horas em vidraria descontaminada. Na sequência, deu-se a filtração em membranas de fibra de vidro (Ø 0,7 µm) e de nitrocelulose (Ø 0,45 µm) e em filtro seringa de PTFE (Ø 0,22 µm) para retenção de material não dissolvido. Por fim, a concentração de carbono orgânico dissolvido do filtrado foi medida com o analisador de carbono orgânico total TOC-V CPN (Shimadzu), resultando em 2953 mg_c L⁻¹.

Duas abordagens experimentais foram aplicadas para os ensaios com ácido húmico: i) análise de misturas de E2 + HA aquosas com o ensaio YES e ii) preparo de amostras aquosas sintéticas submetidas a extração em fase sólida (EFS) completa para avaliação de extratos em etanol com o ensaio YES.

3.2.2.2 *Análise de soluções aquosas*

Os ensaios com soluções aquosas (sem extração) foram realizados com base na abordagem de Schild (SCHILD, 1949), que foi originalmente desenvolvido para a determinação da constante de equilíbrio de dissociação de compostos antagonistas. O arranjo experimental consistiu de sete curvas dose-resposta de E2 adicionadas cada uma de uma concentração constante de HA, além de uma curva apenas de E2.

As concentrações testadas de HA foram calculadas com base na capacidade estimada de sorção às moléculas de E2 a partir do coeficiente de partição carbono orgânico-água (K_{oc}), segundo a formulação proposta por Neale *et al.* (2015). Utilizando a Equação 15 e o log K_{oc} experimental de 4,21 para o HA em pH 7 (NEALE *et al.*, 2008), soluções aquosas de HA foram preparadas a partir da solução estoque em *vials* com água ultrapura de acordo com a Tabela 9.

Com o objetivo de viabilizar uma eventual avaliação rápida de amostras, foi analisada a cor verdadeira das concentrações-teste de HA, com resultados em mg Pt-Co L⁻¹ na Tabela 9.

$$c_f = \frac{m_{MOD}}{V_w} \left(\left(\frac{1}{f} - 1 \right) \times K_{oc} \right)^{-1} \quad (15)$$

Onde:

c_f é a concentração calculada de matéria orgânica dissolvida estimada para sorção de $f\%$ das moléculas de E2 disponíveis;

m_{MOD} é a massa da matéria orgânica dissolvida estimada de sorver $f\%$ das moléculas de E2 disponíveis;

V_w é o volume de água;

f é a fração de 17 β -estradiol sorvido à matéria orgânica dissolvida (%);

K_{oc} é o coeficiente de partição carbono orgânico-água do HA.

Tabela 9 – Concentração das soluções de ácido húmico utilizadas para o ensaio de misturas com a curva de 17 β -estradiol de 21,28 a 2724 ng L⁻¹.

Capacidade teórica de sorção ao 17 β -estradiol (f)	Concentração da solução aquosa intermediária (mgc L ⁻¹)	Concentração-teste	
		(mgc L ⁻¹)	(mg Pt-Co L ⁻¹)
5%	43	3	82
10%	92	7	195
15%	145	11	354
20%	206	15	448
40%	550	41	1159
60%	1230	92	2592
70%	1916	144	4054

Fonte: O autor, 2022.

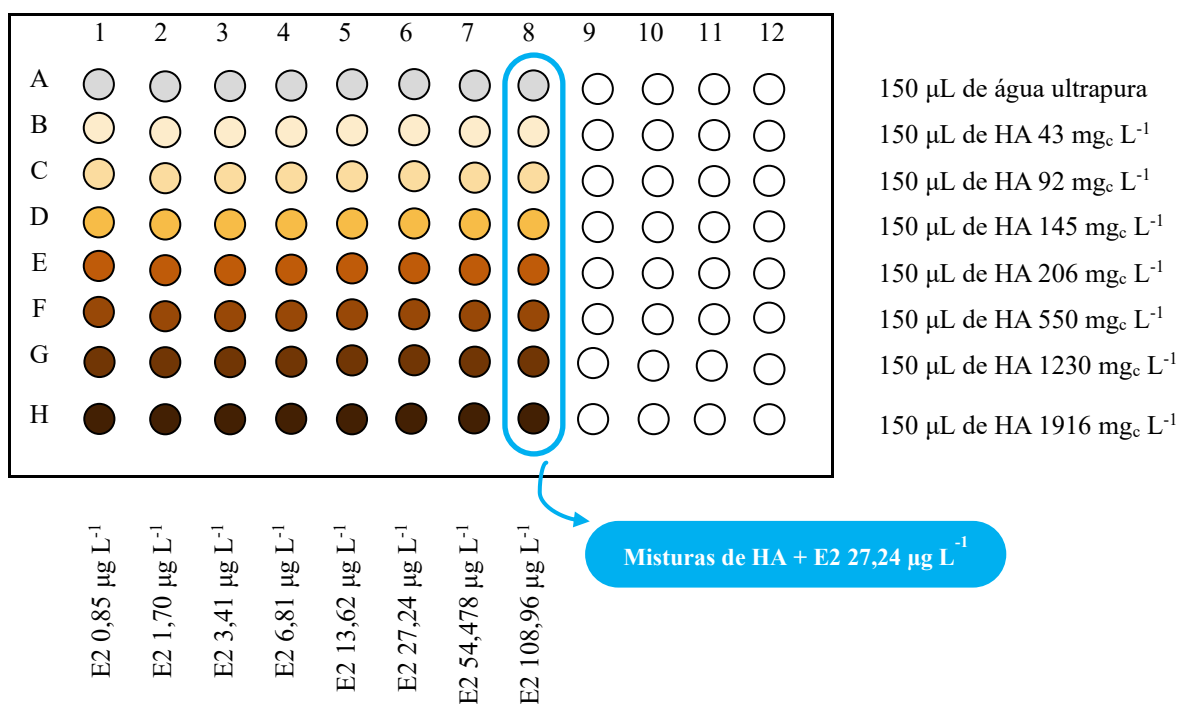
Previamente ao ensaio com misturas, as concentrações de HA foram submetidas a medição do espectro de absorbâncias entre os comprimentos de onda 200 nm e 1100 nm com o espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu) e ao ensaio YES, para investigar a absorbância natural das concentrações de HA e sua eventual estrogenicidade.

Para o ensaio das misturas aquosas, foi aplicada a variação do procedimento padrão do ensaio YES descrita a seguir:

- i) A diluição seriada da curva dose-resposta de E2 foi realizada com água ultrapura em *vials* totalizando oito concentrações na faixa de 108,96 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 0,85 $\mu\text{g L}^{-1}$;
- ii) Em uma placa de diluição, 150 μL de água ultrapura foram adicionados aos 8 primeiros poços da linha A (Figura 12). Aos 8 primeiros poços da linha B foram

- adicionados 150 μL das solução de HA 43 $\text{mg}_c \text{L}^{-1}$ e, às demais linhas, 150 μL das soluções de HA de concentração 92 – 1916 $\text{mg}_c \text{L}^{-1}$;
- iii) Aos poços da primeira coluna foram adicionados 50 μL da solução de 0,85 $\mu\text{g L}^{-1}$ de E2, os quais foram homogeneizados 5 vezes nos poços com a própria pipeta. O mesmo procedimento foi realizado para segunda coluna com a solução de E2 1,70 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para as demais colunas com as demais soluções de E2.
- iv) As misturas permaneceram ao abrigo da luz com a placa fechada durante 30 minutos para o equilíbrio entre as substâncias (BOTERO *et al.*, 2011);
- v) Por fim, 20 μL de cada mistura ou de água ultrapura para o controle negativo foram transferidos para uma placa de ensaio em triplicata e 180 μL do meio de análise foram transferidos para cada poço.

Figura 12 – Esquema da placa de diluição para preparo do ensaio YES com misturas aquosas de 17 β - estradiol e ácido húmico.



Fonte: O autor, 2022.

Após as diluições, as concentrações finais no ensaio foram de 21,28 – 2724 ng L^{-1} de E2 e 3,25 – 144 $\text{mg}_c \text{L}^{-1}$ de HA.

Adicionalmente, 20 μL de cada mistura HA + E2 27,24 $\mu\text{g L}^{-1}$, destacadas na Figura 12, foram transferidos para a placa de ensaio em quadruplicata. Estes poços receberam 180 μL de uma solução denominada meio branco consistindo de meio de cultivo e CPRG na mesma

concentração que o meio de análise, ou seja, uma solução análoga ao meio de análise, porém sem a levedura.

Na sequência, as placas foram lacradas, homogeneizadas e incubadas por 72 horas a 30 °C, tal como no protocolo padrão e, ao final do ensaio, foram medidas as absorvâncias a 575 e 620 nm.

De modo a considerar apenas o efeito da interação entre as substâncias de referência avaliadas, as absorvâncias corrigidas para o ensaio com soluções aquosas de HA foram calculadas a partir da Equação 16.

$$\text{Abs}_{\text{corr}} = \text{Abs}_{575 \text{ Amostra}} - (\text{Abs}_{620 \text{ Amostra}} - \text{Abs}_{620 \text{ CN}}) - (\text{Abs}_{575 \text{ BrAmostra}} - \text{Abs}_{575 \text{ BrCN}} - (\text{Abs}_{620 \text{ BrAmostra}} - \text{Abs}_{620 \text{ BrCN}})) \quad (16)$$

Onde

$\text{Abs}_{575 \text{ Amostra}}$ = absorvância à 575 nm da amostra com meio de análise;

$\text{Abs}_{620 \text{ Amostra}}$ = absorvância à 620 nm da amostra com meio de análise;

$\text{Abs}_{620 \text{ CN}}$ = absorvância à 620 nm do controle negativo com meio de análise;

$\text{Abs}_{575 \text{ BrAmostra}}$ = absorvância à 575 nm da amostra com meio branco;

$\text{Abs}_{575 \text{ BrCN}}$ = absorvância à 575 nm do controle negativo com meio branco;

$\text{Abs}_{620 \text{ BrAmostra}}$ = absorvância à 620 nm da amostra com meio branco;

$\text{Abs}_{620 \text{ BrCN}}$ = absorvância à 620 nm do controle negativo com meio branco;

Por fim, a interpretação dos resultados foi baseada no comportamento e parâmetros da curva dose-resposta do E2 após a adição e incremento das concentrações de HA. Três comportamentos característicos são apresentados, de acordo com Černá *et al.* (2022):

- i) Compostos antagonistas causam um deslocamento da curva dose-resposta de E2, i.e., alteração do EC50;
- ii) A diminuição do valor máximo da curva indica o efeito antagonista causada sem interação com o sítio de ligação do receptor;
- iii) O aumento do valor mínimo da curva indica presença de compostos agonistas.

3.2.2.3 Análise de extratos de soluções

A análise de soluções aquosas submetidas ao processo de extração em fase sólida (EFS) foi empregada de modo a verificar se o comportamento observado nos ensaios com soluções aquosas ocorreria também com os extratos de amostras. Para tanto, 3 soluções em duplicata foram preparadas com água ultrapura em balão volumétrico descontaminado a partir das soluções estoque, de acordo com a Tabela 10.

Tabela 10 – Soluções sintéticas submetidas a extração em fase sólida para avaliação da influência de matéria orgânica dissolvida no ensaio YES.

Amostra	Concentração de E2 (ng L⁻¹)	Concentração de HA (mg_c L⁻¹)	Volume (mL)
E2+HA-1	160	320	50
E2+HA-2	160	320	50
HA-1	-	320	50
HA-2	-	320	50
E2-1	160	-	50
E2-2	160	-	50

Fonte: O autor, 2022.

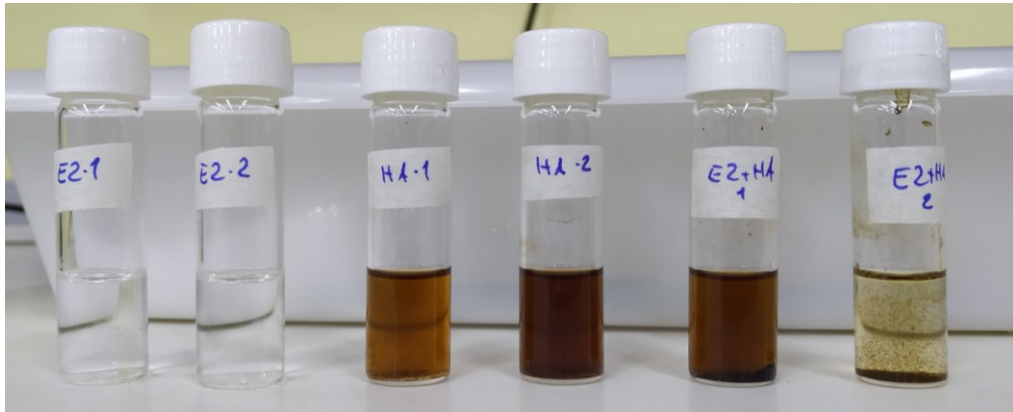
As concentrações utilizadas foram definidas considerando um fator de concentração final no ensaio igual a 1,25 e a recuperação estimada no processo de extração de 100% e 50% para E2 e HA, respectivamente. Desse modo, as concentrações estimadas das substâncias no ponto mais concentrado da curva seriam iguais a 200 ng L⁻¹ e 160 mg_c L⁻¹ para E2 e HA, respectivamente.

Previamente ao início da extração, as amostras permaneceram ao abrigo da luz por 30 minutos para equilíbrio entre as substâncias. Na sequência, amostras foram acidificadas a pH 2 com HCl e extraídas com cartuchos Strata-X (Phenomenex[®]) de 500 mg/6 mL de fase sorvente polimérica de base estireno-divinilbenzeno com superfície modificada, sob vácuo em Manifold (Agilent Technologies[®]).

O condicionamento dos cartuchos foi realizado 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. Em seguida, as amostras foram percoladas sob vácuo, na vazão aproximada de 3 mL min⁻¹ com cuidado para que a fase não ficasse seca. Após a percolação de amostras, foi realizado *clean up* com 10 mL de solução de metanol e água ultrapura (1:9) e, em sequência, o vácuo foi mantido por 10 minutos para completa secagem dos cartuchos.

A eluição dos analitos foi realizada com 4 mL de acetona (grau HPLC, Tedia®), sob ação da gravidade, com os volumes transferidos para frascos de vidro de 6 mL usando o sistema manifold sem o vácuo. Ao final, o vácuo foi acionado por 5 minutos para a completa secagem dos cartuchos. Os extratos das amostras foram evaporados com fluxo de nitrogênio gasoso e reconstituídos com 2 mL de etanol (grau HPLC, Tedia®) para a realização do ensaio YES, segundo o protocolo padrão descrito em 3.1.4. A Figura 13 ilustra o resultado das extrações das amostras.

Figura 13 – Foto dos extratos das amostras sintéticas submetidas a extração em fase sólida para avaliação da influência de matéria orgânica dissolvida no ensaio YES.

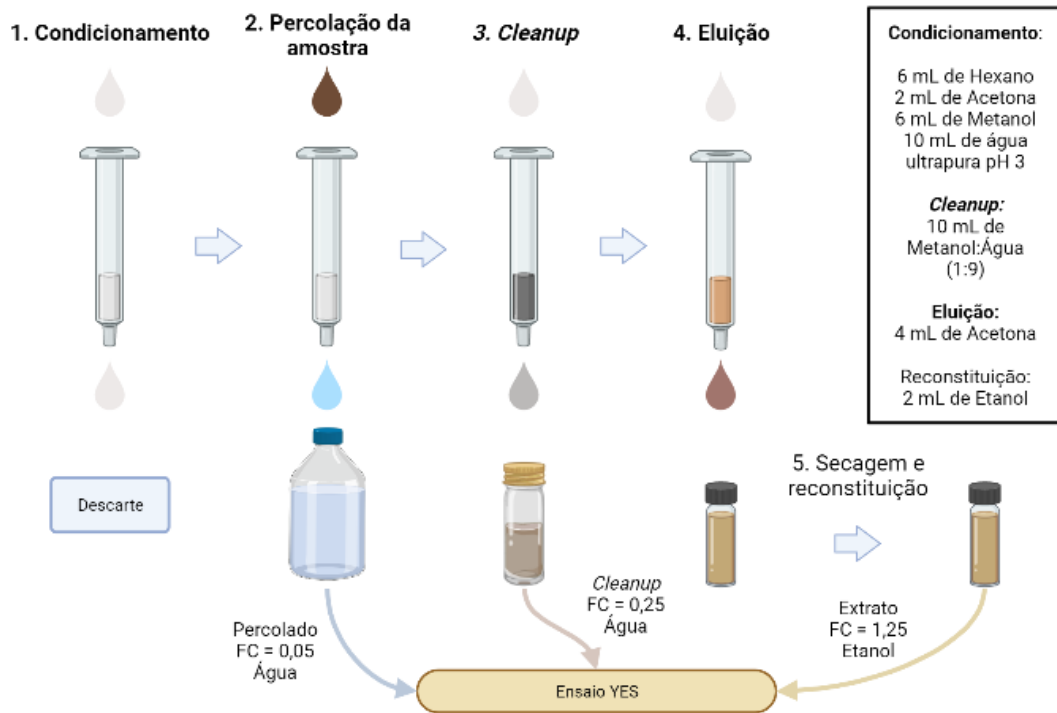


Fonte: O autor, 2022.

Para a investigar a recuperação de HA pelo processo de EFS, foi aplicado um protocolo adaptado de Neale e Escher (2014). Assim, 1,5 mL de extrato das amostras em etanol e 1,5 mL de etanol (branco) foram secos em tubos falcon de 15 mL. Em seguida, a massa seca foi diluída com 15 mL de água ultrapura elevando-se o valor do pH com NaOH e mais 15 mL de água ultrapura foram adicionados. Por fim, amostras foram homogeneizadas e o carbono orgânico dissolvido (COD) foi medido com o analisador de carbono orgânico total. O branco do procedimento, realizado apenas com etanol, teve COD não detectado pelo método ($LD = 4 \text{ mg L}^{-1}$) e o procedimento foi, de modo conservador, considerado adequado.

Considerando os resultados obtidos para a primeira bateria de ensaios, levantou-se a hipótese de que uma fração da estrogenicidade da amostra poderia manter-se complexada com o HA e perder-se durante o processo de extração. Portanto, quatro novas réplicas de amostra sintética E2+HA nas mesmas concentrações da Tabela 10 foram preparadas e submetidas à EFS, tendo os volumes de amostra percolada (50 mL) e de *cleanup* (10 mL) recolhidos em frascos para posterior análise pelo ensaio YES, de acordo com a Figura 14.

Figura 14 – Esquema de coleta das frações das amostras sintéticas submetidas a extração em fase sólida para análise com o ensaio YES.



FC: Fator de Concentração final no ensaio. Fonte: O autor, 2022.

Uma vez que o percolado e o *cleanup* estiveram solubilizados em água, a diluição seriada das amostras e do controle positivo E2 foi realizada com água ultrapura no ensaio YES. Além disso, cada fração foi analisada com um fator de concentração específico devido aos diferentes volumes empregados.

O processamento dos dados e a análise dos resultados de todas as frações das amostras sintéticas foram realizados de acordo com a metodologia padrão descrita em 3.1.5.

3.3 Etapa 2: Ensaios com amostras ambientais

3.3.1 Origem, coleta e identificação de amostras ambientais

Neste estudo foram avaliadas amostras ambientais de lixiviado bruto de aterro sanitário de resíduos sólidos urbanos (RSU) e afluente e efluente de Estação de Tratamento de Esgoto

(ETE). A amostra de lixiviado bruto foi proveniente de aterro localizado no estado do Rio de Janeiro, que opera desde 2011 e recebe cerca de 10000 toneladas de resíduos diariamente.

Amostras de afluente e efluente de ETE foram provenientes de Estação de Tratamento de Esgoto localizada na região metropolitana do Rio de Janeiro. A ETE tem capacidade de operação na vazão de 2500 L s^{-1} em nível secundário com sistema de lodos ativados. Salienta-se que a ETE possui licença de operação para co-tratamento de lixiviado de aterro sanitário de RSU em no máximo 1% (v/v) da vazão de esgoto afluente e que durante o período de coleta houve recebimento de lixiviado.

Amostras de afluente de ETE foram coletadas imediatamente após a calha Parshall da ETE e amostras de efluente foram coletadas no efluente final da estação (Figura 15).

Figura 15 – Vista aérea da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Alegria e detalhe dos locais de coleta de amostras.



(a) Vista aérea da ETE avaliada; (b) Foto da calha Parshall no início da ETE; (c) Foto do lançamento do efluente final. Fonte: foto (a) – CEDAE (2022); fotos (b) e (c) – O autor (2022).

Amostras para o ensaio YES foram coletadas em frascos de vidro âmbar previamente descontaminados, acidificadas a pH 2 com HCl e armazenados a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até o processo de extração. Amostras para análises físico-químicas foram coletadas em frascos de polietileno e armazenadas a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise. A Tabela 11 apresenta a identificação das amostras.

Tabela 11 – Identificação e descrição de amostras ambientais avaliadas com o ensaio YES para quantificação de atividade estrogênica total e avaliação qualitativa de atividade antiestrogênica.

Amostra	Coleta	Matriz	Descrição	Conc. Teste de E2 (ng L⁻¹)^a	Volume na EFS (mL)	Obs.	
L1	2019	Lixiviado bruto de aterro sanitário de RSU	Amostragem simples	-	-	NC	
L1-d4000			Amostragem simples, dopada (4 µg L ⁻¹ de E2)	200	-		
L2			Amostragem simples	-	-		
L2-d2000			Amostragem simples, dopada (2 µg L ⁻¹ de E2)	100	-		
L2-d134			Amostragem simples, dopada (134 ng L ⁻¹ de E2)	6,7	-		
L3			Amostragem simples	-	30	C, MP	
L4-d160			Amostragem simples, dopada (160 ng L ⁻¹ de E2)	400	-		
L5			Amostragem simples	-	-		
L5-d134			Amostragem simples, dopada (134 ng L ⁻¹ de E2)	100	-		
B1	Out/2021		Afluente de ETE	Amostragem simples	-	500	C, MP, AA
B2		-		-			
B3		-		-			
B4		-		-			
BC		Amostragem composta, 4 alíquotas, intervalos de 1 hora		-	-		
T1		Efluente de ETE		Amostragem simples	-	-	
T2				-	-		
T3				-	-		
T4				-	-		
TC				Amostragem composta, 4 alíquotas, intervalos de 1 hora	-	-	

^a Concentração adicional de E2 no poço mais concentrado; **EFS**: Extração em fase sólida; **NC**: Amostra analisada sem pré-concentração, com diluição em água ultrapura; **C**: Amostra concentrada por EFS com extrato diluído em etanol; **MP**: Extração do material particulado; **AA**: Avaliação de atividade antiestrogênica. Fonte: O autor, 2022.

As amostras de lixiviado apresentadas na Tabela 11 constituem uma mesma amostragem realizada em 2019, de modo que a numeração empregada objetiva diferenciar as diferentes alíquotas retiradas da amostra original. Além disso, os códigos utilizados para amostras dopadas indicam a concentração de E2 em ng L⁻¹ adicionada à amostra. Já as concentrações-teste estimadas para o ensaio YES foram calculadas a partir do fator de concentração final da amostra.

Amostras de afluente e efluente de ETE foram coletadas em um mesmo dia e a numeração empregada representa a ordem das amostragens, tendo sido iniciadas às 10:00 com intervalo de 1 hora entre elas. As alíquotas que compuseram amostras compostas BC e TC foram coletadas juntamente com as amostras simples.

3.3.2 Caracterização físico-química de amostras ambientais

Com o objetivo de subsidiar a investigação sobre a influência da matéria orgânica dissolvida e particulada na distribuição multifase da atividade estrogênica nas amostras ambientais estudadas, uma caracterização físico-química das amostras foi realizada em redundância com base em parâmetros relacionados a sólidos e constituintes orgânicos agregados, a saber: absorvância em 254 nm (Abs₂₅₄), carbono orgânico total (COT), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), substâncias húmicas aquáticas (SHA), sólidos suspensos totais (SST) e turbidez, de acordo com metodologias indicadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Metodologia dos parâmetros físico-químicos avaliados na caracterização das amostras ambientais.

Parâmetro	Metodologia	Referência
Absorvância UV Específica (SUVA ₂₅₄)	APHA 5910-B	APHA (2017)
Carbono Orgânico Total (COT)	APHA 5310-B	APHA (2017)
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)	APHA 5210-B	APHA (2017)
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	APHA 5220-D	APHA (2017)
Substâncias Húmicas Aquáticas (SHA)	Sheng modificado	ŠÍR <i>et al.</i> (2012)
Sólidos Suspensos Totais (SST)	APHA 2540-D	APHA (2017)
Turbidez	APHA 2130-B	APHA (2017)

Fonte: O autor, 2022.

O parâmetro SST foi avaliado para sólidos retidos nas membranas de poros 0,7 µm (fibra de vidro, Milipore) e 0,45 µm (nitrocelulose, Milipore). Para a medição do Carbono Orgânico Dissolvido (COD) e SHA, amostras foram filtradas com membrana de nitrocelulose (Ø0,45 µm). Devido a limitações do procedimento, apenas os sólidos retidos nas membranas de fibra de vidro (Ø0,7 µm) foram avaliados na medição do carbono orgânico particulado (COP).

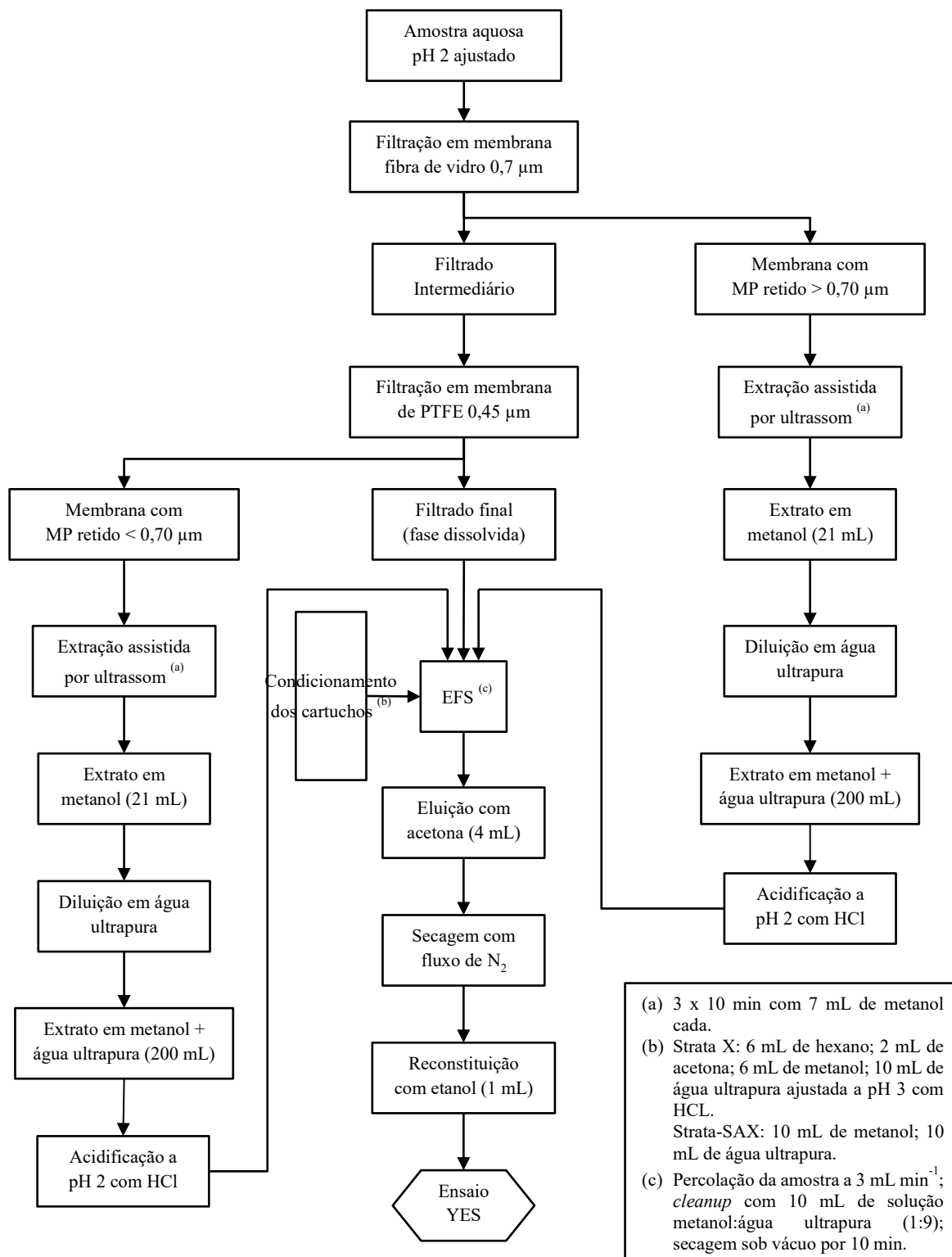
Com exceção da análise de DBO, que foi realizada no laboratório privado Oceanus para as amostras L1, BC e TC, todas as análises foram realizadas no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES/UERJ).

3.3.3 Preparo de amostras ambientais para o ensaio YES

Procedimentos de extração e concentração foram realizados para a avaliação da atividade estrogênica e antiestrogênica das fases dissolvida e particulada das amostras ambientais com o ensaio YES. Com exceção das amostras L1 e L2, as amostras foram submetidas ao protocolo implementado no LES/UERJ (ARGOLO *et al.*, 2021) ilustrado na Figura 16, consistindo:

- i) Filtração em membranas de fibra de vidro (0,7 µm, Merck) e de PTFE (0,45 µm, Merck), sucessivamente. Após a filtração, cada membrana foi transferida para um béquer de 250 mL previamente descontaminado.
- ii) Extração sólido-líquido assistida por ultrassom do material retido nas membranas. A cada béquer foram adicionados 7 mL de metanol (grau HPLC, Tedia), sendo coberto com papel alumínio e mantido em banho ultrassônico por 10 minutos. Ao final de cada um dos três ciclos, o extrato em metanol foi vertido para um balão volumétrico de 200 mL, o qual foi avolumado com água ultrapura. O extrato final diluído foi acidificado a pH 2 com HCL para prosseguimento na EFS.
- iii) Extração em fase sólida (EFS) das amostras filtradas e dos extratos das membranas, segundo procedimento descrito em 3.2.2.3. Para remoção de interferentes, a percolação dos lixiviados se deu com o cartucho Strata-SAX acoplado ao cartucho Strata X seguindo o protocolo de Gomes (2020). Após secagem, cartuchos Strata X foram armazenados em freezer a -20 °C até o momento da eluição.
- iv) Eluição dos analitos com 4 mL de acetona por gravidade, secagem com fluxo de nitrogênio e reconstituição do volume com 1 mL etanol.

Figura 16 – Fluxograma detalhado do protocolo de preparo de amostras para avaliação de atividade estrogênica e antiestrogênica das fases dissolvida e particulada de amostras ambientais.



MP: Material Particulado; EFS: Extração em Fase Sólida. Fonte: O autor, 2022.

3.3.4 Atividade estrogênica e antiestrogênica de amostras ambientais

A atividade estrogênica das frações dissolvida e particulada das amostras ambientais submetidas a EFS foi quantificada com o ensaio YES seguindo o protocolo padrão e processamento de dados descritos em 3.1. Para estas amostras, a atividade estrogênica total foi considerada como a soma dos Eq-E2 (ng L^{-1}) de cada fração da amostra analisada.

Amostras de lixiviado L1 e L2 foram submetidas ao ensaio YES sem etapa de pré-concentração, sendo utilizado o procedimento de amostras aquosas estabelecido por Gomes (2020), no qual:

- i) As curvas das amostras e do controle positivo E2 foram preparadas em placa de diluição com diluição seriada em água ultrapura;
- ii) 10 μL de cada diluição da amostra e do controle positivo E2 foram transferidos para placa de ensaio, com o arranjo apresentado na Figura 10. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo;
- iii) 190 μL de meio de análise foram adicionados a cada poço da placa de ensaio, que foi lacrada, homogeneizada e incubada a 32 °C por 72 horas até finalização do ensaio e análise dos resultados segundo o protocolo padrão.

A atividade antiestrogênica das frações das amostras de afluente e efluente de ETE foi avaliada qualitativamente de acordo com a metodologia proposta por Gomes (2020), que consistiu do procedimento padrão descrito em 3.1.4. porém com a adição de 10 μL de E2 na concentração 0,5448 $\mu\text{g L}^{-1}$ em todos os poços contendo diluição de amostra. Após completa evaporação nos poços, 200 μL de meio de análise foram adicionados e seguiu-se o procedimento padrão. Dessa forma, a concentração de E2 adicional em cada poço no ensaio foi de 27,24 ng L^{-1} .

Adicionalmente, 12 réplicas de E2 27,24 ng L^{-1} também foram avaliadas com o ensaio YES. Assim, a avaliação qualitativa da atividade antiestrogênica se deu a partir da comparação pelo teste t de Student ($p\text{-valor} = 0,05$) entre a curva dose-resposta da amostra adicionada da concentração de E2 e a resposta média de absorbância corrigida de E2 27,24 ng L^{-1} , havendo 2 comportamentos característicos:

- i) O decréscimo da absorbância corrigida nas maiores concentrações da amostra indica atividade antiestrogênica, exceto quando na ocorrência de citotoxicidade;
- ii) O aumento da absorbância corrigida indica a presença de substâncias estrogênicas na amostra.

3.3.5 Análise estatística global dos resultados

De modo a avaliar de forma global os resultados obtidos para as amostras ambientais, foi empregada a Análise de Componentes Principais (ACP) com o software Sigmaplot. Foram selecionadas as variáveis Turbidez, SST, COD, DQO, Abs254, SHA, SUVA e Eq-E2 total, além dos percentuais de carbono orgânico nos SST (%CO-SST) e de atividade estrogênica associada aos SST (%Eq-E2-SST), utilizando os resultados obtidos para as amostras de lixiviado, afluyente e efluente de ETE.

Também foram adicionadas as variáveis citotoxicidade máxima (Citotox) e percentuais de atividade antiestrogênica associada as fases dissolvida e particulada (%AE-diss e %AE-SST), que foi quantificada em termos do percentual máximo de redução da absorvância corrigida do E2 24,48 ng L⁻¹ induzida pela fração da amostra. Esta segunda análise foi realizada apenas com as amostras de afluyente e efluente de ETE.

Inicialmente, a matriz de correlação de Pearson (ρ) entre as variáveis foi calculada e, em seguida, foram obtidos os autovalores da matriz de correlação. Para a primeira análise foram utilizados dois fatores (PC1 e PC2), que combinados explicaram 91,3 % da variância total das variáveis. Para a segunda análise foram utilizados quatro fatores (PC1, PC2, PC3 e PC4), que acumularam 88,2 % da variância total. Os autovetores da matriz de correlação foram calculados e, por fim, foram obtidas as cargas fatoriais.

O resultado da análise de componentes principais foi interpretado com base no mapa das cargas fatoriais (*component loading*), para avaliação das correlações entre as variáveis, e no gráfico de pontuações dos fatores (*component score*) para avaliação da distribuição das amostras.

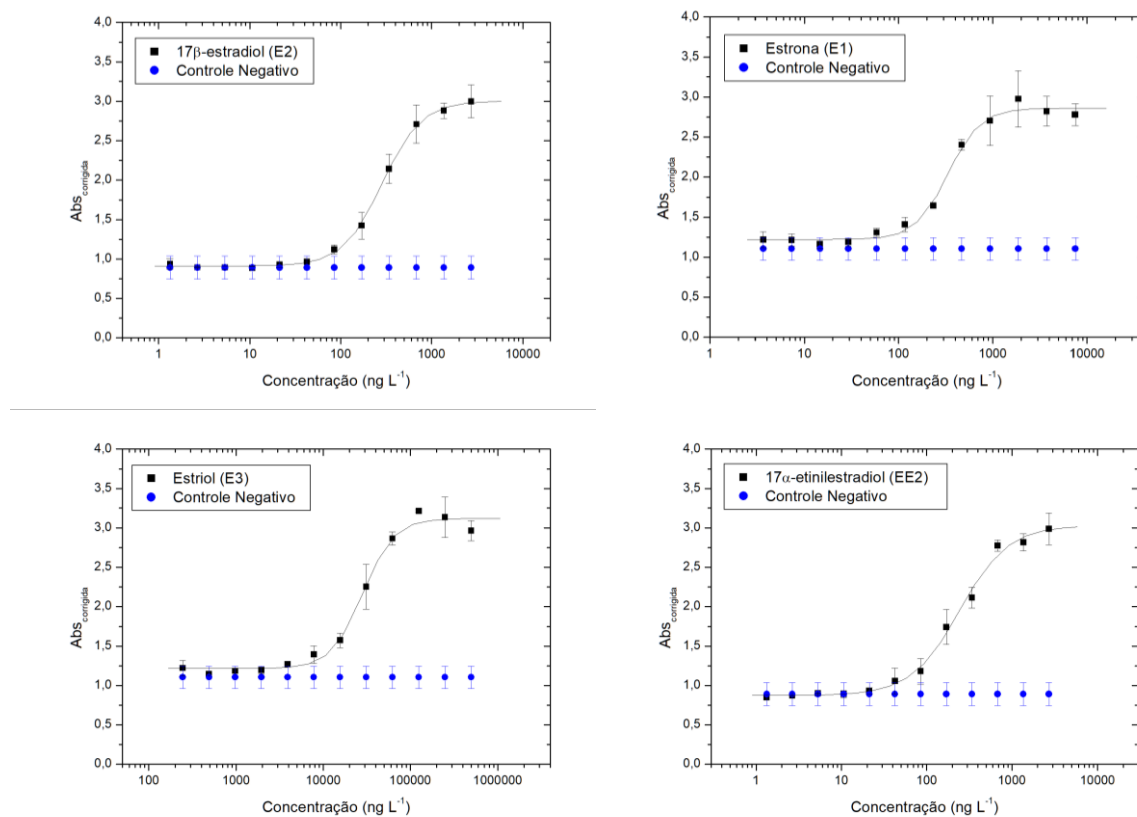
4. RESULTADOS

4.1 Etapa 1: Ensaios com substâncias simples

4.1.1 Análise de misturas binárias de estrogênios

Neste estudo, foram avaliados os efeitos de misturas binárias dos estrogênios 17β -estradiol (E2), 17α -etinilestradiol (EE2), estrona (E1) e estriol (E3) em termos de indução do receptor de estrogênio por meio do ensaio de YES. Para tanto, inicialmente foram avaliadas as curvas dose-resposta das monossoluções para obtenção das concentrações de efeito mediano (CE50). As curvas dose-respostas são apresentadas na Figura 17 e os respectivos parâmetros estão apresentados na Tabela 13.

Figura 17 – Curvas dose-resposta dos estrogênios 17β -estradiol (E2), estrona (E1), estriol (E3) e 17α -etinilestradiol (EE2).



Fonte: O autor, 2022.

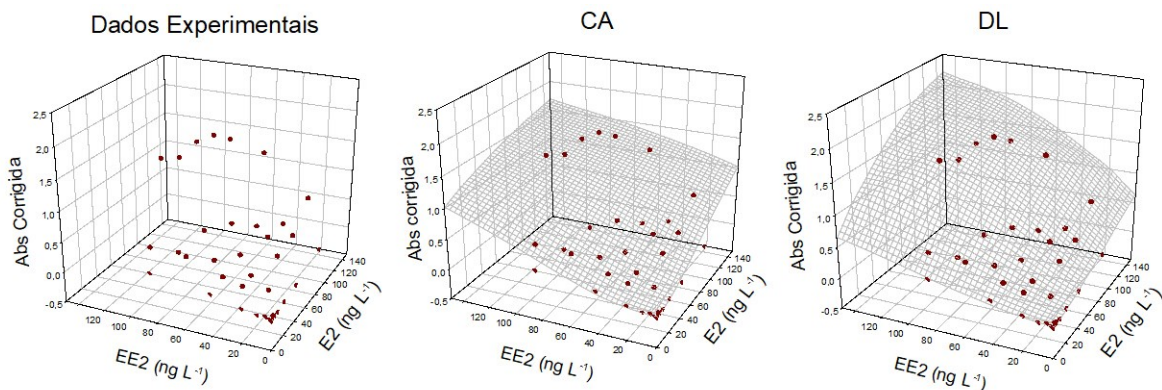
Tabela 13 – Parâmetros das curvas dose-resposta obtidas para os compostos estrogênicos utilizados nas misturas binárias.

Composto	EC50 (ng L ⁻¹)	mín.	máx.	$\mu_{\text{máx}}$	p	PR
17 β -estradiol (E2)	191,6	1,0069	2,7532	1,7463	2,347	1
17 α -etinilestradiol (EE2)	102,9	0,9886	2,8378	1,8492	2,071	1,862
Estrona (E1)	289,1	0,9057	2,9787	2,073	1,619	0,663
Estriol (E3)	12252	0,8772	2,9217	2,0445	3,079	0,016

EC50: Concentração de efeito mediano; **mín.:** Absorbância corrigida mínima; **máx.:** Absorbância corrigida máxima; **$\mu_{\text{máx}}$:** Absorbância corrigida máxima subtraída da absorbância corrigida mínima; **p:** Inclinação da curva dose-resposta; **PR:** Potência relativa. Fonte: O autor, 2022.

Em seguida, foi aplicado o desenho experimental de proporção fixa parcial. Utilizando-se os valores de CE50 obtidos de cada curva dose resposta, foram calculadas as 23 combinações de concentrações-teste a partir das forças tóxicas 0,375; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 1,75 e 2,0, o que possibilitou a análise de uma ampla superfície de respostas em absorbância corrigida. Utilizando a ferramenta MIXTOX, que aplica a formulação de Jonker *et al.* (2005), dados experimentais foram ajustados a um modelo de referência de adição de concentração (CA) e a um modelo de sinergismo/antagonismo (S/A), posteriormente estendido a um desvio dependente da proporção da dose (DR) e do nível da dose (DL). A exemplo, a Figura 18 demonstra os dados experimentais das misturas de E2+EE2 e as superfícies dos modelos obtidos.

Figura 18 – Dados experimentais e superfícies de respostas em absorbância corrigida dos modelos de adição de concentração (CA) e de sinergismo dependente do nível da dose (DL) para a mistura E2+EE2 avaliada com o ensaio YES.



Fonte: O autor, 2022.

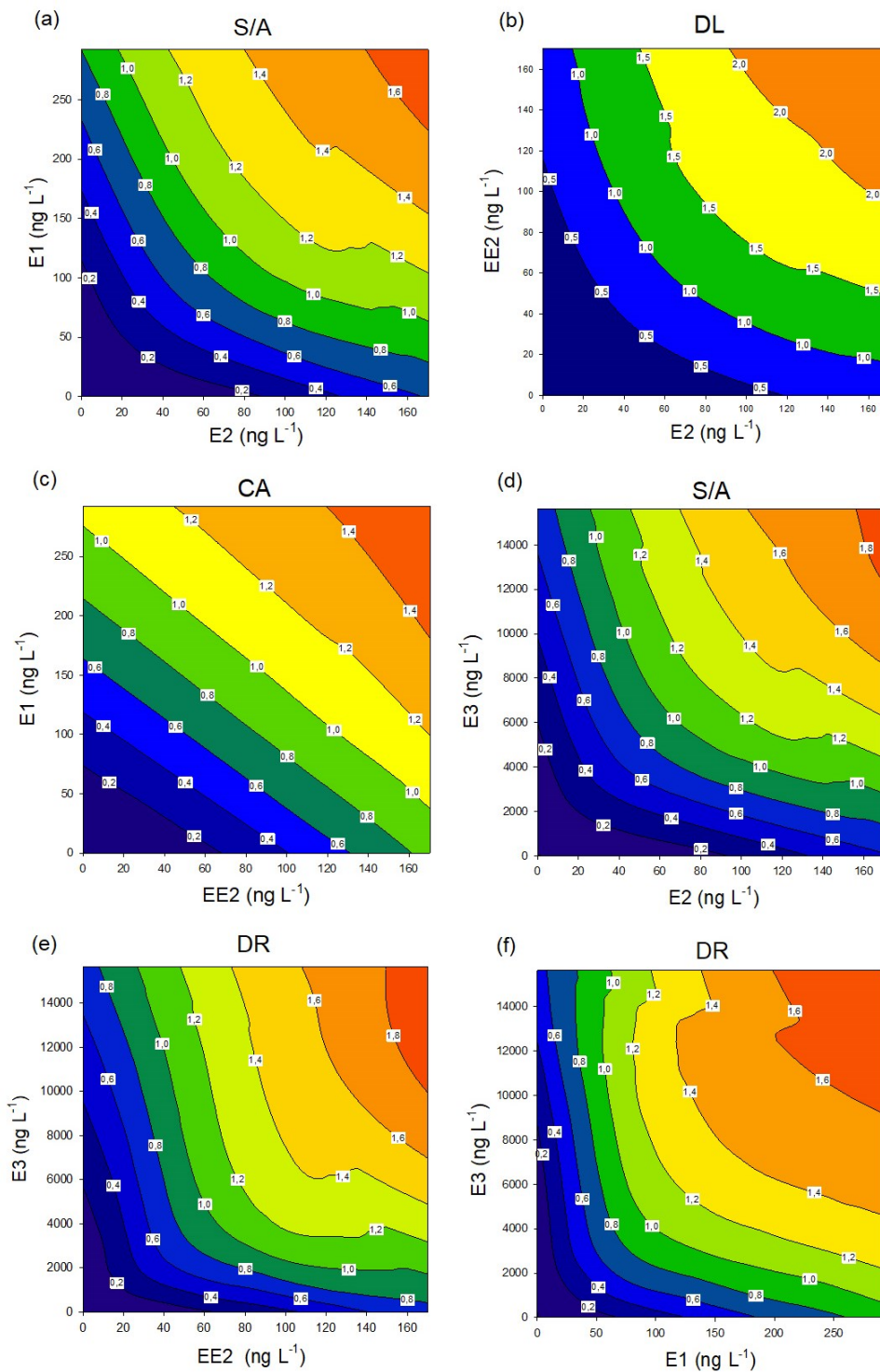
A síntese dos parâmetros da análise de misturas é apresentada na Tabela 14 e as representações gráficas em isobogramas dos modelos mais significativos para as misturas avaliadas são apresentadas na Figura 19 e as superfícies destes modelos são apresentadas no APÊNDICE 1.

Tabela 14 – Síntese da análise de misturas binárias de estrogênios com o ensaio in vitro YES. Valores em negrito representam o modelo mais significativo para a mistura.

Mistura	Modelo	$\mu_{\text{máx}}$	β_1	β_2	CE50 ₁	CE50 ₂	<i>a</i>	<i>b</i>	SS	<i>r</i> ²	<i>p</i> (<i>r</i> ²)
E2+E1	CA	1,882454	-1,87845	-1,95175	178,3061	267,67	-	-	0,978879	0,948697	-
	S/A	1,909409	-2,14282	-1,92244	241,2692	350,6614	-1,75577	-	0,547085	0,971327	1,26E-07
	DR	1,906623	-2,23848	-1,90983	243,7168	340,1362	-1,30753	-0,97751	0,537382	0,971836	0,354029
	DL	1,911993	-2,11684	-1,87812	241,2491	352,5375	-1,62992	-0,11223	0,546621	0,971352	0,840103
E2+EE2	CA	1,949932	-1,85697	-2,13058	140,0906	140,3998	-	-	2,373311	0,89409	-
	S/A	2,089439	-1,94193	-2,05179	263,2162	229,7137	-2,81881	-	1,168347	0,947862	5,46E-09
	DR	2,083236	-2,08278	-1,94896	263,4886	225,2369	-1,86823	-1,91451	1,119153	0,950057	0,150726
	DL	2,127239	-1,53996	-1,59997	258,9899	248,8867	-0,05522	-97,7715	0,973234	0,956569	0,003061
EE2+E1	CA	1,862742	-2,14151	-1,7118	183,6524	253,5495	-	-	1,271008	0,93346	-
	S/A	1,875881	-2,22042	-1,73809	205,8538	292,1136	-0,80994	-	1,188944	0,937756	0,073469
E2+E3	CA	2,002578	-1,96661	-1,51711	182,9222	14259,91	-	-	2,234484	0,898041	-
	S/A	2,077439	-2,18993	-1,61557	261,9554	23973,09	-2,49465	-	1,329472	0,939336	5,97E-07
	DR	2,06835	-2,07651	-1,6829	255,7146	23973,18	-3,10216	1,324196	1,3112	0,94017	0,41505
	DL	2,103898	-1,84006	-1,35656	272,4045	23973,07	-0,56234	-6,09638	1,228173	0,943959	0,051124
EE2+E3	CA	1,990959	-1,46338	-1,68112	122,6125	16870,53	-	-	2,367502	0,889539	-
	S/A	2,068569	-1,53358	-1,7367	224,4717	23877,41	-2,61725	-	1,537965	0,928243	5,35E-06
	DR	2,084802	-1,73319	-1,55984	242,5249	23877,2	-1,06071	-3,57112	1,397852	0,93478	0,03225
	DL	2,068366	-1,49866	-1,69781	222,0944	23877,45	-2,33519	-0,19102	1,535663	0,92835	0,788581
E1+E3	CA	1,907378	-1,35619	-1,91484	169,5205	17045,83	-	-	3,141136	0,849456	-
	S/A	1,878393	-1,63934	-1,75447	321,7152	17046,89	-2,60912	-	2,165737	0,896203	2,39E-05
	DR	1,968225	-1,33498	-2,04334	345,2043	25469,46	-2,09527	-2,34814	1,876239	0,910078	0,00868
	DL	1,99184	-1,20599	-1,98413	349,6745	25480,25	-2,69457	-0,38963	1,92685	0,907652	0,017859

$\mu_{\text{máx}}$: Absorbância corrigida máxima subtraída da absorbância corrigida mínima; $\beta_{1(2)}$: inclinação da curva dose-resposta em mistura da primeira(segunda) substância; CE50₁₍₂₎: concentração de efeito mediano em mistura da primeira(segunda) substância; *a* e *b*: parâmetros da função de desvio do modelo de referência; SS: soma residual dos quadrados; *r*²: coeficiente de determinação; *p*(*r*²): resultado da razão do teste de verossimilhança; CA: modelo de referência de adição de concentração; S/A: modelo de sinergismo/antagonismo; DR: modelo de desvio dependente da proporção da dose; DL: modelo de desvio dependente do nível da dose. Fonte: O autor, 2022.

Figura 19 – Isobologramas de absorvância corrigida dos modelos mais significativos da análise de misturas binárias de estrogênios avaliadas com o ensaio YES.



(a) Modelo de sinergismo para a mistura E2+E1; (b) Modelo de sinergismo dependente do nível da dose para a mistura E2+EE2; (c) Modelo de adição de concentração para a mistura EE2+E1; (d) Modelo de sinergismo para a mistura E2+E3; (e) Modelo de sinergismo dependente da proporção da dose para a mistura EE2+E3; (f) Modelo de sinergismo dependente da razão da dose para a mistura E1+E3. Fonte: O autor, 2022.

Observa-se, a partir dos dados da Tabela 14, que o ajuste do modelo de referência tende a aumentar após as extensões, o que decorre da adição dos parâmetros a e b à equação. Assim, estendendo-se os modelos na ordem $CA > S/A > DR$ e DL , a soma residual dos quadrados (SS) tende a diminuir e o coeficiente de determinação (r^2) tende a aumentar. Contudo, esse aprimoramento tem a sua significância testada por máxima verossimilhança, representada no valor $p(r^2)$. Dessa forma, foram adotados como modelos mais representativos de cada mistura os que possuem menor SS , maior r^2 e $p(r^2) < 0,05$.

Os resultados das misturas apresentaram, em geral, um desvio significativo em relação ao modelo de referência CA , o que indica efeito maior que aditivo ou sinergismo nas condições do ensaio. Para todas misturas binárias avaliadas, com exceção da mistura $EE2+E1$, o modelo de sinergismo (S/A), sinergismo dependente da proporção da dose (DR) ou sinergismo dependente do nível da dose (DL) foi o modelo mais significativo, com r^2 na faixa de 0,910 a 0,971 e SS na faixa de 0,547 a 1,876.

As concavidades para cima observadas nas isobologramas da Figura 19, com exceção da mistura $EE2+E1$ (Figura 19.c), evidenciam o efeito de sinergismo extraídos da modelagem aplicada. Além disso, interpretando-se os parâmetros da Tabela 14 com as definições da Tabela 4, tem-se os seguintes padrões: (i) a mistura $E2+E1$ apresentou sinergismo de magnitude uniforme na superfície de resposta; (ii) as misturas $E2+EE2$ e $E2+E3$ apresentaram sinergismo com maior magnitude em baixos níveis de dose; (iii) as misturas $EE2+E3$ e $E1+E3$ apresentaram sinergismo quando o efeito foi principalmente causado pelo $EE2$ ou $E1$, isto é, quando as concentrações de $EE2$ e $E1$ foram superiores às concentrações equipotenciais de $E3$.

A avaliação dos resultados obtidos no presente estudo demonstra que as interações entre as substâncias estrogênicas foram majoritariamente observadas nas menores combinações de concentrações. Dessa mesma região são derivados os limites de detecção e de quantificação do ensaio YES a partir da curva dose-resposta de substâncias simples, bem como é calculada a atividade estrogênica de amostras ambientais em termos de equivalente-estradiol. Isso sugere que o sinergismo pode estar recorrentemente presente em resultados de atividade estrogênica avaliados com o ensaio YES para amostras ambientais cujo potencial estrogênico é principalmente devido a estrogênios, como esgotos domésticos (ČERNÁ *et al.*, 2022).

Por exemplo, supõe-se uma amostra ambiental contendo $2,8 \text{ ng L}^{-1}$ de $E2$, $0,8 \text{ ng L}^{-1}$ de $EE2$ e que todos os outros constituintes conferem desprezível contribuição à atividade estrogênica final da amostra. Supõe-se também a mesma curva padrão de $E2$ utilizada para o ensaio de misturas, com limite de detecção de 46 ng L^{-1} , e a potência relativa (PR_i) obtida para

o EE2 (Tabela 13). Considerando uma abordagem aditiva pelo fator de equivalência tóxica (TEF) para as concentrações ambientais (C_i), a atividade estrogênica resultante é dada por

$$Eq-E2 = C_{E2} + (C_{EE2} \times PR_{EE2}) = 2,8 + (0,8 \times 1,8) = 4,24 \text{ ng L}^{-1}$$

Contudo, tal efeito é menor do que o limite de detecção e não seria alcançado sem uma etapa de concentração de amostra, como a extração em fase sólida (SPE). Considerando um fator de concentração final no ensaio igual a 25, as concentrações *in vitro* passariam a 70 ng L⁻¹ e 20 ng L⁻¹ para E2 e EE2, respectivamente, enquanto o limite de detecção do ensaio seria reduzido a 1,84 ng L⁻¹ após divisão pelo FC. Com base nos parâmetros obtidos para o modelo DL da mistura binária E2+EE2 (Tabela 14) e da isoblograma resultante (Figura 19.b), tem-se que a absorbância corrigida da mistura (y) seria de aproximadamente 0,5. Portanto, a atividade estrogênica em Eq-E2 esperada para a mistura calculada com as Equações 5 e 6 seria igual a

$$EQ-E2 = \frac{CE50}{\left(\frac{\mu_{max}}{y} - 1\right)^{1/p}} \times \frac{1}{FC} = \frac{191,6}{\left(\frac{1,7463}{0,5} - 1\right)^{1/2,347}} \times \frac{1}{25} = 5,19 \text{ ng L}^{-1}$$

O ensaio *in vitro* estaria quantificando o efeito sinérgico da amostra concentrada, o que pode ou não ocorrer nos níveis da concentração ambiental, uma vez que tal combinação de doses não foi avaliada pelo modelo matemático por situarem-se abaixo do limite de detecção do ensaio. Desta forma, o ensaio YES poderia ser conservador na quantificação da atividade estrogênica de amostras ambientais que, submetidas a um processo de extração e quantificação, teriam seu potencial estrogênico aumentado a ponto de verificar-se um efeito sinérgico.

A avaliação da atividade estrogênica de misturas de substâncias tem sido um tópico de interesse na literatura. Nesse sentido, a abordagem padrão de desenho experimental para essa análise tem sido a diluição com razão fixa das substâncias na mistura, baseando-se as concentrações no efeito biológico conhecido das substâncias ou em concentrações ambientalmente relevantes, isto é, usualmente medidas em matrizes ambientais (GÓMEZ *et al.*, 2021; SKLEDAR e MAŠIČ, 2020; YU *et al.*, 2019; YUAN *et al.*, 2018). Experimentos com essa abordagem tipicamente apoiam a teoria de aditividade química, apesar de apenas produzirem uma relação dose-resposta específica da proporção das substâncias utilizada na mistura (SHAPPELL, 2018).

A exemplo, Ezechiáš e Cajthaml (2016) analisaram a atividade estrogênica por diluição de razão fixa de misturas de E2, EE2 e dos agonistas parciais bisfenol-A (BPA) e metoxicloro (MET) com os ensaios YES e CXCL12/SDF1. Utilizando os modelos matemáticos de adição de concentração geral, fator de equivalência tóxica (TEF) e *full logistic model* (FLM), os autores com frequência observaram valores de CE50 usualmente menores do que os preditos pelos modelos, porém sem diferença significativa.

Ramirez *et al.* (2014) também avaliaram, com o ensaio YES, misturas binárias de BPA, do fitoestrogênio genisteína e do androgênio trembolona, que exibe efeito estrogênico *in vitro*, e os resultados não desviaram da aditividade esperada.

Ademais, Hamid *et al.* (2021) concluíram em sua revisão que o desenho experimental e a seleção das concentrações são os dois parâmetros mais importantes em estudos sobre toxicidade de misturas, embora as concentrações utilizadas não sejam claramente reportadas em alguns trabalhos. Portanto, no âmbito dos trabalhos que não encontraram desvio em relação ao modelo de adição de concentração, algumas observações sobre as faixas de concentração podem ser realizadas.

Na análise de mistura de estrogênios, alquilfenóis e ftalatos realizada por Yu *et al.* (2019) com o ensaio YES, efeitos aditivos foram reportados e um modelo de resposta de interação (IR) produziu uma melhor predição dos efeitos do que o modelo CA. Contudo, em baixas concentrações, ambos os modelos subestimaram a resposta obtida no ensaio. Além disso, foi confirmado o efeito “*something from nothing*”, quando a mistura de compostos em concentrações que não induzem efeito produz um aumento na resposta observada. Todavia, os autores reportaram que a adição de EE2 não aumentou significativamente a atividade estrogênica de uma mistura de outros 10 compostos.

De modo semelhante, Yuan *et al.* (2018) avaliaram misturas de estrogênios com o ensaio de proliferação de células MCF-7 e concluíram que os compostos estrogênicos agiram de forma aditiva. Porém, em baixas concentrações ambientalmente relevantes, o efeito de proliferação de células foi aumentado.

Para além dos desenhos experimentais e das concentrações definidas para os compostos avaliados, o tipo do ensaio também deve ser considerado. No estudo de Kunz *et al.* (2017), duas misturas de estrogênios (E2, EE2, E1) e BPA foram submetidas aos ensaios *in vitro* YES, ER α -CALUX, MELN, T47D-KBluc e GeneBLAzer-Er α . Foram reportados resultados intradiários e entre dias, nos quais os ensaios ER α -CALUX, MELN, T47D-KBluc quantificaram uma faixa de 77% a 136% de um valor de Eq-E2 nominal calculado por TEF, enquanto os ensaios YES e GeneBLAzer-Er α tenderam a subestimar o valor nominal calculado. Contudo, os autores

indicaram uma dificuldade na interpretação desses dados, uma vez que o Eq-E2 nominal calculado por TEF com potência relativa é associado a incertezas e não é acurado. De fato, tal abordagem só é válida quando os valores máximos e as inclinações das curvas dose-resposta de todos os constituintes da mistura são iguais (SAFE, 1998).

Tal incerteza é, de certa forma, corroborada por um estudo mais recente, no qual Gómez *et al.* (2021), também por TEF, reportaram efeito aditivo para mistura de E2, EE2 e E1 avaliada com os ensaios ER α -CALUX, MELN, LYES e LiBERA, mas indicaram possível sinergismo nos resultados obtidos com os ensaios ER α -CALUX, hER α -HeLa9903 e MELN.

Ademais, o mecanismo de ação aplicado em cada ensaio pode resultar em uma resposta final diferente para a mesma mistura de substâncias, uma vez que cada composto estrogênico possui avidéz específica para determinado receptor (YUAN *et al.*, 2018). Disso resulta que o modelo matemático mais aplicável para avaliar a mistura dependerá tanto das substâncias investigadas quanto do ensaio utilizado. A exemplo, para o ensaio de proliferação de células E-screen, o modelo aditivo de ação independente (IA) foi mais preditivo do que o CA, que por sua vez foi considerado mais adequado para o YES (YUAN *et al.*, 2018).

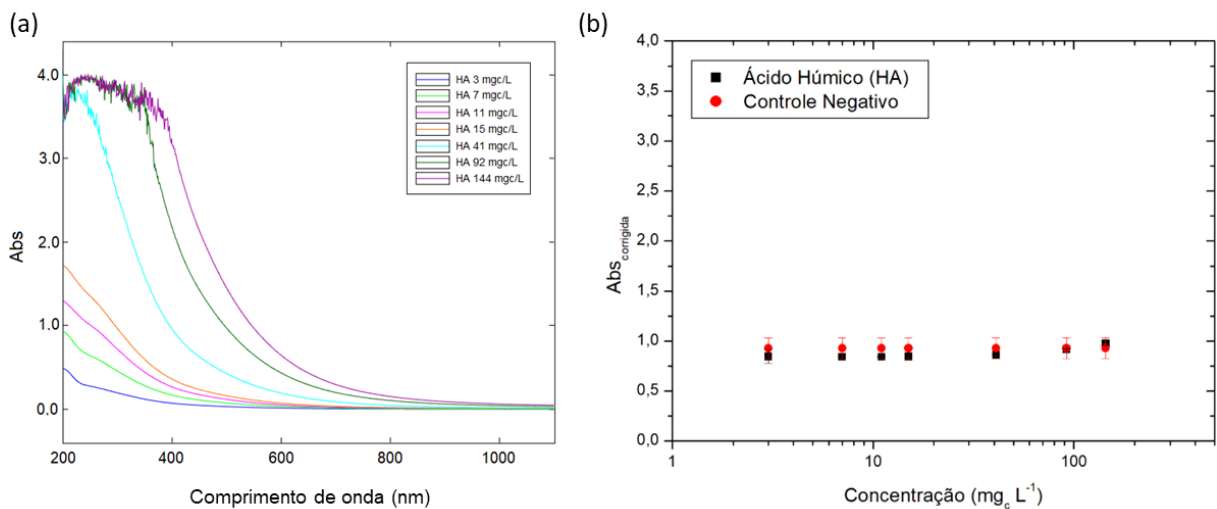
Os resultados deste estudo somam-se ao conhecimento existente sobre a avaliação de atividade estrogênica de misturas, evidenciando a importância dos fatores faixa de concentração, desenho experimental, tipo de substância e mecanismo de ação do ensaio. Ainda assim, trabalhos futuros podem se aproximar das condições ambientais, seja na aplicação do desenho experimental de proporção fixa parcial para misturas mais complexas que a binária, seja na realização de ensaios *in vivo*, os quais consideram as fases toxicocinética e a toxicodinâmica no organismo-teste.

No tocante ao monitoramento ambiental e à determinação de padrões de qualidade ambiental, a existência de sinergismo para misturas de substâncias estrogênicas em alguns ensaios sugere que: i) os valores de concentração limite definidos por futuras legislações devem considerar a eventualidade de sinergismo entre as substâncias, ii) o efeito de misturas das substâncias prioritárias deve ser conhecido nos diferentes bioensaios que componham a rotina de monitoramento de matrizes ambientais e iii) a depender da condição de poluição ambiental, uma redundância de avaliação de atividade estrogênica utilizando bioensaios com mecanismos de ação distintos pode ser aplicada, como proposto por Gómez *et al.* (2021).

4.1.2 Avaliação da influência da matéria orgânica dissolvida

Com o objetivo de avaliar a influência da matéria orgânica dissolvida na quantificação da atividade estrogênica, misturas de ácido húmico (HA) e 17 β -estradiol (E2) foram submetidas ao ensaio *in vitro* YES. Para descartar eventual efeito estrogênico natural do HA ou inadequação da metodologia do ensaio para amostras ricas em HA, foi realizada uma varredura de absorvância da solução de HA e as concentrações experimentais de HA nas misturas foram avaliadas individualmente com o ensaio YES. Os resultados são apresentados na Figura 20.

Figura 20 – Pré-investigação da resposta das concentrações de solução de ácido húmico (HA) de 3 – 144 mg_c L⁻¹ em valores absorvância.



(a) Espectro de absorvância de 200 a 1100 nm das concentrações de HA; (b) Absorvância corrigida das concentrações experimentais de HA (3 – 144 mg_c L⁻¹) avaliadas com o ensaio YES. Fonte: O autor, 2022.

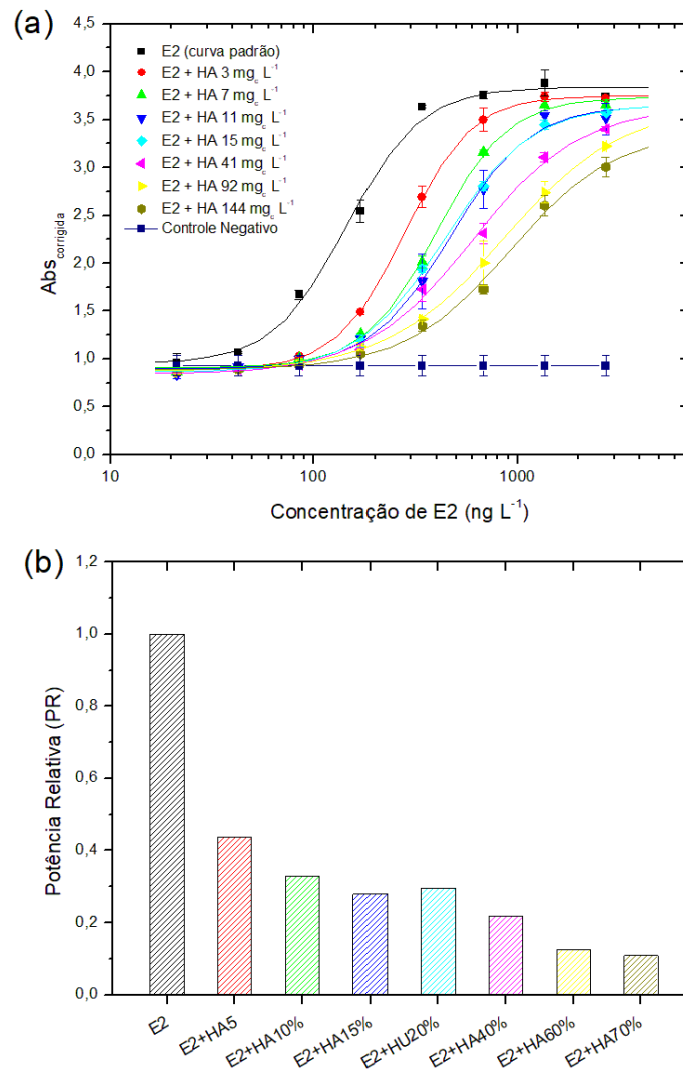
A análise dos resultados desta pré-investigação demonstra que as soluções de HA têm aumento nos valores de absorvância nos menores comprimentos de onda (Figura 20.a), o que já era esperado uma vez que a medida da absorvância em 254 nm é um parâmetro relacionado a aromaticidade de matéria orgânica dissolvida. Ademais, Bai *et al.* (2019) reportaram perfil semelhante para HA adquirido da Sino-Pharm e um perfil mais acentuado para MOD derivada de lagos e sedimentos da China.

As concentrações de HA avaliadas com o ensaio YES não apresentaram resposta de absorvância corrigida superior ao controle negativo (Figura 20.b) e, portanto, não elucidaram atividade estrogênica segundo a metodologia do ensaio. Contudo, houve aparente efeito dose-resposta nos valores de absorvância corrigida obtidos, o que pode ser decorrente da variação das absorvâncias em 575 nm e 620 nm com o aumento da concentração de HA a partir de 100 mg_c L⁻¹.

Portanto, para mitigar a variação da resposta entre as diferentes concentrações de HA na análise de misturas de E2 e HA e avaliar apenas o efeito da interação entre as substâncias, os resultados de absorbância corrigida apresentados nesta seção foram calculados de acordo com a Equação 16, que desconta a absorbância corrigida obtida para a mistura avaliada com o meio branco (sem levedura).

A Figura 21 apresenta os resultados das misturas de E2 e HA avaliadas com o ensaio YES aplicando o desenho experimental de Schild modificado com 7 concentrações de HA previstas de sorverem de 5 a 70 % do E2 dissolvido disponível, de acordo com a Equação 15.

Figura 21 – Resultados da análise de misturas de 17 β -estradiol (E2) e ácido húmico (HA) avaliadas com o ensaio YES aplicando o método de Schild modificado.



(a) Curvas dose-resposta de 17 β -estradiol (21,28 – 2724 ng L⁻¹) misturadas com 7 concentrações de ácido húmico (HA) de 3 – 144 mg_e L⁻¹ previstas de se ligarem a 5 – 70 % do E2 dissolvido. Barras de erro indicam desvio padrão (n = 3); (b) Potências relativas calculadas para as curvas dose-resposta da Figura 19.a. Fonte: O autor, 2022.

A partir da Figura 21.a apreende-se que as concentrações de HA avaliadas moveram a curva dose-resposta do E2 para a direita, aumentando o valor de EC50, além de diminuir a resposta máxima do E2 em termos de absorvância corrigida. Segundo a abordagem de Schild, tal configuração indica um efeito antagonista causado sem interação com o sítio de ligação do receptor (SCHILD, 1949) ou um antagonismo aparente.

Os resultados obtidos apoiam a premissa de que a interação entre HA e E2 formam um complexo que impede o estrogênio se ligar ao receptor e elucidar uma resposta no ensaio com receptor de estrogênio, isto é, o HA reduz a biodisponibilidade do E2 no ensaio. O fenômeno decorre do fato de o grupamento hidroxila, localizado na posição C-3 do anel aromático do E2, ter um papel fundamental tanto para a interação com o HA quanto para a ligação com o receptor de estrogênio (BEDARD *et al.*, 2014; ITZEL *et al.*, 2019).

Neale *et al.* (2015) realizaram experimento semelhante com HA e ácido fúlvico (FA) comerciais utilizando o ensaio GeneBLAzer[®] ER α -UAS-bla, que avalia a estrogenicidade das amostras por meio de fluorescência. Os autores reportaram que as concentrações de HA induziram pequenas mudanças na curva dose-resposta do E2, além de redução da resposta máxima. O aumento dos valores de EC50 foi relacionado a sorção de E2 à MOD e consequente redução da biodisponibilidade. Contudo, os resultados obtidos não foram dose-dependentes, de modo que os autores não indicaram as substâncias húmicas como antagonistas não-competitivos.

No presente estudo por outro lado, as concentrações experimentais de HA previstas de sorverem de 5 % a 70 % do E2 disponível foram responsáveis pela redução da potência relativa do E2 na faixa de 0,44 – 0,11 (Figura 21.b). Paralelamente a uma maior sensibilidade do ensaio YES ao efeito antagonista do HA, isto sugere que um outro fator, além do fenômeno da sorção, pode ter contribuído para a redução da atividade estrogênica.

Nesse sentido, o HA pode ter interferido na hidrólise do substrato cromogênico CPRG a partir de inibição da enzima β -galactosidase, uma vez que substâncias húmicas são reportadas como inibidores de processos enzimáticos hidrolíticos (JAHNEL e FRIMMEL, 1994; LI *et al.*, 2021). Assim, ainda que parte do estradiol não complexado se ligasse ao receptor de estrogênio e induzisse a produção de β -galactosidase, a enzima não seria capaz de degradar o CPRG em CPR. Disto resultaria uma absorvância corrigida reduzida e, conseqüentemente, uma redução aparente da estrogenicidade da amostra.

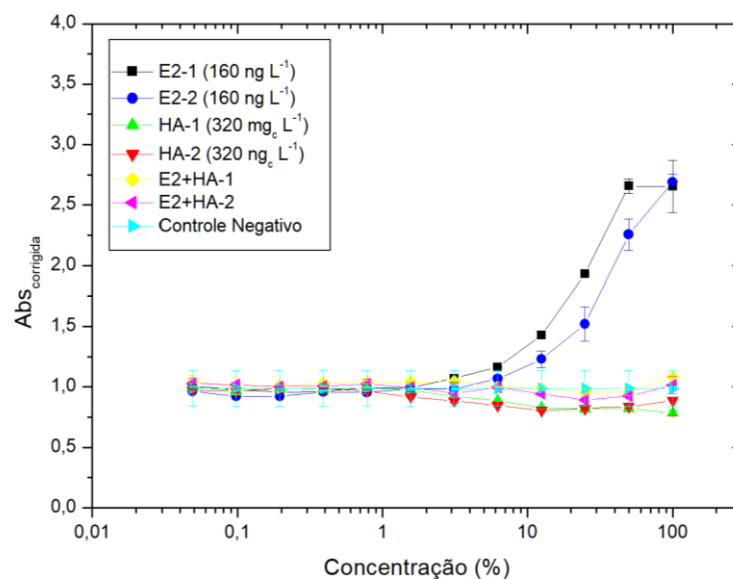
Outrossim, Bai *et al.* (2019) avaliaram a complexação de EE2 por MOD via equilíbrio de diálise e alcançaram valores de 68% a 93% de redução da concentração de EE2 dissolvido livre, sendo a maior redução reportada para HA comercial.

Outros autores também observaram a inibição da resposta biológica induzida por estrogênios com diferentes tipos de MOD (BEDARD *et al.*, 2014; KOVACEVIC *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2011; MA e YATES, 2018), o que foi explicado por afinidade de sorção e redução da biodisponibilidade no ensaio *in vitro*. Contudo, o aumento da atividade estrogênica (CHEN *et al.*, 2012; ROSENMAI *et al.*, 2018; YOO *et al.*, 2019) e a inalteração da resposta biológica (ALSOP e WILSON, 2019) também foram reportados na literatura.

Tal fato se deve às diferentes concentrações utilizadas e características das frações de matéria orgânica avaliada. A exemplo, frações hidrofóbicas de águas superficiais ou efluentes podem conter desreguladores endócrinos que serão co-extraídos na resina XAD-8, conferindo bioatividade ao produto final. Portanto, resultados com substâncias de referência como HA não devem ser diretamente extrapolados para matéria orgânica natural e amostras ambientais.

Outro fator a ser considerado no âmbito de amostras ambientais é a extração em fase sólida. Desse modo, as etapas de acidificação e eluição poderiam interferir na concentração de substâncias húmicas no extrato da amostra, uma vez que o HA possui baixíssima solubilidade em pH ácido e em etanol. Para verificar se o efeito antagonista observado nas soluções aquosas seria relevante no ensaio com extratos etanólicos, amostras sintéticas contendo HA e E2 foram preparadas, submetidas a extração em fase sólida (EFS) e avaliadas com o ensaio YES. As curvas das amostras são apresentadas na Figura 22.

Figura 22 – Curvas dose-resposta das duplicatas 1 e 2 das soluções de 17β -estradiol (E2) e ácido húmico (HA) e mistura submetidas a extração em fase sólida e avaliadas com o ensaio YES.



Fonte: O autor, 2022.

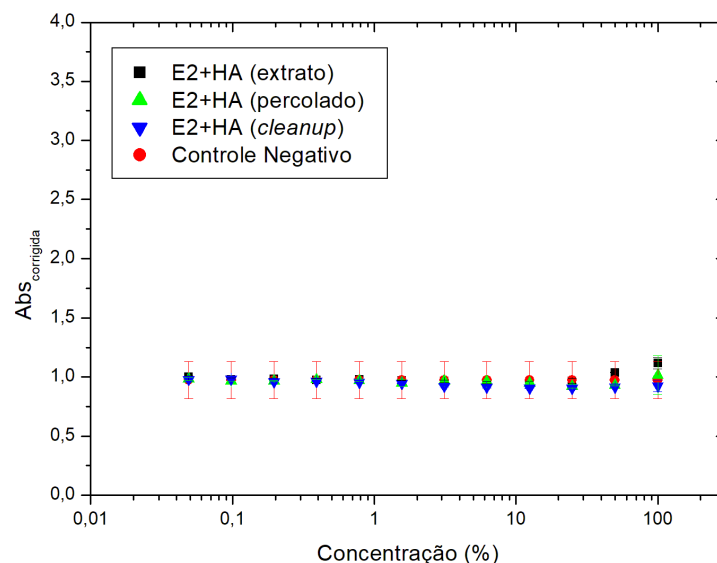
Os resultados obtidos indicaram que as soluções sintéticas contendo E2 e HA não elucidaram absorvância corrigida superior ao controle negativo (Figura 22), não obstante a concentração de E2 de aproximadamente 200 ng L⁻¹. Isto sugere que o mesmo efeito observado nos ensaios com as soluções aquosas possa ocorrer com extratos de amostras ambientais.

As eficiências de extração de HA na concentração nominal de 320 mg_c L⁻¹ com o cartucho Strata-X em termos de carbono orgânico dissolvido foram de 36% e 55%, o que indica que até metade da matéria orgânica hidrofóbica dissolvida em amostras ambientais pode ser concentrada nos extratos finais e submetida ao bioensaio. As eficiências obtidas neste estudo assemelham-se àquelas reportadas por Neale e Escher (2014) que obtiveram a faixa de 40% a 70% de recuperação de COD com o cartucho Oasis HLB.

Considerando as eficiências de 36% e 55% para HA, tem-se que a concentração estimada de MOD nos extratos das amostras sintéticas foi de 144 mg_c L⁻¹ a 220 mg_c L⁻¹. Dessa forma, os resultados obtidos são coerentes com os dados do ensaio com soluções aquosas apresentados na Figura 21.a, considerando a concentração de E2 aproximada de 200 ng L⁻¹.

Ainda assim, segundo a premissa da formação de complexos HA-E2, uma outra hipótese foi levantada para a total redução da atividade estrogênica do estradiol, supondo que haveria uma perda de estradiol em decorrência da baixa recuperação de HA no processo de extração. Para isso, o percolado e o *cleanup* da amostra foram também submetidos ao ensaio YES. Contudo, em ambos os casos os subprodutos da EFS não elucidaram resposta positiva (Figura 23), o que pode ser decorrente tanto do efeito antagonista do ácido húmico quanto do baixo fator de concentração final das frações no ensaio (0,05 para o percolado e 0,25 para o *cleanup*).

Figura 23 – Curvas dose-resposta do extrato, percolado e *cleanup* de amostra sintética com 17β-estradiol (E2) e ácido húmico (HA) avaliados com o ensaio YES.



Fonte: O autor, 2022.

Supõe-se, então, que os mesmos efeitos de sorção de substâncias estrogênicas à MOD e a decorrente redução da biodisponibilidade podem ocorrer na avaliação de atividade estrogênica de amostras ambientais ricas em MOD, quando na utilização do ensaio YES, independentemente de um procedimento prévio de extração em fase sólida. Ademais, mantém-se a hipótese da inibição da enzima β -galactosidase em ambos os casos e para ensaios com mecanismos análogos.

4.2 Etapa 2: Ensaio com amostras ambientais

A avaliação da atividade estrogênica e antiestrogênica de amostras ambientais com o ensaio in vitro YES pode ser influenciada pelas características da própria amostra, tais como o perfil de sólidos e a distribuição e tipo do conteúdo orgânico. Com o objetivo de investigar a distribuição multifase da atividade estrogênica e antiestrogênica de amostras ambientais e sua relação com a matéria orgânica dissolvida e particulada, diferentes matrizes ambientais foram avaliadas.

4.2.1 Caracterização físico-química de amostras ambientais

Os parâmetros físico-químicos obtidos na caracterização das amostras ambientais de lixiviado bruto de aterro sanitário de RSU, afluente e efluente de ETE são apresentados na Tabela 15. Os resultados servirão de subsídio para interpretação dos resultados de atividade estrogênica e antiestrogênica nas seções seguintes.

Tabela 15 – Caracterização físico-química das amostras ambientais de lixiviado bruto de aterro sanitário de RSU, afluente e efluente de ETE.

Amostra	Turbidez (UNT)	SST (mg L ⁻¹)			DBO (mg L ⁻¹)	DQO (mg L ⁻¹)	COT (mg L ⁻¹)			Abs ₂₅₄	SUVA (L mg ⁻¹ m ⁻¹)	SHA (mg _c L ⁻¹)
		SST _{<0,7}	SST _{>0,7}	SST _{>0,45}			COD	COP ^a	COT			
L1	177	256,9	154,0	410,9	892	1754 ± 8	1831	149,3	1980,3	33	1,8	42,91
B1	20	1,3	41,3	42,7	-	160 ± 16	33,1	8,3	41,4	0,5740	1,7	0,42
B2	113	9,0	345,0	354,0	-	294 ± 14	18,3	62,9	81,1	0,2090	1,1	0,15
B3	173	66,4	278,0	344,0	-	792 ± 47	24,3	116,9	141,2	0,3530	1,5	0,96
B4	144	4,0	209,0	213,0	-	504 ± 3	20,9	-	-	0,2610	1,3	0,94
BC	141	55,0	277,0	332,0	455	585 ± 27	100,3	95,3	195,6	0,3580	0,4	0,45
T1	2,6	-	27,3	27,3	-	83 ± 8	6,2	1,5	7,7	0,1743	2,8	0,00
T2	2,1	-	40,7	40,7	-	83 ± 9	5,8	1,2	7,0	0,1584	2,7	0,05
T3	2,4	0,7	45,3	46,0	-	128 ± 7	6,0	-	-	0,1638	2,7	0,00
T4	2,5	0,7	30,0	30,7	-	95 ± 8	6,3	1,4	7,7	0,1613	2,6	0,00
TC	2,6	0,7	49,3	50,0	93	80 ± 8	88,6	1,2	89,8	0,3610	0,4	0,57

^a Material particulado retido em membrana de poro 0,7 µm.

COD: Carbono Orgânico Dissolvido.

COP: Carbono Orgânico Particulado.

COT: Carbono Orgânico Total.

DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio.

DQO: Demanda Química de Oxigênio.

SHA: Substâncias Húmicas Aquáticas.

SST: Sólidos Suspensos Totais.

SST_{>0,45}: SST com diâmetro superior a 0,45 µm.

SST_{>0,7}: SST com diâmetro superior a 0,7 µm.

SST_{<0,7}: SST com diâmetro entre 0,45 e 0,7 µm.

SUVA: Absorbância Ultravioleta Específica em 254 nm.

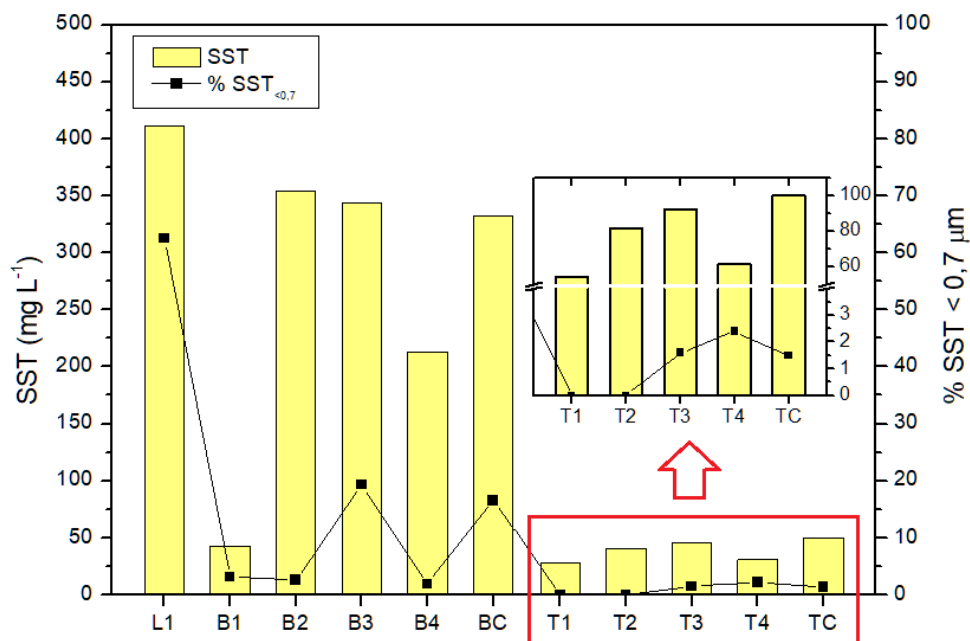
UNT: Unidade Nefelométrica de Turbidez.

Fonte: O autor, 2022.

Os resultados obtidos evidenciam as diferentes características físico-químicas entre as matrizes avaliadas, inclusive quando considerados os parâmetros redundantes.

Com relação às características físicas, o lixiviado apresentou turbidez de 177 UNT enquanto as amostras de afluente e efluente de ETE estiveram nas faixas de 20 – 173 UNT e 2,1 – 2,6 UNT, respectivamente. O valor de SST foi de 410,9 mg L⁻¹ para o lixiviado e esteve nas faixas de 42,7 – 354 mg L⁻¹ para o afluente e 27,5 – 50 mg L⁻¹ para o efluente de ETE. Contudo, a distribuição do tamanho dos sólidos variou (Figura 24), de modo que de 1,3% a 2,2% da massa de SST de efluentes de ETE foi devida a partículas finas menores que 0,7 µm (SST_{<0,7}), enquanto que esta contribuição foi de 1,9% a 16,6% no afluente de ETE e de 62,5% no lixiviado.

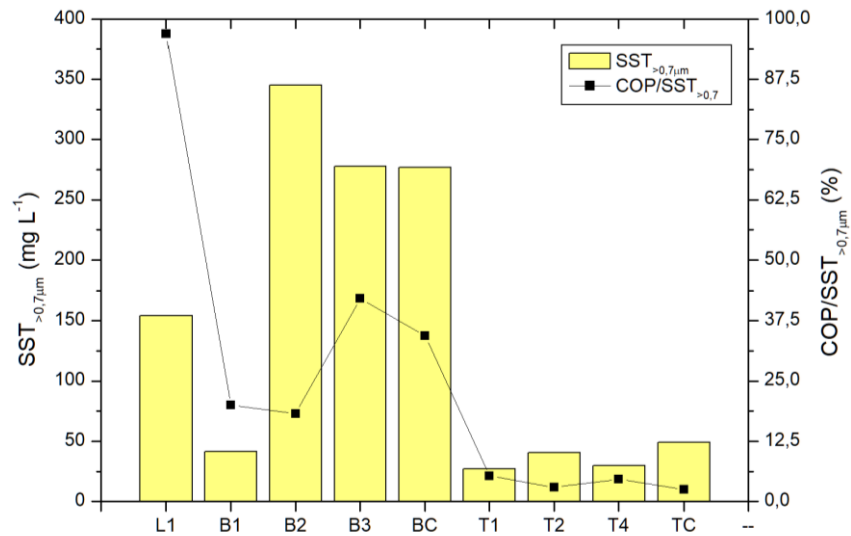
Figura 24 – Detalhamento da distribuição dos sólidos suspensos totais (SST) nas amostras ambientais avaliadas.



Fonte: O autor, 2022.

Considerando os valores de COP obtidos para os sólidos suspensos maiores que 0,7 µm (SST_{>0,7}), tem-se também os maiores percentuais de matéria orgânica para lixiviado (97%) e afluente bruto de ETE (18 – 21%), tal como ilustrado na Figura 25. No caso do lixiviado, que possui maior concentração de sólidos suspensos finos, supõe-se de também sejam compostos majoritariamente de matéria orgânica particulada.

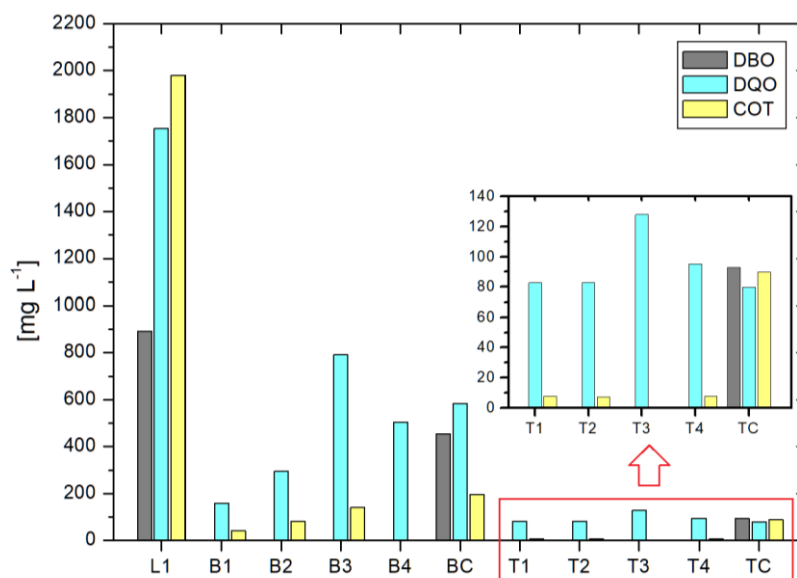
Figura 25 – Percentual de carbono orgânico particulado nos sólidos suspensos nas amostras ambientais avaliadas.



Fonte: O autor, 2022.

Com relação aos parâmetros de constituintes orgânicos agregados (Figura 26), os valores de DBO₅, DQO e COT foram, respectivamente, de 892 mgO₂ L⁻¹, 1754 mgO₂ L⁻¹ e 1980 mg_c L⁻¹ para o lixiviado. Os valores de DBO₅ do afluente e do efluente de ETE foi de 455 e 93 mgO₂ L⁻¹, respectivamente, enquanto os parâmetros DQO e COT estiveram nas faixas de 160 – 792 mgO₂ L⁻¹ e 18,3 – 100,3 mg_c L⁻¹ para o afluente e de 80 – 128 mg L⁻¹ e 7,0 – 89,8 mg_c L⁻¹ para o efluente.

Figura 26 – Valores de constituintes orgânicos agregados das amostras ambientais avaliadas.



Fonte: O autor, 2022.

Com relação aos parâmetros para identificação da aromaticidade e do tipo de matéria orgânica dissolvida das amostras, os valores de Abs_{254} foram de 0,1584 a 0,3610 para o efluente de ETE, 0,2090 a 0,5740 para o afluente de ETE e 33 para o lixiviado. Normalizando estes valores com o COD das amostras, foram obtidas as SUVA de 0,4 a 2,8 $L\ mg^{-1}m^{-1}$ para o efluente de ETE, 0,4 a 1,7 $L\ mg^{-1}m^{-1}$ para o afluente de ETE e 1,8 $L\ mg^{-1}m^{-1}$ para o lixiviado.

Em geral, valores de SUVA inferiores a 3 indicam a abundância de substâncias hidrofílicas na MOD (MATILAINEN *et al.*, 2011), o que é o caso das amostras ambientais avaliadas. Contudo, os resultados de substâncias húmicas indicam uma pequena concentração de MOD hidrofóbica no afluente de ETE (0,15 – 0,96 $mg_c\ L^{-1}$) e a concentração de 42,9 $mg_c\ L^{-1}$ no lixiviado, o que é congruente com os valores de Abs_{254} obtidos.

A ocorrência de substâncias húmicas no afluente de ETE provavelmente é devida ao fato de a ETE operar em sistema de co-tratamento de lixiviado de aterro sanitário de RSU, sendo esta uma matriz que usualmente apresenta substâncias húmicas (LIMA *et al.*, 2017).

De modo geral, os parâmetros físico-químicos analisados indicam que as amostras ambientais estudadas possuem a seguinte característica:

- 1) O lixiviado de aterro sanitário de RSU é rico em MOD com presença de substâncias húmicas, possui elevada concentração de sólidos suspensos, em sua maioria finos ($< 0,7\ \mu m$), enquanto os $SST_{>0,7}$ são majoritariamente compostos de matéria orgânica particulada. Supõe-se que os sólidos finos tenham composição semelhante.
- 2) O afluente de ETE possui concentrações de MOD em níveis elevados, assim como a concentração de sólidos suspensos, que são em maioria superiores a $0,7\ \mu m$. Estes são, em até 42%, compostos por COP e há baixa concentração de substâncias húmicas.
- 3) O efluente de ETE possui menores concentrações de MOD e de sólidos suspensos. Percentual de sólidos finos é baixo, assim como a contribuição do COP para os SST. A ocorrência de substâncias húmicas é virtualmente nula.

Contudo, a amostra TC constitui uma exceção dentre os efluentes de ETE, pois apresentou elevada concentração de COD (88,6 $mg\ L^{-1}$) e valores de Abs_{254} (0,3610) e SHA (0,57 $mg_c\ L^{-1}$) superiores às demais amostras de efluente.

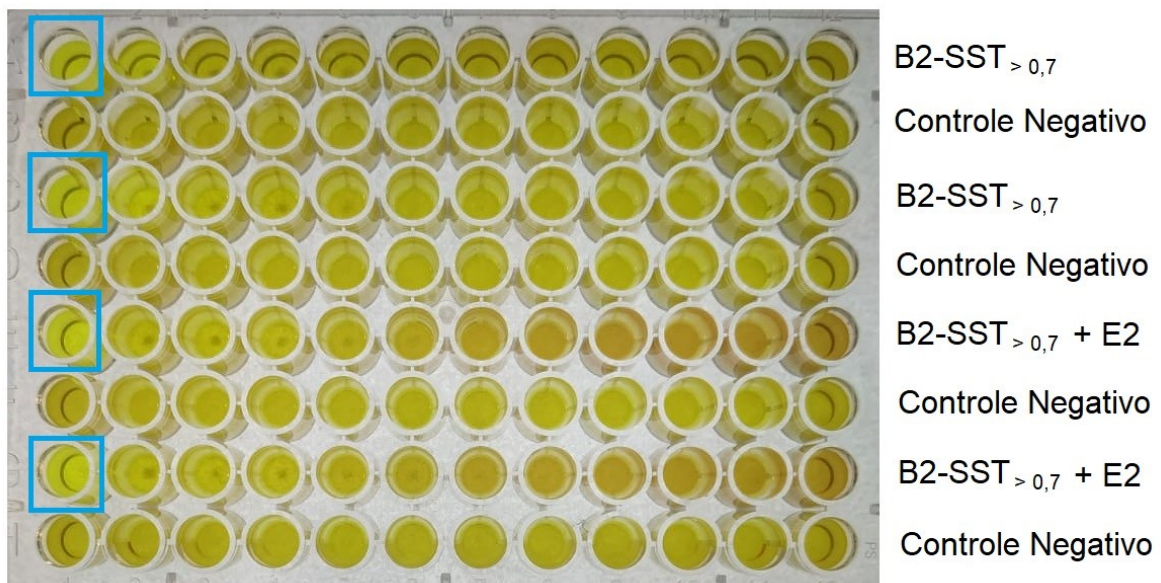
4.2.2 Inibição do crescimento da levedura no ensaio YES

A inibição do crescimento da levedura ou citotoxicidade constitui uma barreira analítica no ensaio YES para amostras ambientais, pois com a redução do número de células, reduz-se a quantidade de receptores de estrogênio disponíveis. Assim, ainda que a amostra contenha substâncias estrogênicas, a ativação de receptores será reduzida, haverá menor produção da enzima β -galactosidase e, conseqüentemente, o efeito observável no ensaio YES será reduzido. Tal efeito é usualmente associado a ocorrência de substâncias tóxicas à levedura, cuja concentração pode ser potencializada no processo de extração em fase sólida (FRISCHE *et al.*, 2009).

Neste estudo, a citotoxicidade ocorreu nos ensaios com lixiviado de aterro sanitário e com amostras de afluente de ETE. No caso do lixiviado, a citotoxicidade máxima foi de 13 % na alíquota L1 e 16 % no extrato dos SST > 0,7 μ m da alíquota L5. Porém, em ambos os casos a citotoxicidade foi mitigada com a diluição da amostra na placa e não interferiu na determinação da atividade estrogênica.

Para as amostras de afluente de ETE, a elevada citotoxicidade de até 93 % foi constatada nos extratos dos SST > 0,7 μ m, como no caso da amostra B2 (Figura 27). Este fenômeno também foi observado anteriormente em amostras do Rio Maracanã, que tiveram recorrente citotoxicidade associada às partículas superiores a 0,7 μ m (ARGOLO *et al.*, 2021).

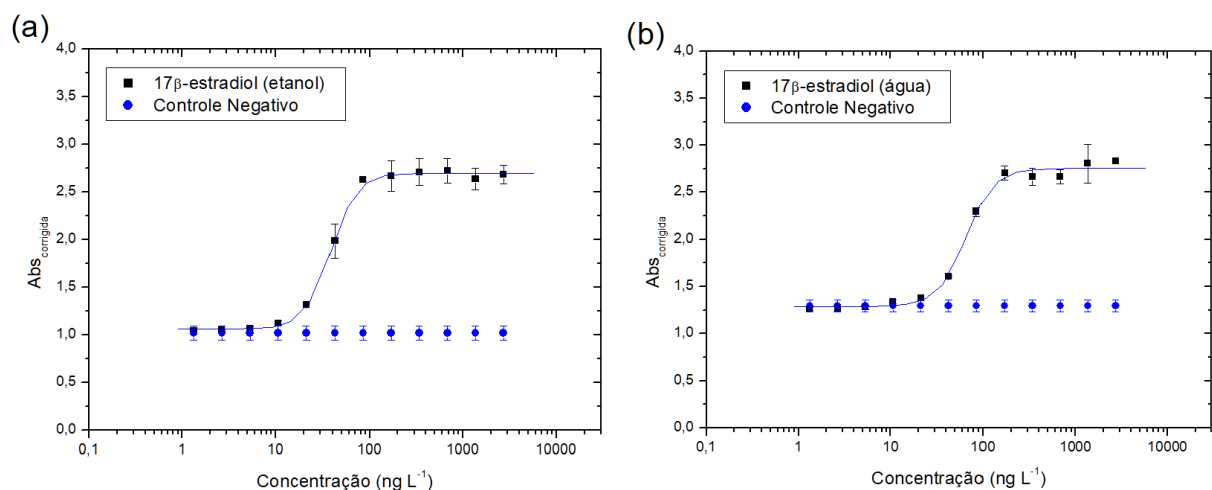
Figura 27 – Foto da placa de ensaio da amostra B2 indicando diluições com citotoxicidade.



4.2.3 Atividade estrogênica de amostras ambientais

A determinação da atividade estrogênica das amostras ambientais em EQ-E2 foi realizada a partir da interpolação dos dados da amostra com a curva do controle positivo 17 β -estradiol (Figura 28). Para cada bateria de ensaio foi realizada uma curva padrão, cuja média dos CE50 foi de $39,4 \pm 12,2$ ng L⁻¹ para a curva em etanol e de $80,8 \pm 22,2$ ng L⁻¹ para a curva em água. Os limites de detecção (LD) derivados das curvas padrão calculados com a Equação 7 estiveram na faixa de 2,93 a 11,7 ng L⁻¹ para as curvas em etanol e de 11,7 a 46,8 ng L⁻¹ para as curvas em água. O limite de detecção para cada amostra foi ainda recalculado dividindo-se o LD da curva padrão pelo fator de concentração final da amostra no ensaio.

Figura 28 – Exemplos de curva dose-resposta padrão do controle positivo 17 β -estradiol diluído em (a) etanol e (b) água ultrapura obtidas no ensaio YES.



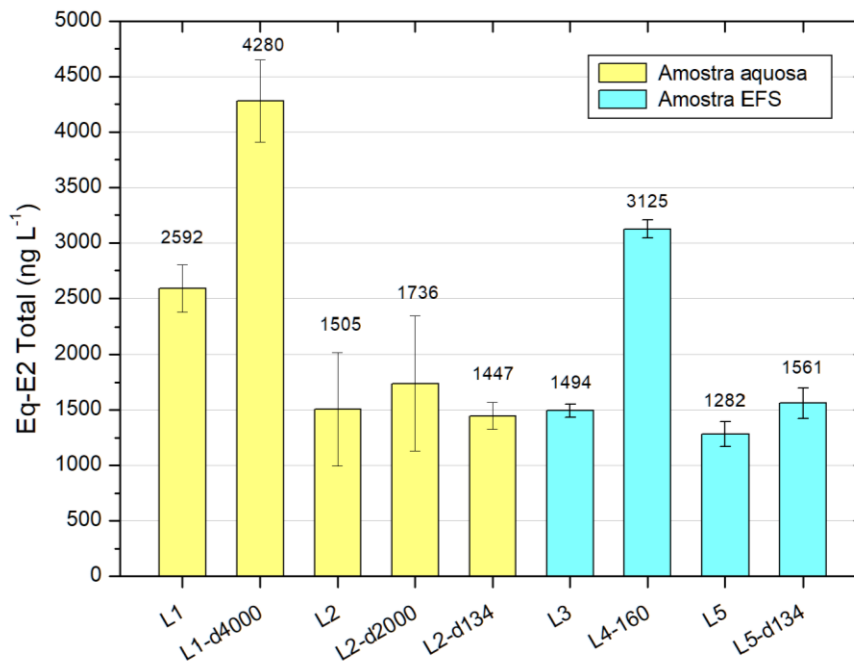
Fonte: O autor, 2022.

4.2.3.1 *Lixiviado de aterro sanitário de RSU*

Uma vez que lixiviados brutos de aterro sanitário costumam apresentar elevada atividade estrogênica (BADERNA *et al.*, 2019), o ensaio YES foi empregado tanto diretamente, a partir de diluições aquosas da amostra, quanto com o extrato da amostra em etanol após EFS. Desta forma, os resultados obtidos podem ser correlacionados com as duas abordagens aplicadas no item 4.1.2.

Os resultados de atividade estrogênica total para as alíquotas do lixiviado de aterro sanitário são apresentados na Figura 29 e no APÊNDICE 2. As curvas dose-resposta das amostras são apresentadas no APÊNDICE 3.

Figura 29 – Resultados de atividade estrogênica total em equivalente estradiol (ng L^{-1}) para alíquotas da amostra de lixiviado bruto de aterro sanitário de RSU. Barras de erro indicam desvio padrão ($n = 2$).



Fonte: O autor, 2022.

Foram obtidos elevados valores de Eq-E2 para a atividade estrogênica total das alíquotas da amostra de lixiviado, variando de 1282 a 2591 ng L^{-1} entre extratos etanólicos e diluições aquosas, tendo a maior variação e amplitude de desvio padrão ocorrido nos ensaios com diluição em água ultrapura (alíquotas L1 e L2). Isto pode estar relacionado a uma relativa heterogeneidade da amostra somada ao fato de que as diferenças de Eq-E2 derivados da variação dos valores de absorbância corrigida são potencializadas ao serem divididas pelo fator de concentração final de 0,05.

Com relação aos resultados obtidos para as amostras dopadas com E2, a alíquota L1-d400, que contaria com o acréscimo estimado de 4000 ng L^{-1} de Eq-E2, teve mais de 50 % de sua estrogenicidade suprimida no ensaio. Da forma semelhante, as alíquotas L2 e L5 não apresentaram diferença estatística entre amostras dopadas e não dopadas. Tal fato pode ser explicado pela influência da MOD no ensaio YES (seção 4.1.2) com a redução da biodisponibilidade de substâncias estrogênicas no ensaio.

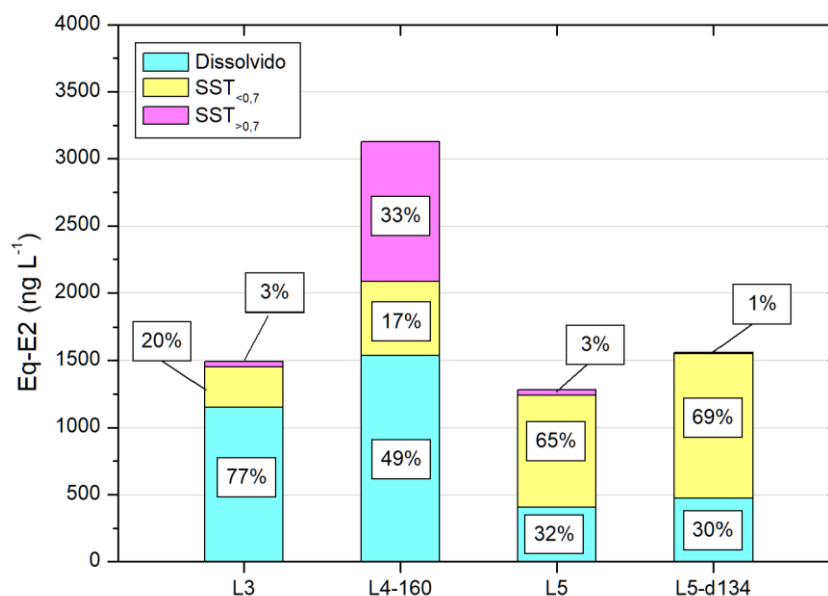
Considerando os parâmetros físico-químicos do lixiviado estudado, a concentração de substâncias húmicas de $42,9 \text{ mg}_c \text{ L}^{-1}$ obtida para a amostra pode ser corrigida para os valores máximos de 2,2 e $32,2 \text{ mg}_c \text{ L}^{-1}$ nos ensaios com diluição aquosa e em etanol, respectivamente. Desse modo, supõe-se ainda que a ocorrência de substâncias estrogênicas na amostra seja ainda superior ao efeito de atividade estrogênica avaliada com o ensaio YES.

Amplas faixas de atividade estrogênica para lixiviados brutos de aterro sanitário de RSU foram reportadas na literatura, majoritariamente referentes à fase dissolvida. Riegraf *et al.* (2021) obtiveram valores de Eq-E2 de 41 a 1880 ng L^{-1} para lixiviado de aterro sanitário na Alemanha e de 14,55 a 1340 ng L^{-1} para lixiviado seco de Israel, ambos avaliados com o ensaio p-YES. Kamata *et al.* (2011) estudaram a atividade estrogênica de lixiviados no Japão com um ensaio *yeast medER* e obtiveram a faixa de 4,1 – 375 ng L^{-1} .

Pereira *et al.* (2018) reportaram o Eq-E2 de $229 \pm 5,7$ enquanto Gomes (2020) reportou as faixas de < LD a 794 ng L^{-1} para fase dissolvida e de 661 a 1077 ng L^{-1} para atividade estrogênica total de lixiviados brutos de aterros sanitários do Rio de Janeiro avaliados com o ensaio YES. Por fim, Sales Junior *et al.* (2021) reportaram Eq-E2 total de $660 \pm 50 \text{ ng L}^{-1}$ para lixiviado bruto de aterro sanitário avaliado com diluição aquosa no ensaio YES.

A partir da Figura 30, observa-se a acentuada distribuição da estrogenicidade total da amostra entre as fases dissolvida e particulada, estando de 30 a 77 % associada à fase dissolvida. Isto confirma a tendência das substâncias estrogênicas ao fracionamento em matrizes aquosas em decorrência da relativa lipofilicidade (MA e YATES, 2018; YARAHMADI *et al.*, 2018).

Figura 30 – Distribuição percentual entre as fases dissolvida e particulada de atividade estrogênica total para alíquotas da amostra de lixiviado bruto de aterro sanitário de RSU.



Fonte: O autor, 2022.

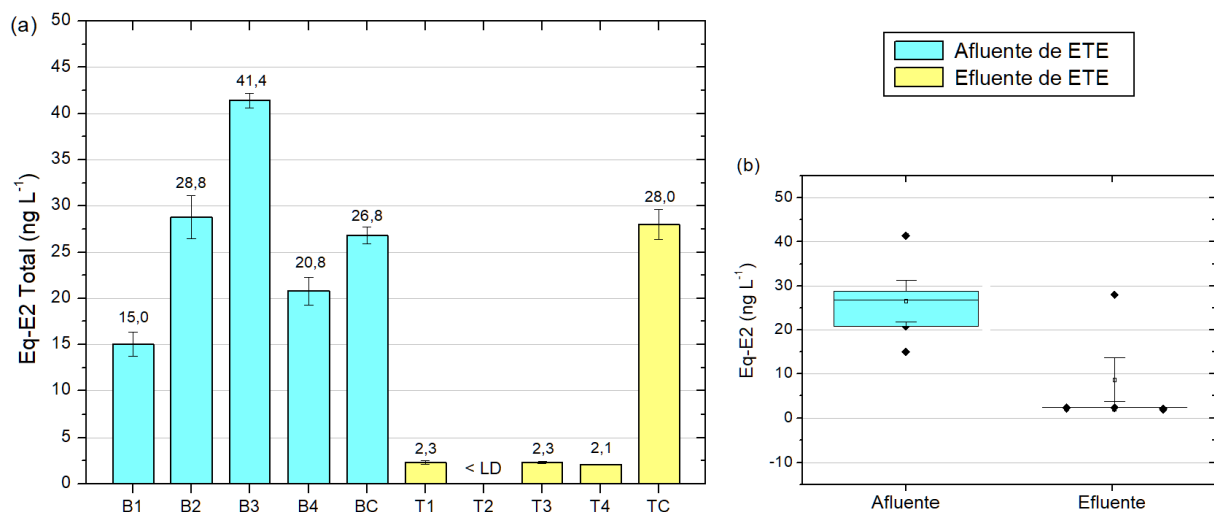
Além disso, 20 a 69 % da estrogenicidade das amostras esteve associada aos SST < 0,7 μm , reafirmando a maior capacidade de sorção do material particulado fino e orgânico (DUONG *et al.*, 2010, NIE *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2014). Ainda assim, Kalmykova *et al.* (2013) sugeriram que o conteúdo orgânico coloidal da matriz pode ter efeito negativo no processo de fracionamento de compostos aromáticos em lixiviados de aterro.

O lixiviado de aterro sanitário de RSU é uma matriz complexa, com elevada concentração de múltiplos poluentes e toxicidade, sendo um desafio para a utilização de bioensaios (BADERNA *et al.*, 2019). No âmbito do ensaio YES, verificou-se que além da atividade estrogênica medida na fase dissolvida, parte considerável do potencial estrogênico da matriz pode estar associado aos sólidos suspensos ou ainda não estar biodisponível no ensaio.

4.2.3.2 Afluente e Efluente de ETE

A avaliação da atividade estrogênica total e das fases dissolvida e particulada das amostras de afluente e efluente de ETE foi realizada exclusivamente com os extratos etanólicos das frações das amostras. Os resultados de atividade estrogênica total são apresentados na Figuras 31 e no Apêndice 2. As curvas dose-resposta das amostras são apresentadas no APÊNDICE 3.

Figura 31 – Resultados de atividade estrogênica total em equivalente estradiol (ng L^{-1}) para amostras de afluente e efluente de ETE.



(a) Valores de Eq-E2 total individuais para as amostras avaliadas. Barras de erro indicam desvio padrão ($n = 2$); (b) Distribuição em boxplot dos valores de Eq-E2 para afluente e efluente de ETE. Barras de erro indicam erro padrão ($n = 5$); LD: Limite de detecção. Fonte: O autor, 2022.

Foram obtidos valores de Eq-E2 total na faixa de 15 a 41,4 ng L⁻¹ para o afluente da ETE e de < LD a 28 ng L⁻¹ para o efluente da ETE. Contudo, assim como nos parâmetros físico-químicos, a amostra composta TC foi um *outlier* (Figura 31.b) e pode não ter sido característica do efluente da ETE.

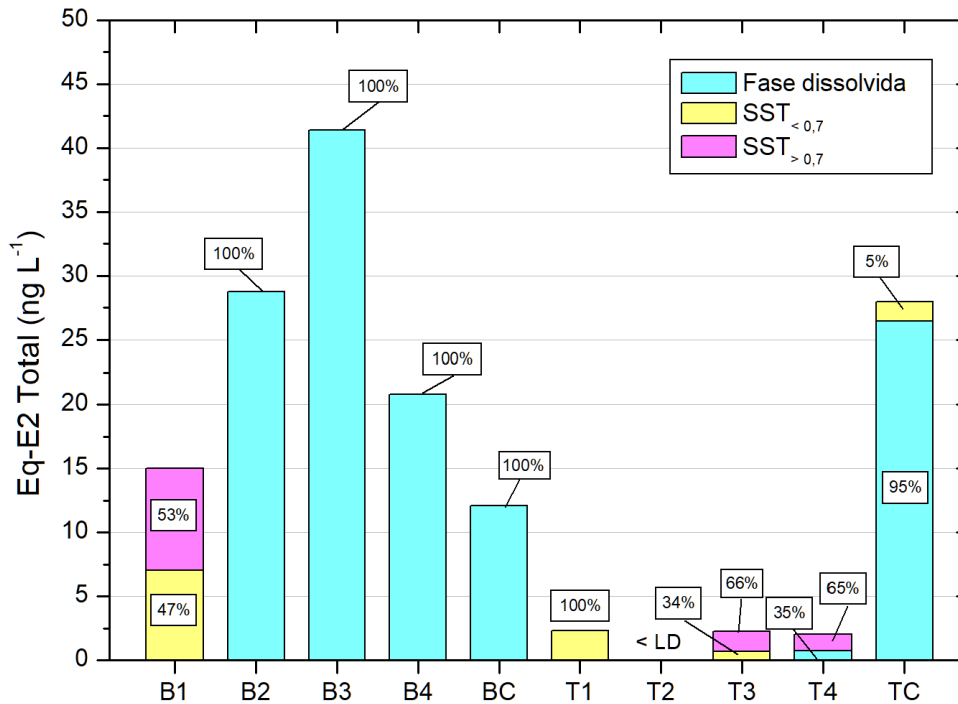
Ainda assim, os valores obtidos são semelhantes aos reportados por Dagnino *et al.* (2010) que avaliaram a estrogenicidade das fases dissolvida e particuladas de ETE na França com o ensaio MELN e obtiveram Eq-E2 total nas faixas de 48,6 – 84,9 ng L⁻¹ para afluentes e 3,3 – 60,1 ng L⁻¹ para efluentes de ETE. Contudo os resultados variaram de acordo com a concentração de sólidos suspensos e as tecnologias de tratamento empregadas. Huang *et al.* (2019b) reportaram efluentes secundários na China com 28,12 ± 2,3 ng L⁻¹ de Eq-E2, considerando as fases dissolvida e coloidal.

A atividade estrogênica total do afluente de ETE no presente estudo foi também semelhante aos resultados anteriormente obtidos para águas do Rio Maracanã. O rio urbano, altamente impactado pelo lançamento de esgoto doméstico, apresentou atividade estrogênica na faixa de 29 a 65 ng L⁻¹ de Eq-E2 (ARGOLO *et al.*, 2021).

Escher *et al.* (2018) propuseram para o ensaio YES o valor de Eq-E2 de 0,88 ng L⁻¹ como valor de *effect-based trigger* (EBT), isto é, a concentração limite de micropoluentes orgânicos que elucida um efeito biológico. Valores de EBT variam entre bioensaios de acordo com sua sensibilidade e estão relacionados ao acionamento de efeitos adversos. Assim, o efluente da ETE foi em média 1,7 vezes mais estrogênico do que o valor de EBT, desconsiderando a amostra TC. Por outro lado, o afluente da ETE foi em média 26,7 vezes mais estrogênico do que o EBT proposto.

Não obstante, o percentual do potencial estrogênico oriundo da fase dissolvida e a contribuição do material particulado suspenso são importantes dados, seja para avaliar o destino dos contaminantes no meio, quanto para avaliar e subsidiar o aprimoramento de técnicas de tratamento de efluentes. Portanto, a distribuição multifase da atividade estrogênica total foi avaliada para as amostras de afluente e efluente de ETE e as contribuições percentuais são ilustradas na Figura 32.

Figura 32 – Distribuição percentual entre as fases dissolvida e particulada de atividade estrogênica total para amostras de afluente e efluente de ETE.



Fonte: O autor, 2022.

Observa-se que, para as amostras de afluente de ETE, a atividade estrogênica esteve quase exclusivamente associada à fase dissolvida, apesar da elevada concentração de SST, que eram, todavia, majoritariamente superiores a $0,7 \mu\text{m}$ e com menor percentual de COP. Como exceção, a amostra B1 teve sua estrogenicidade dividida apenas entre as duas frações de sólidos avaliadas. No entanto, vale salientar que a elevada citotoxicidade induzida pelos extratos dos sólidos maiores que $0,7 \mu\text{m}$ nas demais amostras de afluente de ETE pode ter mascarado parte da atividade estrogênica desta fração.

Por outro lado, a atividade estrogênica de efluentes de ETE esteve majoritariamente associada aos SST, contribuindo com 65 a 100 % do Eq-E2 total, o que indica uma transferência de fase decorrente do processo de tratamento. Como exceção, a amostra TC teve 95 % do Eq-E2 total associado à fase dissolvida e 5 % associado aos SST menores do que $0,7 \mu\text{m}$.

O estudo de afluentes e efluentes de ETE na França conduzida por Dagnino *et al.* (2010) resultou em 32,2 a 97,4 % da atividade estrogênica de afluentes associada a fase dissolvida, enquanto para efluentes os percentuais variaram de 20 a 96,6 %. Por outro lado, a atividade estrogênica das águas do rio Maracanã foi $51 \pm 12 \%$ associada à fase dissolvida e na faixa de 31 a 62 % associada às partículas de $0,45$ a $0,7 \mu\text{m}$, segundo estudo prévio (ARGOLO *et al.*, 2021).

Considerando apenas as fases dissolvidas, a redução da estrogenicidade após tratamento secundário também foi recentemente reportada na literatura. Shuliakevich *et al.* (2022) reportaram as faixas de < LD a 1,0 ng L⁻¹ para efluentes de tratamento convencional na Alemanha e Petosa *et al.* (2022) reportaram a faixa de 1 a 10 ng L⁻¹ para efluentes de tratamento por sistema de lodo ativado no Canadá, ambos os estudos com valores em Eq-E2 obtidos com o ensaio CALUX[®]. Archer *et al.* (2020), ainda, obtiveram a faixa de 0,2 a 6,9 ng L⁻¹ para efluentes de ETE na África do Sul com o ensaio YES.

A atividade estrogênica dissolvida de afluentes de ETE foi reportada na faixa de 27 a 72 ng L⁻¹ por Petosa *et al.* (2022), enquanto afluentes de ETE na Alemanha avaliados por Hettwer *et al.* (2018) com o ensaio A-YES tiveram Eq-E2 em média igual a 13,9 ng L⁻¹. Por fim, os resultados de afluente e efluente de ETE do presente estudo encontram-se dentro das faixas obtidas por Gomes (2020), com o ensaio YES, sendo os Eq-E2 reportados de < LD a 123 ng L⁻¹ para afluente e < LD a 11 ng L⁻¹ para efluentes secundários.

No presente estudo, a redução média da atividade estrogênica com o sistema de lodos ativados foi de 92 %, havendo transferência da fase dissolvida no afluente para a fase particulada no efluente da ETE. A remoção de substâncias estrogênicas e consequente redução da atividade estrogênica do esgoto sanitário pode ser alcançada por mecanismos de sorção e transformação biológica com tecnologias de tratamento biológico, tais como sistema de lodos ativados (AQUINO *et al.*, 2013; COELLO-GARCIA *et al.*, 2019, NGUYEN *et al.*, 2021), apesar de ainda constituir um desafio (TANG *et al.*, 2021).

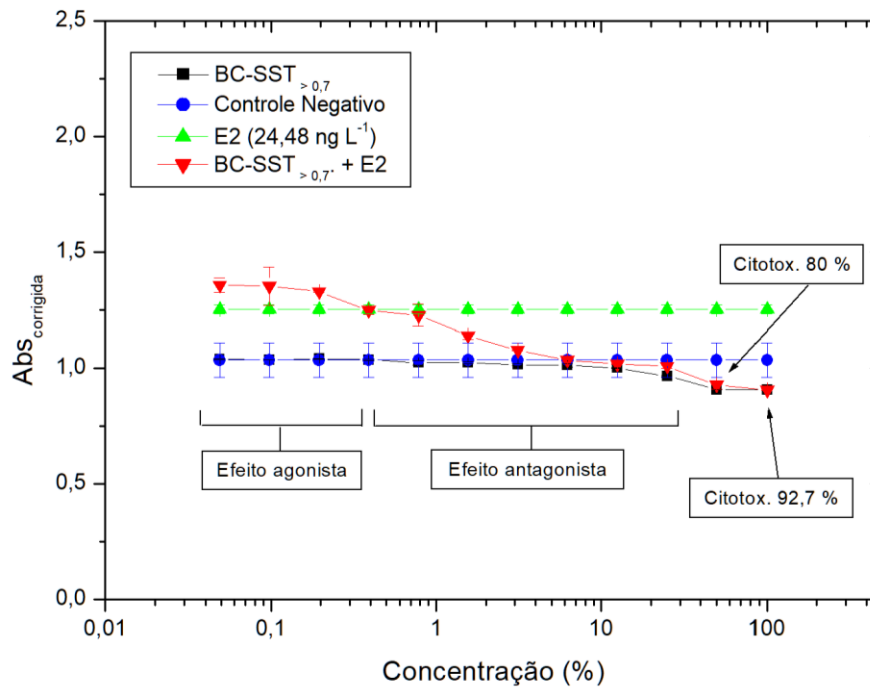
4.2.4 Atividade antiestrogênica de amostras ambientais

A avaliação da atividade antiestrogênica com o ensaio YES foi realizada qualitativamente para as fases dissolvida e particulada das amostras de afluente e efluente de ETE, de modo que os resultados apresentados neste item complementam os resultados apresentados e discutidos anteriormente.

A partir da adição de E2 na concentração 24,28 ng L⁻¹ aos extratos das amostras e suas diluições, segundo o item 3.3.3, verificou-se o efeito da mistura amostra+E2. Assim, o decréscimo da absorbância corrigida do E2 24,28 ng L⁻¹ na ausência de citotoxicidade indicou o efeito antagonista produzido pela amostra, enquanto o aumento da absorbância corrigida indica a presença de compostos estrogênicos, tal como ilustrado na Figura 33.

A síntese da avaliação qualitativa da atividade antiestrogênica é apresentada na Tabela 16 e no APÊNDICE 2. As curvas dose-resposta das amostras são apresentadas no APÊNDICE 3.

Figura 33 – Curva dose-resposta do extrato dos sólidos suspensos maiores que 0,7 µm da amostra BC para avaliação da atividade antiestrogênica.



Fonte: O autor, 2022.

Tabela 16 – Síntese da avaliação da atividade antiestrogênica para as frações das amostras de afluente e efluente de ETE realizada com o ensaio YES.

Amostra	Efeito observado		
	Dissolvido	SST < 0,7 µm	SST > 0,7 µm
B1	E	-	-
B2	-	E	A
B3	-	-	E, A
B4	-	-	A
BC	-	E, A	E, A
T1	A	-	E, A
T2	E, A	E, A	E
T3	E	-	-
T4	-	E	-
TC	-	-	E

A: efeito antagonista (atividade antiestrogênica); E: efeito agonista (atividade estrogênica). Fonte: O autor, 2022.

O extrato dos SST_{>0,7} da amostra BC produziu citotoxicidade nas duas maiores concentrações e não elucidou resposta positiva segundo a metodologia do ensaio YES nas demais concentrações, o que tornou a avaliação da atividade estrogênica inconclusiva. Ao proceder a avaliação da atividade antiestrogênica (Figura 33) verificou-se que, para além de substâncias tóxicas à levedura, a fração da amostra continha substâncias que induziram efeito antagonista e possivelmente mascararam o efeito de substâncias estrogênicas.

A ocorrência da atividade estrogênica na fração BC-SST_{>0,7}, por sua vez, pode ser confirmada nas três menores concentrações do ensaio, que potencializaram a resposta do E2 24,48 ng L⁻¹.

A atividade antiestrogênica foi recorrente nos demais extratos SST_{>0,7} dos afluentes, inclusive também mascarando o potencial estrogênico da amostra B3-SST_{>0,7} (Tabela 16). O mesmo ocorreu com o extrato BC-SST_{<0,7} e com as frações dissolvida e particulada (< 0,7 µm) do efluente T2. Ademais, a atividade estrogênica foi evidenciada em frações de amostra que não induziram resposta positiva no ensaio YES padrão, como os extratos B2-SST_{<0,7} e T4-SST_{<0,7} e a fração dissolvida das amostras B1 e T3.

Ihara *et al.* (2014) avaliaram amostras de afluente e efluente secundário de tratamento biológico no Japão e reportaram recorrente atividade antiestrogênica no ensaio com RE α . Os autores elencaram antagonistas competitivos como prováveis causadores desse efeito, mas não descartaram a possibilidade da interação com a matéria orgânica. Archer *et al.* (2020) também reportaram o efeito recorrente da atividade antiestrogênica em efluentes de ETE na África do Sul, o que teria mascarado o efeito agonista no ensaio YES.

Por outro lado, Černá *et al.* (2022) encontraram atividade antiestrogênica insignificante em lodos de ETE na República Tcheca, ainda que atribuída a antagonistas não competitivos, isto é, que causam o efeito antagonista sem ligarem-se ao receptor.

Westlund e Yargeau (2017) investigaram a ocorrência de pesticidas em afluentes e efluentes de ETE no Canadá e após avaliação da atividade (anti)estrogênica e (anti)androgênica dos compostos individuais com ensaio com levedura, concluíram que os mesmos podem impactar na avaliação da atividade estrogênica dessas matrizes.

Com relação a elucidação de atividade estrogênica mesmo nas amostras de efluente que resultaram em Eq-E2 menor do que o LD do método, é sabido que em processos biológicos a estrona (E1) é subproduto primário da degradação dos hormônios E2 e EE2 (NGUYEN *et al.*, 2021). Tendo uma menor potência relativa na maioria dos ensaios com receptor de estrogênio, a estrona pode estar presente no efluente e ainda assim não ter seu efeito detectado. Contudo, a adição de E2 na avaliação de atividade antiestrogênica pode potencializar o efeito da E1 e

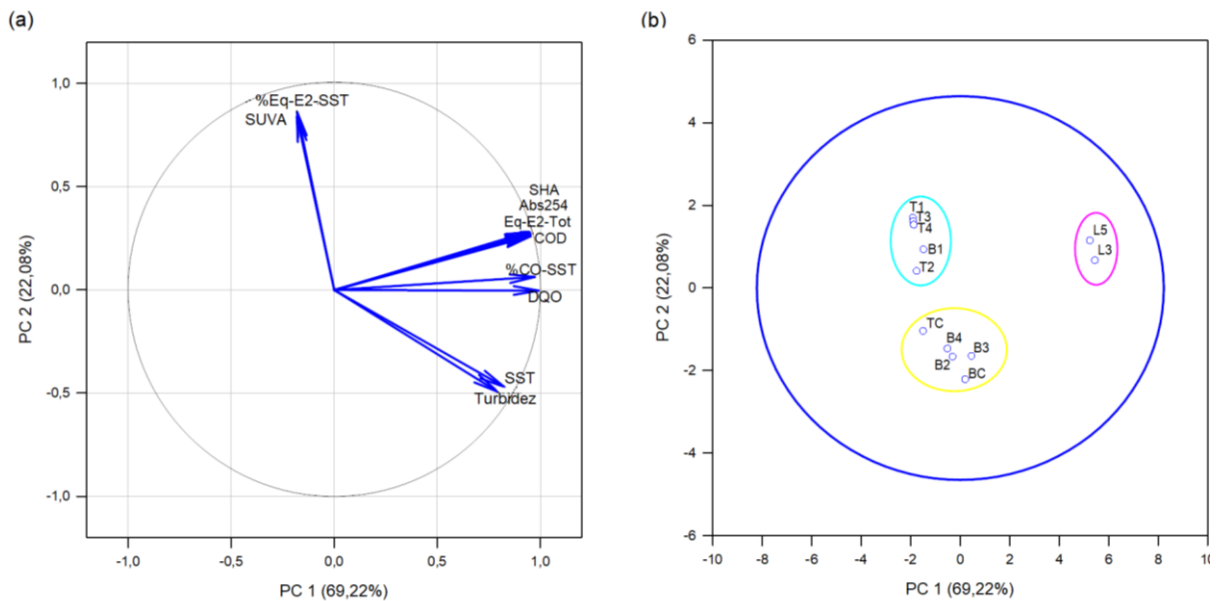
demais compostos estrogênicos em baixa concentração, possivelmente a partir de um sinergismo *in vitro*, como discutido no item 4.1.1.

4.2.5 Análise de Componentes Principais

Para auxiliar na avaliação e interpretação global dos resultados das amostras ambientais, a Análise de Componentes Principais foi aplicada em duas partes. Na primeira, foram incluídas amostras de lixiviado, afluente e efluente de ETE a partir das variáveis Turbidez, SST, COD, DQO, Abs254, SHA, SUVA, Eq-E2-total, %CO-SST e %Eq-E2-SST. A segunda foi realizada apenas para afluentes e efluentes de ETE e foram adicionados os parâmetros citotoxicidade máxima (Citotox) e de atividade antiestrogênica associada as fases dissolvida e particulada (%AE-diss e %AE-SST).

O resultado da ACP para o primeiro caso é apresentado na Figura 34 e as respectivas matrizes de correlação e dados da extração de fatores e das cargas fatoriais, são apresentadas nas Tabelas 17 e 18.

Figura 34 – Análise de Componentes Principais aplicada para resultados das amostras de lixiviado, afluente e efluente de ETE.



(a) Mapa de cargas fatoriais das variáveis; (b) Gráfico de pontuações das amostras. Fonte: O autor, 2022.

Tabela 17 – Matriz de coeficientes de correlação Pearson (ρ) obtidos a partir dos resultados das amostras de lixiviado, afluente e efluente de ETE.

	Turbidez	DQO	SST	%CO-SST	COD	Abs254	SUVA	SHA	Eq-E2-tot	%Eq-E2-SST
Turbidez	1									
DQO	0,823	1								
SST	0,959	0,824	1							
%CO-SST	0,742	0,966	0,789	1						
COD	0,578	0,93	0,624	0,928	1					
Abs254	0,571	0,928	0,616	0,925	0,999	1				
SUVA	-0,46	-0,157	-0,463	-0,136	-0,0003	0,0327	1			
SHA	0,581	0,932	0,623	0,926	0,999	1	0,0248	1		
Eq-E2-tot	0,58	0,929	0,625	0,925	0,995	0,996	0,0214	0,996	1	
%Eq-E2-SST	-0,498	-0,168	-0,494	-0,0819	0,0221	0,0405	0,645	0,0297	0,00997	1

Fonte: O autor, 2022.

Tabela 18 – Autovalores da matriz de correlação da ACP para resultados das amostras de lixiviado, afluente e efluente de ETE.

Fator	Autovalor	Diferença	Proporção(%)	Acumulado(%)
1	6,922	4,713	69,218	69,218
2	2,208	1,797	22,084	91,302
3	0,412	0,0621	4,118	95,42
4	0,35	0,291	3,497	98,917
5	0,0586	0,0167	0,586	99,503
6	0,0419	0,0366	0,419	99,922
7	0,00531	0,00302	0,0531	99,975
8	0,00229	0,00209	0,0229	99,998
9	0,000197	0,000192	0,00197	100
10	5,05E-06	--	5,05E-05	100

Fonte: O autor, 2022.

De acordo com a primeira análise (Figura 34.a), a maior parte dos parâmetros avaliados foram retidos pelo fator PC1 e correlacionam-se positivamente. Contudo, o percentual da atividade estrogênica associada aos SST (%Eq-E2-SST) apresentou forte correlação negativa com concentração de SST, o que possivelmente foi impulsionado pela citotoxicidade e atividade antiestrogênica nas frações de SST dos afluentes de ETE.

Ademais, o parâmetro %Eq-E2-SST teve fraca correlação com os demais parâmetros, o que indica que a distribuição da atividade estrogênica entre as fases dissolvida e particulada não é facilmente predita a partir dos parâmetros físico-químicos. Não obstante, a análise estatística específica para cada matriz e com mais amostras pode resultar em correlações com maior representatividade. Ainda assim, a Figura 34.b ilustra como as amostras ambientais agruparam-se de acordo os resultados dos parâmetros avaliados, reforçando que a amostra TC não foi característica dos efluentes de ETE e que também a amostra B1 se distanciou dos demais afluentes de ETE.

O resultado da ACP para o segundo caso é apresentado na Figura 35 e as respectivas matrizes de correlação e dados da extração de fatores e das cargas fatoriais, são apresentadas nas Tabelas 19 e 20.

Figura 35 – Análise de Componentes Principais aplicada para resultados das amostras de afluente e efluente de ETE.

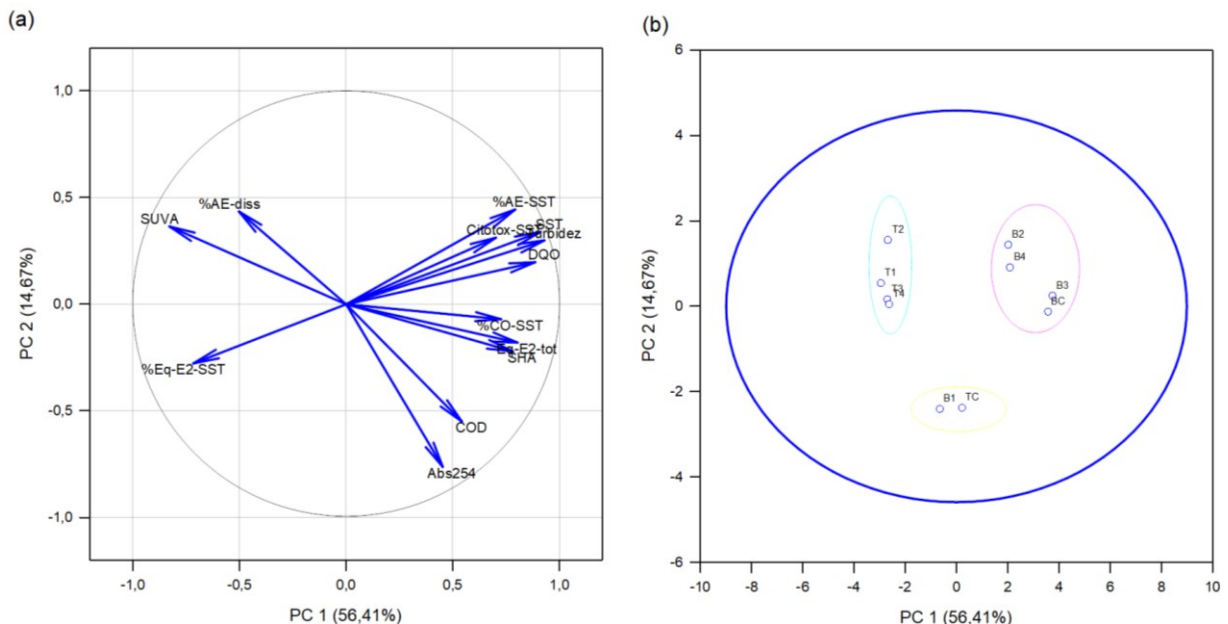


Tabela 19 – Matriz de coeficientes de correlação Pearson (ρ) obtidos a partir dos resultados das amostras de afluente e efluente de ETE.

	Turbidez	DQO	SST	%CO-SST	COD	Abs254	SUVA	SHA	Eq-E2-tot	%Eq-E2-SST	Citotox.	%AE-diss	%AE-SST
Turbidez	1												
DQO	0,956	1											
SST	0,939	0,858	1										
%CO-SST	0,686	0,768	0,73	1									
COD	0,25	0,269	0,295	0,357	1								
Abs254	0,227	0,289	0,153	0,514	0,549	1							
SUVA	-0,586	-0,513	-0,617	-0,445	-0,853	-0,559	1						
SHA	0,724	0,763	0,522	0,437	0,388	0,547	-0,644	1					
Eq-E2-tot	0,679	0,649	0,676	0,559	0,329	0,458	-0,689	0,773	1				
%Eq-E2-SST	-0,648	-0,561	-0,672	-0,319	-0,432	-0,0643	0,658	-0,566	-0,593	1			
Citotox	0,675	0,523	0,848	0,548	0,411	0,0655	-0,603	0,125	0,345	-0,532	1		
%AE-diss	-0,392	-0,377	-0,377	-0,301	-0,353	-0,412	0,539	-0,416	-0,502	-0,0776	-0,297	1	
%AE-SST	0,898	0,766	0,816	0,338	0,176	0,0399	-0,537	0,619	0,48	-0,673	0,665	-0,274	1

Fonte: O autor, 2022.

Tabela 20 – Autovalores da matriz de correlação da ACP para resultados das amostras de afluente e efluente de ETE.

Fator	Autovalor	Diferença	Proporção(%)	Acumulado(%)	Fator	Autovalor	Diferença	Proporção(%)	Acumulado(%)
1	7,333	5,425	56,407	56,407	9	0,00687	0,00687	0,0529	100
2	1,908	0,717	14,673	71,08	10	7,35E-17	7,35E-17	5,65E-16	100
3	1,191	0,152	9,158	80,238	11	0	0	0	100
4	1,039	0,239	7,991	88,229	12	0	0	0	100
5	0,8	0,37	6,155	94,385	13	0	--	0	100
6	0,43	0,171	3,312	97,696					
7	0,26	0,227	1,999	99,695					
8	0,0327	0,0259	0,252	99,947					

Fonte: O autor, 2022.

A Figura 35 demonstra que o %Eq-E2-SST correlacionou-se negativamente às substâncias antagonistas e substâncias citotóxicas, ambas associadas aos SST, o que afeta a quantificação da atividade estrogênica. Além disso, a atividade antiestrogênica da fase dissolvida teve correlação negativa com as SHA e os parâmetros de matéria orgânica agregada, o que indica que outros fatores podem ser responsáveis pelo efeito antagonista observado na matriz. Por fim, a Figura 35.b reforça as particularidades das amostras TC e B1.

Em linhas gerais, a atividade estrogênica total da amostra esteve relacionada positivamente à maioria dos parâmetros de matéria orgânica avaliados, o que era esperado para amostras poluídas e considerando as características orgânicas e lipofílicas das substâncias estrogênicas. Vandermarken *et al.* (2019) também estabeleceram correlação positiva entre substâncias estrogênicas e os parâmetros COD, COP e SST avaliados em águas do Rio Senne, na Bélgica. Contudo, os autores reportaram fraca correlação com o diâmetro médio dos SST e correlação negativa moderada com o percentual de carbono nos SST.

As correlações entre os parâmetros avaliados obtidas a partir dos resultados das amostras ambientais somam-se aos resultados e conclusões obtidos anteriormente e elucidam parcialmente a quantificação da atividade estrogênica em amostras ambientais. Contudo, reitera-se a necessidade de mais amostras para uma avaliação mais robusta.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou a influência da interação entre estrogênios e da matéria orgânica dissolvida e particulada na quantificação da atividade estrogênica em amostras ambientais com o ensaio *in vitro* YES.

Verificou-se que o sinergismo *in vitro* pode ser um fenômeno recorrente no ensaio YES a partir da interação entre estrogênios na faixa de concentração-teste 13,62 – 108,96 ng L⁻¹ Eq-E2. Tal faixa pode decorrer de baixas concentrações em amostra ambiental submetida a extração em fase sólida. O sinergismo deve ser considerado na aplicação de concentrações-limite baseadas em efeito no âmbito do monitoramento ambiental e mais estudos com misturas complexas podem lançar maior luz sobre a problemática.

Verificou-se também que o ácido húmico, como referência de matéria orgânica dissolvida (MOD) hidrofóbica, é responsável por acentuado efeito antagonista no ensaio YES, seja por redução da biodisponibilidade das substâncias estrogênicas no ensaio ou pela possível inibição da enzima β -galactosidase. Portanto, amostras ambientais ricas em MOD hidrofóbica estão sujeitas a subquantificação da atividade estrogênica medida com o ensaio YES, seja após extração em fase sólida ou com diluição aquosa da amostra.

A avaliação das amostras ambientais resultou em elevados valores de Eq-E2 total, nas faixas de 1282–2591 ng L⁻¹ para lixiviado bruto de aterro sanitário de RSU, 12,1–41,4 ng L⁻¹ para afluente de ETE e <LD–2,3 ng L⁻¹ para efluente de ETE, havendo um outlier de 28 ng L⁻¹ para este último. Afluentes de ETE tiveram a estrogenicidade majoritariamente associada à fase dissolvida e foi observada a contribuição da fase particulada à atividade estrogênica total de 23 % a 100 % entre as diferentes matrizes, de modo que os SST constituem importante veículo de substâncias estrogênicas no meio.

A citotoxicidade foi recorrentemente associada à fração de SST maiores que 0,7 μ m e pode ter mascarado a ocorrência de atividade estrogênica associada a essa fração da amostra. A atividade estrogênica também foi mascarada por atividade antiestrogênica das fases dissolvida e particulada de amostras de afluente e efluente de ETE, o que também leva a uma subquantificação do potencial estrogênico das matrizes.

Os parâmetros físico-químicos relacionados aos sólidos e à matéria orgânica das amostras subsidiaram o entendimento da distribuição multifase da atividade estrogênica da amostra. Contudo, a Análise de Componentes Principais não elucidou correlações positivas

para sustentar um padrão. Supõe-se que parâmetros físico-químicos não sejam preditivos dos padrões de distribuição multifase de compostos estrogênicos, o que pode ser verificado com um estudo mais robusto.

O ensaio *in vitro* YES é uma importante ferramenta para o monitoramento ambiental de micropoluentes estrogênicos e para o controle da eficiência de tecnologias de tratamento de efluentes. Ainda assim, o mesmo está sujeito a fatores intrínsecos à amostra que podem influenciar no potencial estrogênico obtido a partir do ensaio. Portanto, recomenda-se que a interpretação de resultados de atividade estrogênica seja realizada em conjunto com parâmetros físico-químicos de caracterização de matéria orgânica, além de citotoxicidade e atividade antiestrogênica, para maior segurança quanto ao potencial estrogênico das amostras avaliadas.

REFERÊNCIAS

- ALSOP, D.; WILSON, J.Y. Waterborne pharmaceutical uptake and toxicity is modified by pH and dissolved organic carbon in zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 210, n. February, p. 11–18, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.008>.
- ALTENBURGER, R.; BRACK, W.; BURGESS, R.B. *et al.* Future water quality monitoring: improving the balance between exposure and toxicity assessments of real-world pollutant mixtures. **Environmental Sciences Europe**, v. 31, n. 1, p. 1–17, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0193-1>.
- APHA; AWWA; WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23 ed., 2017.
- 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. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 187–204, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1413-41522013000300002>.
- AQUINO, S.F.; BRANDT, E.M.F.; BOTTTREL, S.E.C.; GOMES, F.B.R.; SILVA, S.D.Q. Occurrence of Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Compounds in Brazilian Water and the Risks They May Represent to Human Health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v. 18, p. 11765, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijerph182211765>.
- ARCHER, E.; WOLFAARDT, G.M.; VAN WYK, J.H.; VAN BLERK, N. Investigating (anti)estrogenic activities within South African wastewater and receiving surface waters: Implication for reliable monitoring. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114424, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114424>.
- ARGOLO, A.S.; GOMES, G.; BILA, D.M. 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**, v. 208, p. 111574, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111574>.
- BADERNA, D.; CALONI, F.; BENFENATI, E. Investigating landfill leachate toxicity in vitro: A review of cell models and endpoints. **Environment International**, v. 122, n. September 2018, p. 21–30, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.024>.
- BAI, L.; ZHANG, Q.; WANG, C.; YAO, X.; ZHANG, H.; JIANG, H. Effects of natural dissolved organic matter on the complexation and biodegradation of 17A-ethinylestradiol in freshwater lakes. **Environmental Pollution**, v. 246, p. 782–789, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.098>.

BARBOSA, M.O.; MOREIRA, N.F.F.; RIBEIRO, A.R.; PEREIRA, M.F.R.; SILVA, A.M.T. Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. **Water Research**, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.047>.

BECK, I.C.; BRUHN, R.; GANDRASS, J. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. **Chemosphere**, v. 63, n. 11, p. 1870–1878, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.10.022>.

BEDARD, M.; GIFFEAR, K.A.; PONTON, L.; SIENERTH, K.D.; DEL GAIZO MOORE, V. Characterization of binding between 17 β -estradiol and estriol with humic acid via NMR and biochemical analysis. **Biophysical Chemistry**, v. 189, p. 1–7, 2014. DOI: 10.1016/j.bpc.2014.02.001. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2014.02.001>.

BERGMAN, Åke *et al.* **State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012**. World Health Organization, 2013.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M.. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e conseqüências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300027>.

BIRKETT, J.W.; LESTER, J.N. **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process**. 1. ed., CRC Press LLC, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(03\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(03)00103-1).

BLISS, C.I. The toxicity of poisons applied jointly, **Annals of Applied Biology**, v. 26 (3), 685–615, 1939. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x>.

BOTERO, W.G. Substâncias húmicas: interações com nutrientes e contaminantes. 2010. 75 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2010. <http://hdl.handle.net/11449/105692>.

BOTERO, W.G.; DE OLIVEIRA, L.C.; CUNHA, B.B.; DE OLIVEIRA, L.K.; GOVEIA, D.; ROCHA, J.C.; FRACETO, L.F.; ROSA, A.H. Characterization of the interactions between endocrine disruptors and aquatic humic substances from tropical rivers. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1103–1110, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011000600015>.

BRZOZOWSKI, A.M.; PIKE, A.C.; DAUTER, Z.; HUBBARD, R.E.; BONN, T.; ENGSTROMM, O.; *et al.* Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. **Nature** 389 (6652), p. 753–758, 1997. <https://doi.org/10.1038/39645>.

CASSEE, F.R.; GROTEN, J.P.; VAN BLADEREN, P.J.; FERON, V.J. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 28, n. 1, p. 73–101, 1998. <https://doi.org/10.1080/10408449891344164>.

ČERNÁ, T.; EZECHÍÁŠ, M.; SEMERÁD, J.; GRASSEROVÁ, A.; CAJTHAML, T. Evaluation of estrogenic and antiestrogenic activity in sludge and explanation of individual

compound contributions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 423, n. August 2021, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127108>.

CHEN, L.; SHEN, C.; TANG, X.; CHEN, C.; CHEN, Y. Estrogenic effects of dissolved organic matter and its impact on the activity of 17 β -estradiol. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 2, p. 522–528, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0590-5>.

CHEN, M.; WAIGI, M.G.; LI, S.; SUN, K.; SI, Y. Fungal laccase-mediated humification of estrogens in aquatic ecosystems. **Water Research**, v. 166, p. 115040, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115040>.

CITULSKI, J.; FARAHBAKHS, K. Overcoming the toxicity effects of municipal wastewater sludge and biosolid extracts in the Yeast Estrogen Screen (YES) assay. **Chemosphere**, v. 87, n. 5, p. 498–503, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.043>.

COELLO-GARCIA, T.; CURTIS, T.P.; MROZIK, W.; DAVENPORT, R.J. Enhanced estrogen removal in activated sludge processes through the optimization of the hydraulic flow pattern. **Water Research**, v. 164, p. 114905, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114905>.

COMISSÃO EUROPEIA. Decisão de Execução (UE) 2020/1161 da Comissão, de 4 de agosto de 2020, 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(2020) 5205]. **Jornal Oficial da União Europeia**, L 257, p. 32–35, 2020. http://data.europa.eu/eli/dec_impl/2020/1161/oj.

COMISSÃO EUROPEIA. Decisão de Execução (UE) 2022/679 da Comissão, de 19 de janeiro de 2022, que estabelece uma lista de vigilância das substâncias e dos compostos que suscitem preocupação para a água destinada ao consumo humano tal como previsto na Diretiva (UE) 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho [notificada com o número C(2022) 142]. **Jornal Oficial da União Europeia**, L 124, p. 41–43, 2022. http://data.europa.eu/eli/dec_impl/2022/679/oj.

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, n. 12, p. 2608–2615, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.02.034>.

DIAS, R.V.A. Avaliação da ocorrência de microcontaminantes emergentes em sistemas de abastecimento de água e da atividade estrogênica do estinilestradiol. Dissertação de Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2014. www.smarh.eng.ufmg.br/diss_defesas_detalhes.php?aluno=1089.

DINGEMANS, M.M.L.; BAKEN, K.A.; VANDEROOST, R.; SCHRIKS, M.; VANWEZEL, A.P. Risk-based approach in the revised European Union drinking water legislation: Opportunities for bioanalytical tools. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 15, n. 1, 2019. <https://doi.org/10.1002/ieam.4096>.

DU, B.; FAN, G.; YU, W.; YANG, S.; ZHOU, J.; LUO, J. Occurrence and risk assessment of steroid estrogens in environmental water samples: A five-year worldwide perspective. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115405, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115405>.

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. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 59, n. 1, p. 147–156, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9429-1>.

ESCHER, B.I.; AÏT-AÏSSA, S.; BEHNISCH, P.A. *et al.* Effect-based trigger values for in vitro and in vivo bioassays performed on surface water extracts supporting the environmental quality standards (EQS) of the European Water Framework Directive. **Science of the Total Environment**, v. 628–629, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.340>.

EZECHIAŠ, M. Combinations of a full and partial agonist: Experimental evidence of curved isoboles. **Toxicology Letters**, v. 350, p. 22–29, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.06.016>.

EZECHIAŠ, M.; CAJTHAML, T. Novel full logistic model for estimation of the estrogenic activity of chemical mixtures. **Toxicology**, v. 359–360, p. 58–70, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.06.017>.

FERNANDES, J.G. Ocorrência de poluentes emergentes nos rios Piraí, Paraíba do Sul, Guandu e na água de abastecimento da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado em Biotecnologia Industrial. Universidade de São Paulo. Lorena, 2018. <https://doi.org/10.11606/T.97.2019.tde-28052019-142211>.

FLORIPES, T.C.; AQUINO, S.F.; QUARESMA, A.V.; AFONSO, R.J.C.F.; CHERNICHARO, C.A.L.; SOUZA, C.L. Ocorrência de fármacos e desreguladores endócrinos em esgoto bruto e tratado na cidade de Belo Horizonte (MG). **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 23, n. 6, p. 1199–1211, 2018. <https://doi.org/10.1590/S1413-41522018177703>.

FRANÇA, F.M.O. Avaliação de atividade estrogênica e toxicidade de lixiviados de resíduos sólidos urbanos. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2016. <http://www.bdt.d.uerj.br/handle/1/11031>.

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). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n. 5, p. 593–603, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0184-7>.

FROEHNER, S.; PICCIONI, W.; MACHADO, K.S.; AISSE, M.M. Removal Capacity of Caffeine, Hormones, and Bisphenol by Aerobic and Anaerobic Sewage Treatment. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 216, p. 463–471, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0545-3>.

GAO, L.; TU, Y.; ÅGREN, H.; ERIKSSON, L.A. Characterization of agonist binding to His524 in the estrogen receptor α ligand binding domain. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 16, p. 4823–4830, 2012. <https://doi.org/10.1021/jp300895g>.

GEA, M.; TOSO, A.; SCHILIRÒ, T. Estrogenic activity of biological samples as a biomarker. **Science of the Total Environment**, v. 740, p. 140050, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140050>.

GOMES, G. 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 de Doutorado em Engenharia Ambiental. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2020. <http://www.btd.uerj.br/handle/1/16953>.

GÓMEZ, L. NIEGOWSKA, M.; NAVARRO, A. *et al.* Estrogenicity of chemical mixtures revealed by a panel of bioassays. **Science of the Total Environment**, v. 785, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147284>.

HAMID, N.; JUNAID, M.; PEI, D. Ecotoxicology and Environmental Safety Combined toxicity of endocrine-disrupting chemicals: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 215, p. 112136, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112136>.

HETTWER, K.; JÄHNE, M.; FROST, K. *et al.* Validation of Arxula Yeast Estrogen Screen assay for detection of estrogenic activity in water samples: Results of an international interlaboratory study. **Science of the Total Environment**, v. 621, p. 612–625, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.211>.

HO, V.; PELLAND-ST-PIERRE, L.; GRAVEL, S.; BOUCHARD, M.F.; VERNER, M.A.; LABRÈCHE, F. Endocrine disruptors: Challenges and future directions in epidemiologic research. **Environmental Research**, v. 204, n. August 2021, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111969>.

HUANG, Y.; XIE, X.; ZHOU, L.J.; JI, X.; GAO, B.; XU, G.Z.; LI, A. Multi-phase distribution and risk assessment of endocrine disrupting chemicals in the surface water of the Shaying River, -Huai River Basin, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 173, n. September 2018, p. 45–53, 2019a. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.016>.

HUANG, Y.; LI, W.; QIN, L.; XIE, X.; GAO, B.; SUN, J.; LI, A. Distribution of endocrine-disrupting chemicals in colloidal and soluble phases in municipal secondary effluents and their removal by different advanced treatment processes. **Chemosphere**, v. 219, p. 730–739, 2019b. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.201>.

IHARA, M.; IHARA, M.O.; KUMAR, V.; NARUMIYA, M.; HANAMOTO, S.; NORIHIDE, N.; YAMASHITA, N.; MIYAGAWA, S.; IGUCHI, T.; TANAKA, H. Co-occurrence of estrogenic and antiestrogenic activities in wastewater: Quantitative evaluation of balance by in vitro ER α reporter gene assay and chemical analysis. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 11, p. 6366–6373, 2014. <https://doi.org/10.1021/es5014938>.

ITZEL, F.; GEHRMANN, L.; TEUTENBERG, T.; SCHMIDT, T.C.; TUERK, J. Recent developments and concepts of effect-based methods for the detection of endocrine activity and the importance of antagonistic effects. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 699–708, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.030>.

JAHNEL, J.B.; FRIMMEL, F.H. Comparison of the enzyme inhibition effect of different humic substances in aqueous solutions. **Chemical Engineering and Processing**, v. 33, n. 5, p. 325–330, 1994. [https://doi.org/10.1016/0255-2701\(94\)02003-5](https://doi.org/10.1016/0255-2701(94)02003-5).

JOHNSON, C.M.; ACHARY, M.; SURI, R.P. An interaction model for estimating in vitro estrogenic and androgenic activity of chemical mixtures. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 9, p. 4661–4669, 2013. <https://doi.org/10.1021/es304939c>.

JONKER, M.J.; SVENDSEN, C.; BEDAUX, J.J.M.; BONGERS, M.; KAMMENGA, J.E. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 2701–2713, 2005. <https://doi.org/10.1897/04-431R.1>.

KABIR, E.R.; RAHMAN, M.S.; RAHMAN, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 241–258, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>.

KALMYKOVA, Y.; BJÖRKLUND, K.; STRÖMVALL, A.M.; BLOM, L. Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons, alkylphenols, bisphenol A and phthalates in landfill leachates and stormwater. **Water Research**, v. 47, n. 3, p. 1317–1328, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.054>.

KAMATA, R.; SHIRAISHI, F.; NAKAJIMA, D.; KAGEYAMA, S.. Estrogenic effects of leachates from industrial waste landfills measured by a recombinant yeast assay and transcriptional analysis in Japanese medaka. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 2, p. 430–437, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.11.018>.

KATZUNG, B.W.; MASTERS, S.B.; TREVOR, A.J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12. ed. AMGH, 2014.

KOLLE, S.N., KAMP, H.G., HUENER, H.A., KNICKEL, J., VERLOHNER, A., WOITKOWIAK, C., LANDSIEDEL, R., VAN RAVENZWAAY, B. In house validation of recombinant yeast estrogen and androgen receptor agonist and antagonist screening assays. **Toxicology in Vitro**. V.24, p. 2030–2040, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.08.008>.

KOMOLAFE, O., MROZIK, W., DOLFING, J., ACHARYA, K., VASSALLE, L., MOTA, C.R., DAVENPORT, R. Occurrence and removal of micropollutants in full-scale aerobic, anaerobic and facultative wastewater treatment plants in Brazil. **Journal of Environmental Management**. v. 287, 112286, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112286>.

KOVACEVIC, V.; SIMPSON, A.J.; SIMPSON, M.J. The concentration of dissolved organic matter impacts the metabolic response in *Daphnia magna* exposed to 17 α -ethynylestradiol and

perfluorooctane sulfonate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, n. December 2018, p. 468–478, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.008>.

KUNZ, P.; SIMON, E.; CREUSOT, N. *et al.* Effect-based tools for monitoring estrogenic mixtures: Evaluation of five in vitro bioassays. **Water Research**, v. 110, p. 378–388, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.10.062>.

LAI, K.M.; JOHNSON, K.L.; SCRIMSHAW, M.D.; LESTER, J.N. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. **Environmental Science and Technology**, v. 34, n. 18, p. 3890–3894, 2000. <https://doi.org/10.1021/es9912729>.

LEE, J.H.; ZHOU, J.L.; KIM, S.D. Effects of biodegradation and sorption by humic acid on the estrogenicity of 17 β -estradiol. **Chemosphere**, v. 85, n. 8, p. 1383–1389, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.003>.

LEE, J.; CHO, J.; KIM, S.H.; KIM, S.D. Influence of 17B-estradiol binding by dissolved organic matter isolated from wastewater effluent on estrogenic activity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1280–1287, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.02.010>.

LEUSCH, F.D.L.; NEALE, P.A.; ARNAL, C.; *et al.* Analysis of endocrine activity in drinking water, surface water and treated wastewater from six countries. **Water Research**, v. 139, p. 10–18, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.056>.

LI, J.; HAO, X.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; LIU, R. Relieving the inhibition of humic acid on anaerobic digestion of excess sludge by metal ions. **Water Research**, v. 188, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116541>.

LIMA, L.S.M.S.; DE ALMEIDA, R.; QUINTAES, B.R.; BILA, D.M.; CAMPOS, J.C. Evaluation of humic substances removal from leachates originating from solid waste landfills in Rio de Janeiro State, Brazil. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 52, n. 9, p. 828–836, 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2017.1312182>.

LOEWE, S.; MUISCHNEK, H. Über Kombinationswirkungen. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, v. 114, 313–326, 1926. <https://doi.org/10.1007/BF01952257>.

LUO, Y.; GUO, W.; NGO, H.H.; NGHIEM, L.D.; HAI, F.I.; ZHANG, J.; LIANG, S.; WANG, X.C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 473–474, p. 619–641, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>.

MA, L.; YATES, S.R. Dissolved organic matter and estrogen interactions regulate estrogen removal in the aqueous environment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 640–641, p. 529–542, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.301>.

MARTIN, O.; SCHOLZE, M.; ERMLER, S.; MCPHIE, J.; BOPP, S.K.; KIENZLER, A.; PARISSIS, N.; KORTENKAMP, A. Ten years of research on synergisms and antagonisms in

chemical mixtures: A systematic review and quantitative reappraisal of mixture studies. **Environment International**, v. 146, n. October 2020, p. 106206, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106206>.

MARTYNIUK, C.J.; MARTÍNEZ, R.; NAVARRO-MARTÍN, L.; KAMSTRA, J.H.; SCHWENDT, A.; REYNAUD, S.; CHALIFOUR, L. Emerging concepts and opportunities for endocrine disruptor screening of the non-EATS modalities. **Environmental Research**, v. 204, n. May 2021, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111904>.

MATILAINEN, A.; GJESSING, E.T.; LAHTINEN, T.; HED, L.; BHATNAGAR, A.; SILLANPÄÄ, M. An overview of the methods used in the characterisation of natural organic matter (NOM) in relation to drinking water treatment. **Chemosphere**, v. 83, n. 11, p. 1431–1442, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.018>.

MICHAEL-KORDATOU, I.; MICHAEL, C.; DUAN, X.; HE, X.; DIONYSIOU, D.D.; MILLS, M.A.; FATTA-KASSINOS, D. Dissolved effluent organic matter: Characteristics and potential implications in wastewater treatment and reuse applications. **Water Research**, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.011>.

MONTAGNER, C.C.; SODRÉ, F.F.; AKAYABA, R.D.; VIDAL, C.; CAMPESTRINI, I.; LOCATELLI, M.A.; PESCARA, I.C.; ALBUQUERQUE, A.F.; UMBUZEIRO, G.A.; JARDIM, W.F. Ten years-snapshot of the occurrence of emerging contaminants in drinking, surface and ground waters and wastewaters from São Paulo State, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 3, p. 614–632, 2019. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180232>.

NEALE, P.A.; ESCHER, B.I. Does co-extracted dissolved organic carbon cause artefacts in cell-based bioassays? **Chemosphere**, v. 108, p. 281–288, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.053>.

NEALE, P.A.; ESCHER, B.I.; LEUSCH, F.D.L. Understanding the implications of dissolved organic carbon when assessing antagonism in vitro: An example with an estrogen receptor assay. **Chemosphere**, v. 135, p. 341–346, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.084>.

NEALE, P.A.; ESCHER, B.I.; SCHÄFER, A.I. Quantification of solute-solute interactions using negligible-depletion solid-phase microextraction: Measuring the affinity of estradiol to bulk organic matter. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 8, p. 2886–2892, 2008. <https://doi.org/10.1021/es0717313>.

NGUYEN, P.Y.; CARVALHO, G.; REIS, M.A.M.; OEHMEN, A. A review of the biotransformations of priority pharmaceuticals in biological wastewater treatment processes. **Water Research**, v. 188, p. 116446, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116446>.

NIE, M.; YAN, C.; DONG, W.; LIU, M.; ZHOU, J.; YANG, Y. Occurrence, distribution and risk assessment of estrogens in surface water, suspended particulate matter, and sediments of

the Yangtze Estuary. **Chemosphere**, v. 127, p. 109–116, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.021>.

PEREIRA, C.P.; PEREIRA, T.C; GOMES, G.; QUINTAES, B.R.; BILA, D.M.; CAMPOS, J.C. Evaluation of reduction estrogenic activity in the combined treatment of landfill leachate and sanitary sewage. **Waste Management**, v. 80, p. 339–348, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.018>.

PESSÔA, C.A.; JORDÃO, E.P. **Tratamento de esgotos domésticos**. 8. ed. Rio de Janeiro, ABES, 2014.

PESSOA, G.P.; SOUZA, N.C.; VIDAL, C.B.; ALVES, J.A.C.; FIRMINO, P.I.M.; NASCIMENTO, R.F.; SANTOS, A.B. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 288–295, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.008>.

PETOSA, A.R.; NOWIERSKI, M.; YARGEAU, V. Assessing Performance of Wastewater Treatment Using in Vitro Cell-based Assays. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 1, p. 21–36, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00244-021-00900-9>.

RAMIREZ, T.; BUECHSE, A.; DAMMANN, M.; MELCHING-KOLLMUSS, S.; WOITKOWIAK, C.; VAN RAVENZWAAY, B. Effect of estrogenic binary mixtures in the yeast estrogen screen (YES). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 286–296, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.07.006>.

REN, D.; HUANG, B.; XIONG, D.; HE, H.; MENG, Xiangqi; PAN, X.. Photodegradation of 17 α -ethynylestradiol in dissolved humic substances solution: Kinetics, mechanism and estrogenicity variation. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 54, p. 196–205, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2016.03.002>.

RIEGRAF, C.; REIFFERSCHIED, G.; MOSCOVICI, L.; SHAKIBAI, D.; HOLLERT, H.; BELKIN, S.; BUCHINGER, S. Coupling high-performance thin-layer chromatography with a battery of cell-based assays reveals bioactive components in wastewater and landfill leachates. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 214, p. 1–14, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112092>.

ROSENMAI, A.K.; NISS, F.; MANDAVA, G.; LUNDQVIST, J.; OSKARSSON, A. Impact of natural organic matter in water on in vitro bioactivity assays. **Chemosphere**, v. 200, p. 209–216, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.081>.

ROUTLEDGE, E.J.; SUMPTER, J.P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. **Env. Toxicol. Chem.**, v. 15, n. 3, p. 241–248, 1996. [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).

SAFE, S.H. Hazard and risk assessment of chemical mixtures using the toxic equivalency factor approach. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. SUPPL. 4, p. 1051–1058, 1998. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106s41051>.

SALES JUNIOR, S.F.; MANNARINO, C.F.; BILA, D.M.; TAVEIRA PARENTE, C. E.; CORREIA, F.V.; SAGGIORO, E.M. Lethal and long-term effects of landfill leachate on *Eisenia andrei* earthworms: Behavior, reproduction and risk assessment. **Journal of Environmental Management**, v. 285, n. November 2020, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112029>.

SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N.; LÓPEZ DE ALDA, M.J.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ, D.; BARCELÓ, D. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting chemicals in airborne particles. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 66, p. 45–52, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.006>.

SCHILD, H.O. pAx and competitive drug antagonism. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 4, n. 3, p. 277–280, 1949. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1949.tb00548.x>.

SCHUIJT, L.M.; PENG, F.J.; VAN DEN BERG, S.J.P.; DINGEMANS, M.M.L.; VAN DEN BRINK, P.J. (Eco)toxicological tests for assessing impacts of chemical stress to aquatic ecosystems: Facts, challenges, and future. **Science of the Total Environment**, v. 795, p. 148776, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148776>.

SHAPPELL, N.W. Use of fixed ratios in mixture studies, in vitro evidence of issues. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 14, n. 3, p. 420–422, 2018. <https://doi.org/10.1002/ieam.4038>.

SHULIAKEVICH, A.; SCHROEDER, K.; NAGENGAST, L.; WOLF, Y.; BRÜCKNER, I.; MUZ, M.; BEHNISCH, P.A.; HOLLERT, H.; SCHIWY, S. Extensive rain events have a more substantial impact than advanced effluent treatment on the endocrine-disrupting activity in an effluent-dominated small river. **Science of the Total Environment**, v. 807, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150887>.

SKLEDAR, D.G.; MAŠIČ, L.P. In vitro estrogenic activity of binary and multicomponent mixtures with bisphenol A. **Science of the Total Environment**, v. 707, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135211>.

STARLING, M.C.V.M.; AMORIM, C.C.; LEÃO, M.M.D. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 372, n. April 2018, p. 17–36, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.043>.

STEVENSON, F. J. **Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions**. 2. ed. New York, John Wiley, 1994.

ŠÍR, M.; PODHOLA, M.; PATOCKA, T.; HONZAJKOVA, Z.; KOCUREK, P.; KUBAL, M.; KURAS, M. **The effect of humic acids on the reverse osmosis treatment of hazardous landfill leachate**. *Journal of Hazardous Materials* 207–208 (2012) 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.079>.

TANG, Z.; LIU, Z.H.; WANG, H.; DANG, Z.; LIU, Y. Occurrence and removal of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in municipal wastewater treatment plants: Current status and challenges. **Chemosphere**, v. 271, p. 129551, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129551>.

TEIXEIRA, R.B.; MARQUES, C.A.; CARVALHO, N.R.; GOMES, L.E.T.; SILVA, F.T.; PAIVA, T.C.B. Determinação de hormônios estrogênicos em esgoto bruto e efluente de uma estação descentralizada de tratamento por lodos ativados. **Revista Ambiente e Água**, v. 13, n. 2, e2059, 2018. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2059>.

TOMING, K.; LUVIKENE, L.; VILBASTE, S.; AGASILD, H.; VIK, M.; KISAND, A.; FELDMANN, T.; MARTMA, T.; JONES, R.I.; NÕGES, T. Contributions of autochthonous and allochthonous sources to dissolved organic matter in a large, shallow, eutrophic lake with a highly calcareous catchment. **Limnology and Oceanography**, v. 58, n. 4, p. 1259–1270, 2013. <https://doi.org/10.4319/lo.2013.58.4.1259>.

TONG, X.; LI, Y.; ZHANG, F.; CHEN, X.; ZHAO, Y.; HU, B.; ZHANG, X. Adsorption of 17 β -estradiol onto humic-mineral complexes and effects of temperature, pH, and bisphenol A on the adsorption process. **Environmental Pollution**, v. 254, p. 112924, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.092>.

VANDERMARKEN, T.; CROES, K.; VAN LANGENHOVE, K.; BOONEN, I.; SERVAIS, P.; GARSIA-ARMISEN, T.; BRION, N.; DENISON, M.S.; GOEYENS, D.; ELSKENS, M. Endocrine activity in an urban river system and the biodegradation of estrogen-like endocrine disrupting chemicals through a bio-analytical approach using DRE- and ERE-CALUX bioassays. **Chemosphere**, v. 201, p. 540–549, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.036>.

VEGA-MORALES, T.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, 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, p. 1–15, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/790570>.

WANGMO, C.; JARQUE, S.; HILSCEROVÁ, K.; BLÁHA, L.; BITTNER, M. In vitro assessment of sex steroids and related compounds in water and sediments—a critical review. **Environmental Science: Processes and Impacts**, v. 20, n. 2, p. 270–287, 2018. <https://doi.org/10.1039/c7em00458c>.

WESTLUND, P.; YARGEAU, V. Investigation of the presence and endocrine activities of pesticides found in wastewater effluent using yeast-based bioassays. **Science of the Total Environment**, v. 607–608, p. 744–751, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.032>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.370>.

YOO, J.; HUR, J.; JUNG, J. Identification of oxidative stress and estrogenic activity induced by polarity fractions of effluent organic matter. **Journal of Hazardous Materials**, v. 375, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.05.008>.

YU, H.; CALDWELL, D.J.; SURI, R.P. In vitro estrogenic activity of representative endocrine disrupting chemicals mixtures at environmentally relevant concentrations. **Chemosphere**, v. 215, p. 396–403, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.067>.

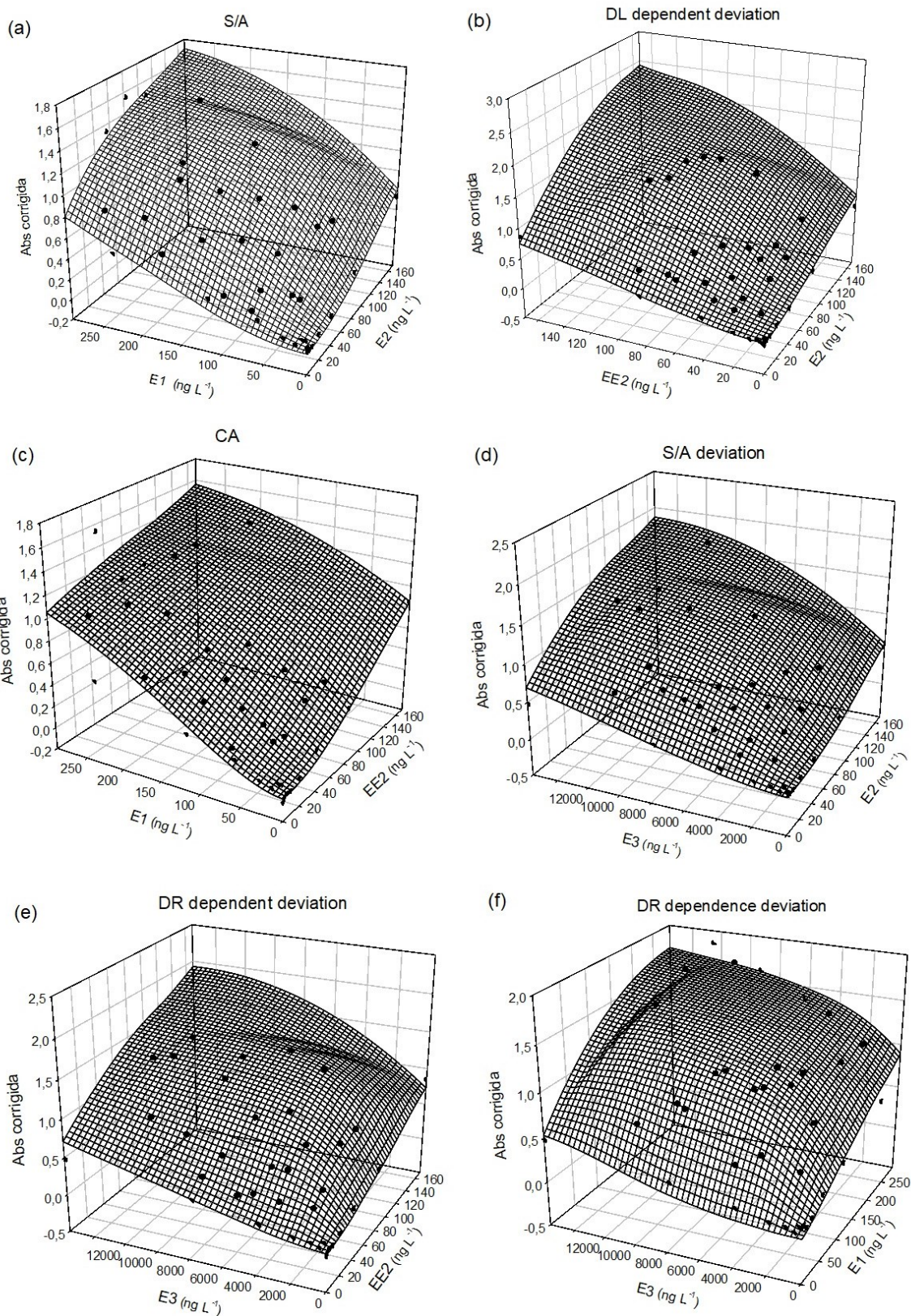
YUAN, S.; HUANG, C.; JI, X.; MA, M.; RAO, K.; WANG, Z. Prediction of the combined effects of multiple estrogenic chemicals on MCF-7 human breast cancer cells and a preliminary molecular exploration of the estrogenic proliferative effects and related gene expression. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 160, n. March, p. 1–9, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.025>.

ZHANG, J.; LIU, R.; NIU, L.; ZHU, S.; ZHANG, Q.; ZHAO, M.; LIU, W.; LIU, J. Determination of endocrine-disrupting potencies of agricultural soils in China via a battery of steroid receptor bioassays. **Environmental Pollution**, v. 234, p. 846–854, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.004>.

ZHANG, Y.Z.; MENG, W.; ZHANG, Y. Occurrence and partitioning of phenolic endocrine-disrupting chemicals (EDCs) between surface water and suspended particulate matter in the north Tai Lake Basin, Eastern China. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 92, n. 2, p. 148–153, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1136-y>.

ZHU, D.; HYUN, S.; PIGNATELLO, J.J.; LEE, L.S. Evidence for π - π Electron Donor–Acceptor Interactions between π -Donor Aromatic Compounds and π -Acceptor Sites in Soil Organic Matter through pH Effects on Sorption. **Environmental Science and Technology**, v 38 (16), p. 4361–4368, 2004. <https://doi.org/10.1021/es035379e>.

APÊNDICE 1 – Superfícies e dados experimentais dos modelos mais significativos obtidos para as misturas de estrogênios

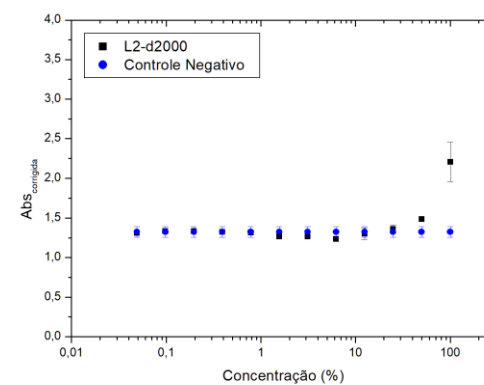
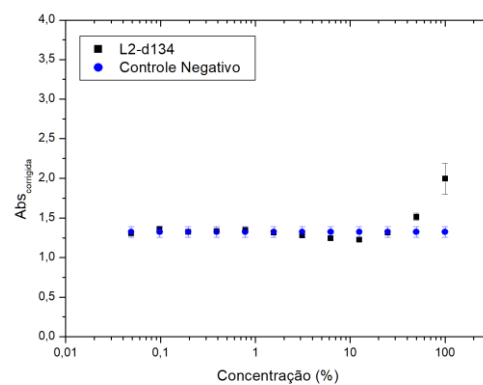
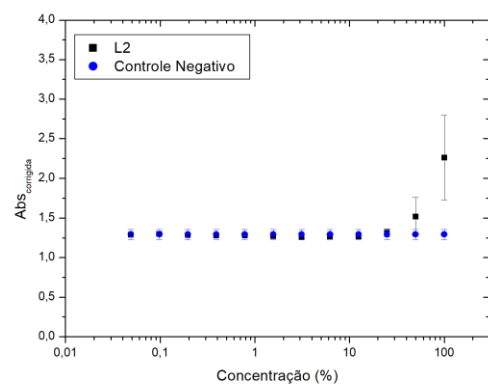
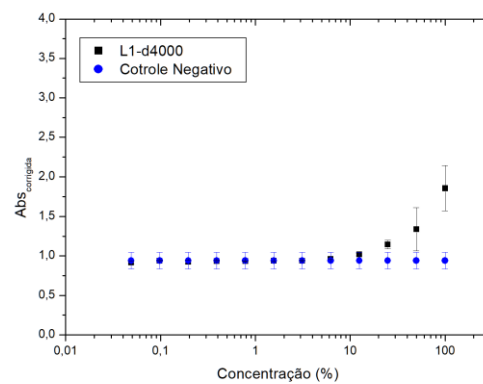
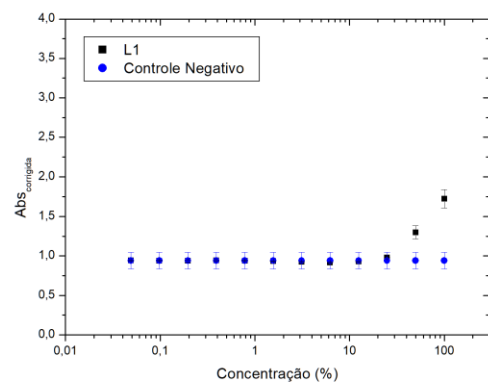


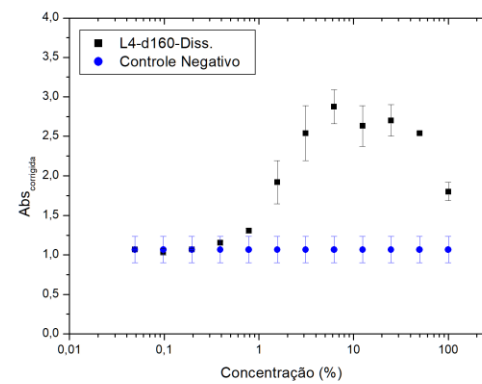
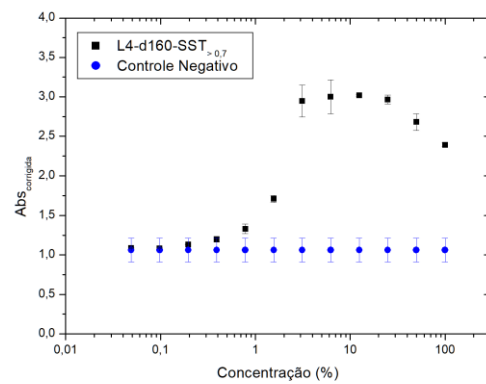
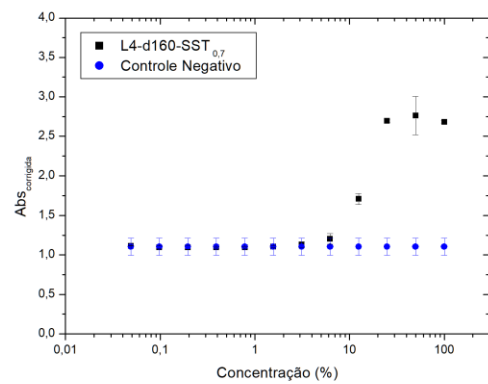
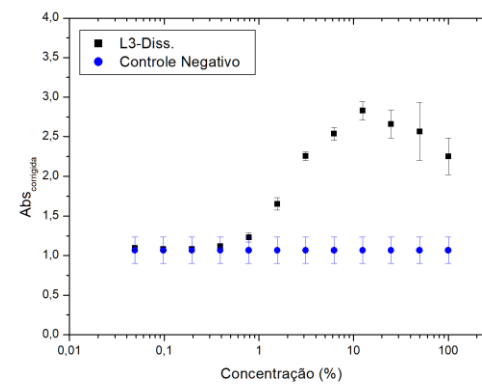
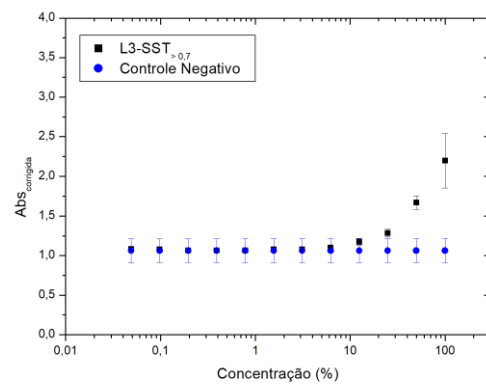
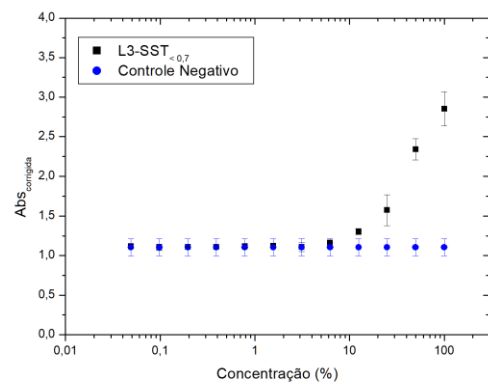
(a) Modelo de sinergismo para a mistura E2+E1; (b) Modelo de sinergismo dependente do nível da dose para a mistura E2+EE2; (c) Modelo de adição de concentração para a mistura EE2+E1; (d) Modelo de sinergismo para a mistura E2+E3; (e) Modelo de sinergismo dependente da proporção da dose para a mistura EE2+E3; (f) Modelo de sinergismo dependente da proporção da dose para a mistura E1+E3. Fonte: O autor, 2022.

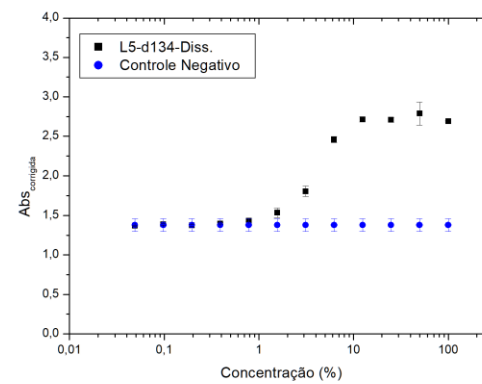
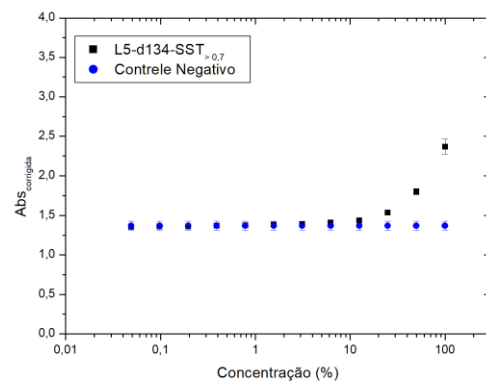
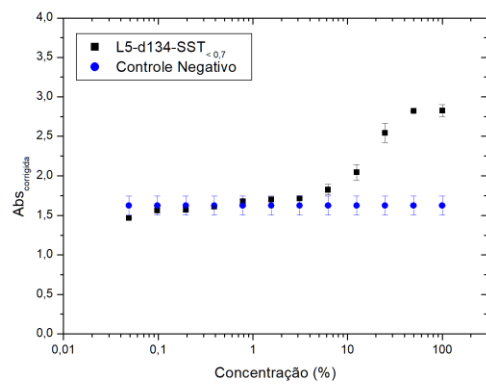
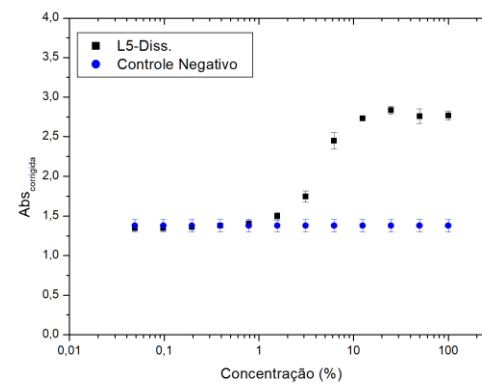
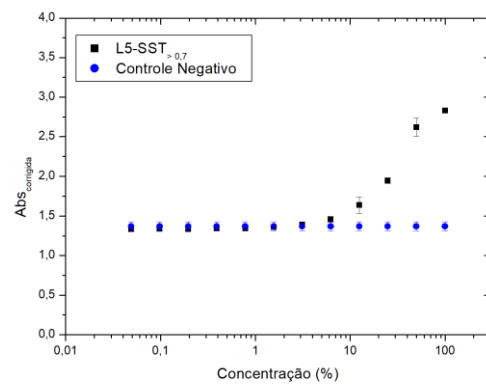
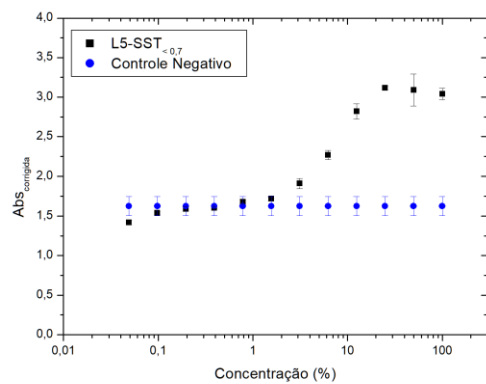
APÊNDICE 2 – Síntese dos resultados de atividade estrogênica e antiestrogênica obtidos com o ensaio YES para amostras ambientais.

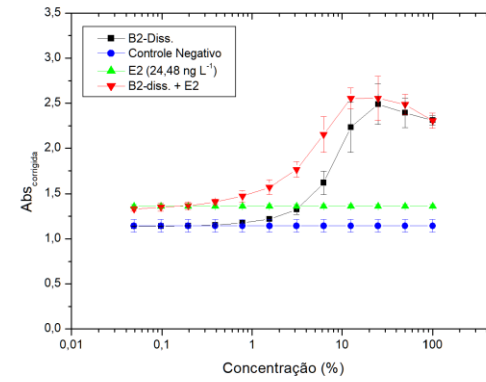
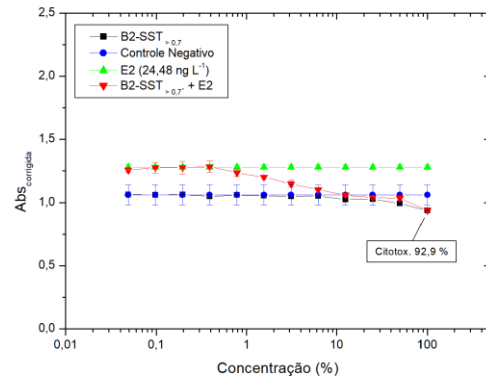
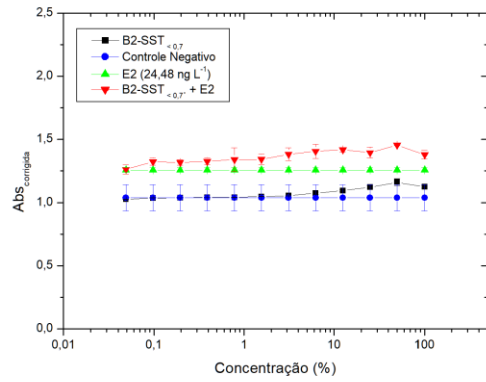
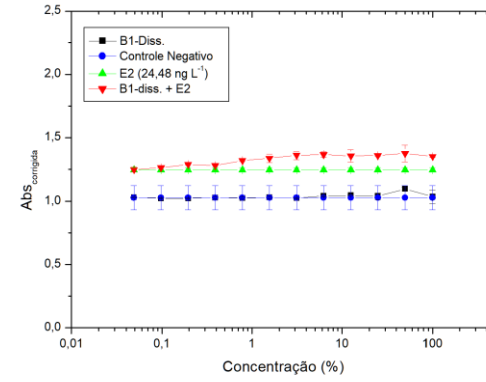
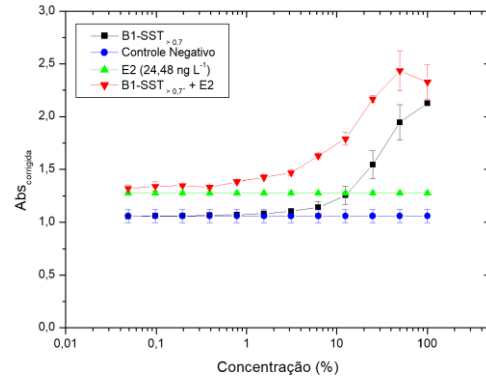
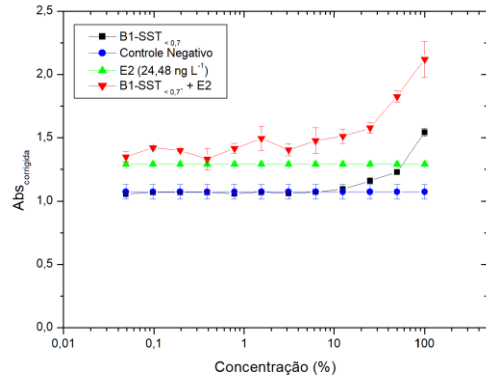
Amostra	Atividade Estrogênica (Eq-E2)							Citotoxicidade máxima (%)	Atividade Antiestrogênica (qualitativa)		
	Diss.	SST < 0,7 µm		SST > 0,7 µm		Total	Diss.		SST<0,7	SST>0,7	
	(ng L ⁻¹)	(%)	(ng L ⁻¹)	(%)	(ng L ⁻¹)	(%)					Eq-E2 (ng L ⁻¹)
Lixiviado de Aterro Sanitário de Resíduos Sólidos Urbanos											
L1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2592 ± 213	-	NA	NA	NA
L1-d4000							4280 ± 368	14,3			
L2							1505 ± 511	-			
L2-d2000							1736 ± 605	-			
L2-d134							1447 ± 121	-			
L3	1152 ± 59	77	301 ± 5,6	20	41 ± 4,1	3	1494 ± 60	-			
L4-d160	1539 ± 73	49	545 ± 6,6	17	1041 ± 33	33	3125 ± 80	-			
L5	407 ± 69	32	823 ± 85	65	43 ± 19	3	1282 ± 111	15,7 (SST>0,7)			
L5-d134	472 ± 42	30	1080 ± 130	69	10 ± 6	1	1561 ± 137	7,8 (SST>0,7)			
Afluente de Estação de Tratamento de Esgoto											
B1	< LD	-	7,0 ± 0,2	47	8,0 ± 1,3	53	15,0 ± 1,3	-	E	-	-
B2	28,8 ± 2,3	100	< LD	-	Tox.	-	28,8 ± 2,3	92,9 (SST>0,7)	-	E	A
B3	41,4 ± 0,8	100	< LD	-	Tox.	-	41,4 ± 0,8	22,6 (SST>0,7)	-	-	E, A
B4	20,8 ± 1,5	100	< LD	-	Tox.	-	20,8 ± 1,5	21,1 (SST>0,7)	-	-	A
BC	12,1 ± 0,9	100	< LD	-	Tox.	-	26,8 ± 0,9	92,7 (SST>0,7)	-	E, A	E, A
Efluente de Estação de Tratamento de Esgoto											
T1	< LD	-	2,3 ± 0,2	100	< LD	-	2,3 ± 0,2	-	A	-	E, A
T2	< LD	-	< LD	-	< LD	-	< LD	-	E, A	E, A	E
T3	< LD	-	0,8 ± 0,1	34	1,5 ± 0,01	66	2,3 ± 0,1	-	E	-	-
T4	0,7 ± 0,1	35	< LD	-	1,4 ± 0,04	65	2,1 ± 0,1	-	-	E	-
TC	26,5 ± 1,6	95	1,5 ± 0,1	5	< LD	-	28,0 ± 1,6	-	-	-	E

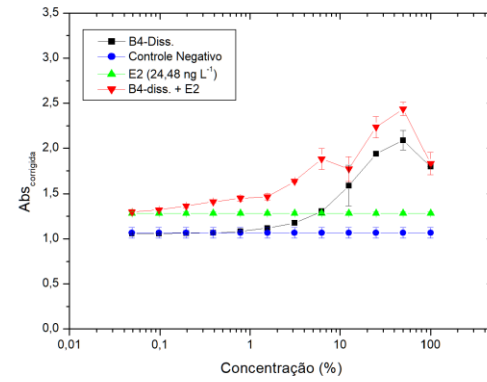
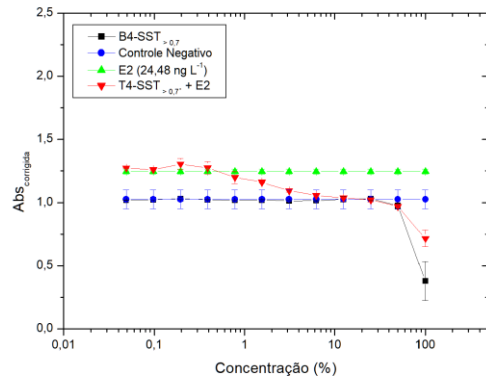
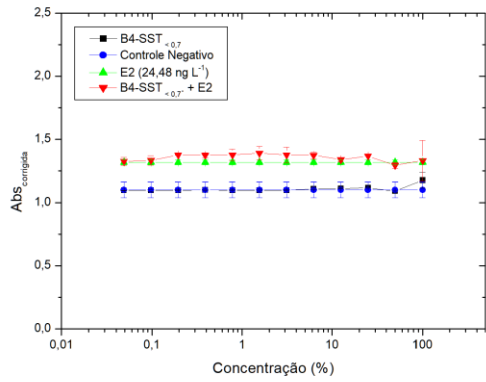
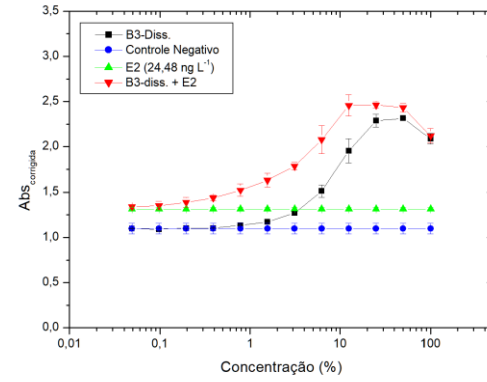
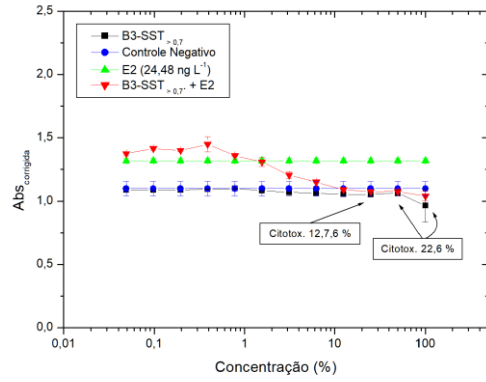
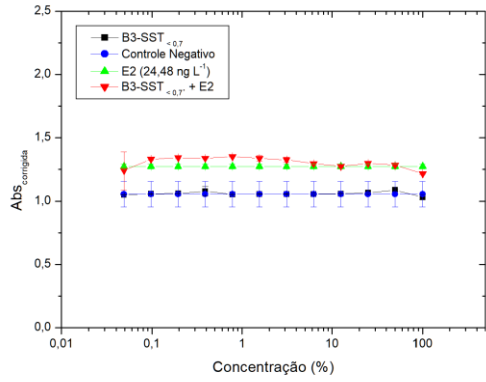
Eq-E2: Equivalente-estradiol; **Diss.:** Fase dissolvida; **SST:** Sólidos Suspensos Totais; **LD:** Limite de detecção; **NA:** Não analisado; **E:** atividade estrogênica observada; **A:** Atividade antiestrogênica observada; **Tox.:** Citotoxicidade impossibilitou o cálculo do Eq-E2; (-) Não se aplica. Fonte: O autor, 2022.

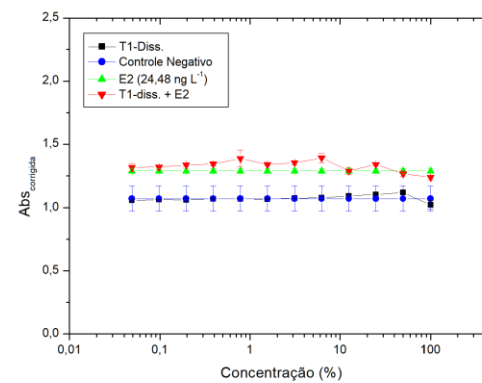
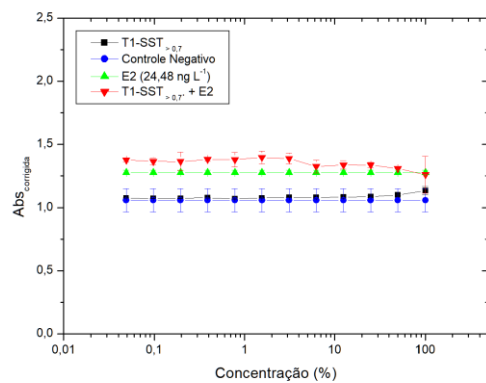
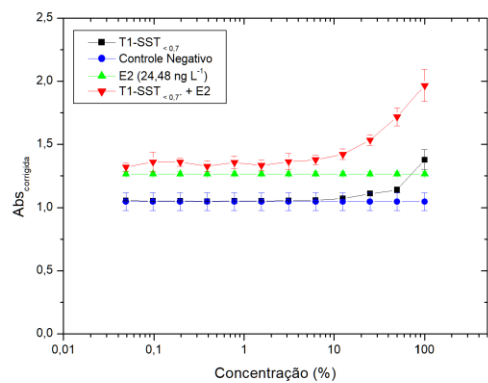
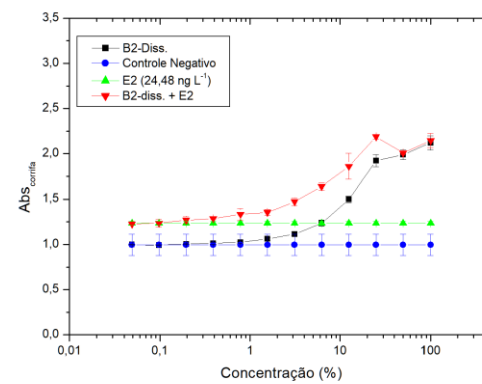
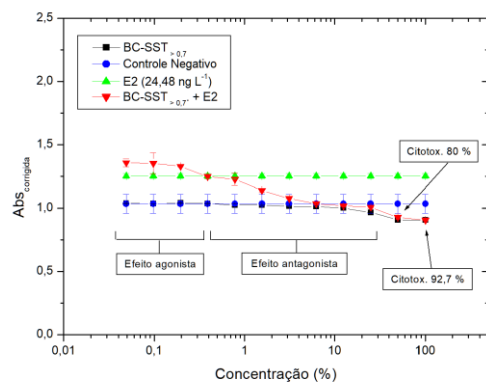
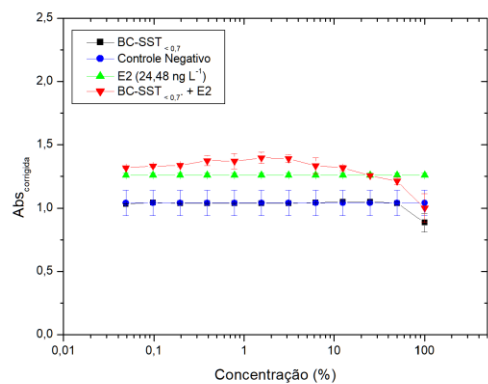
APÊNDICE 3 – Curvas dose-resposta das amostras ambientais avaliadas com o ensaio YES para atividade estrogênica e antiestrogênica.

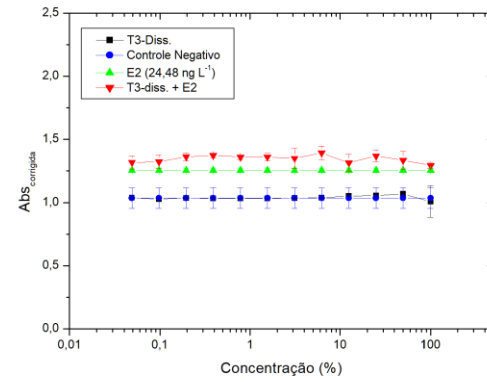
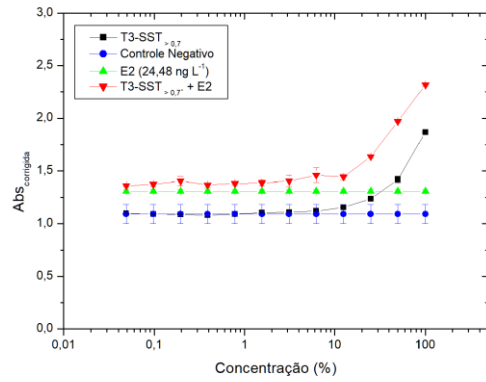
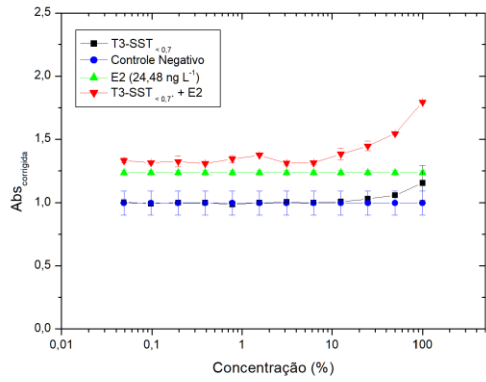
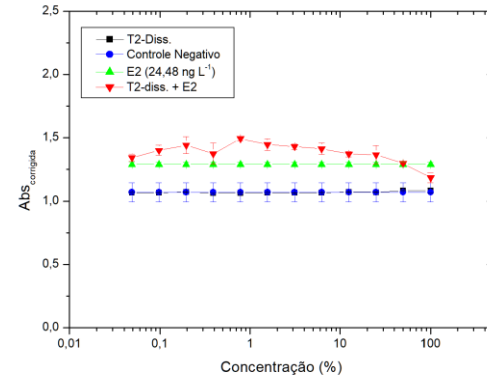
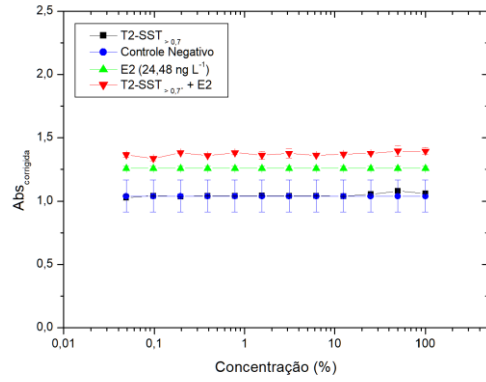
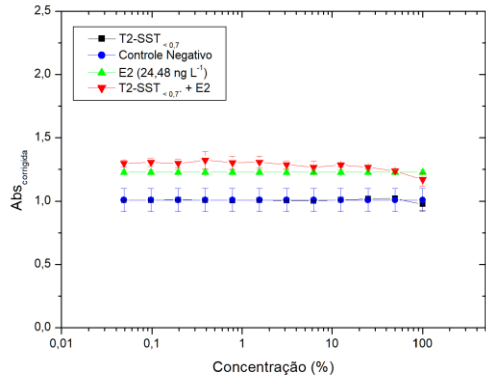


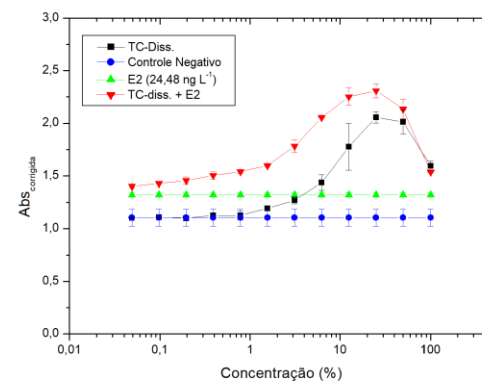
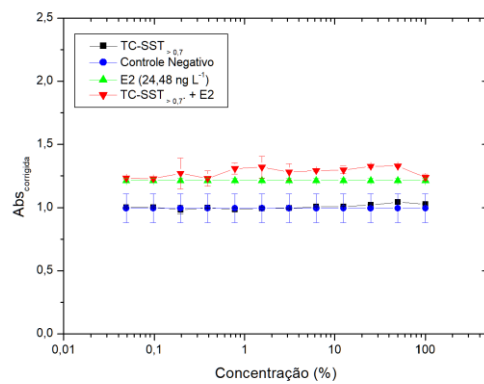
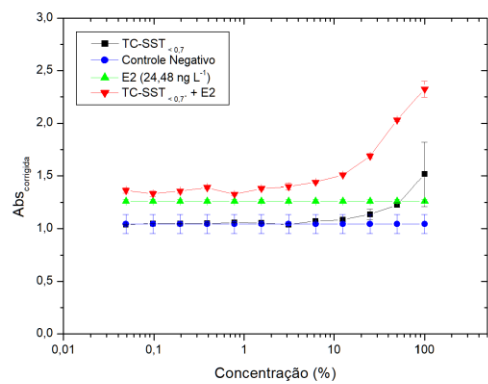
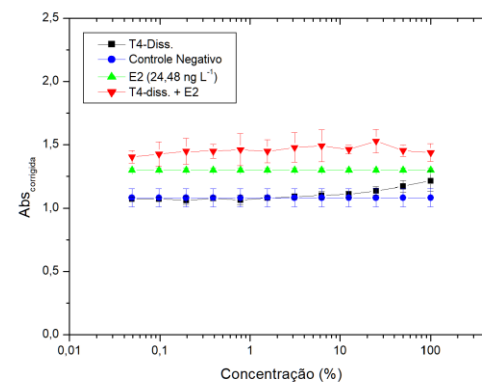
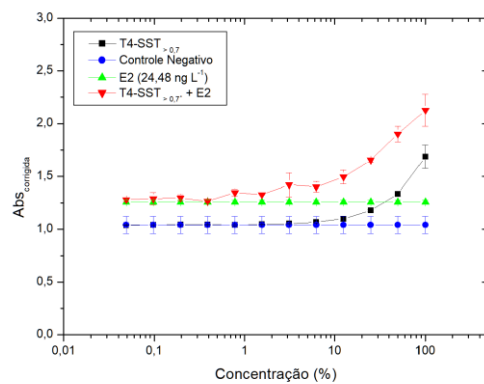
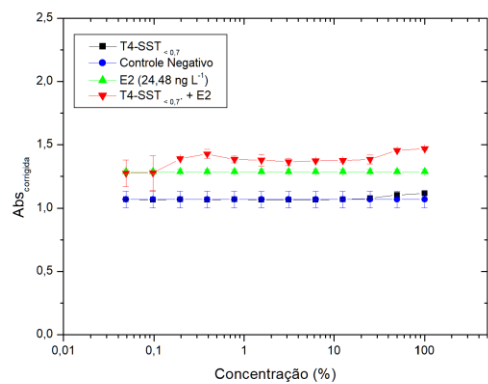












ANEXO 1 – Preparo de soluções do ensaio YES (Gomes, 2020)

Meio mínimo

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

13,61 g de KH_2PO_4

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

4,2 g de KOH

0,2 g de 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 mL^{-1} , com água ultrapura.

Solução de L-treonina

A solução estoque foi preparada na concentração de 24 mg 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.

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- β -D-galactopiranosida)

Foi adicionado diretamente ao meio de cultivo, na concentração de 10 mg L⁻¹.

Meio de Cultivo

5 mL de solução de glicose

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 μ 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⁻¹) + CPRG (100 mg L⁻¹)

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 μ 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.