

Remoção da citotoxicidade no ensaio de atividade estrogênica (YES) para amostras de sedimento lagunar: Métodos de extração e efeito matriz





Cytotoxicity removal in the estrogenic activity assay (YES) for lagoon sediment samples: Extraction methods and matrix effect

- **Data de entrada:** 03/03/2020
- **Data de aprovação:** 05/09/2022

Louise da Cruz Felix^{1*} | Allan dos Santos Argolo¹ | Giselle Gomes³ | Ana Dalva de Oliveira Santos² | Danieli Lima da Cunha² | Marília Teresa Lima do Nascimento² | Estefan Monteiro da Fonseca² | José Antônio Baptista Neto² | Daniele Maia Bila¹

DOI: <https://doi.org/10.36659/dae.2023.051>

ORCID ID

Felix LC  <https://orcid.org/0000-0002-3497-8598>
Argolo AS  <https://orcid.org/0000-0001-7010-695X>
Gomes G  <https://orcid.org/0000-0001-7067-8739>
Santos ADO  <https://orcid.org/0000-0002-6294-6833>

Cunha DL  <https://orcid.org/0000-0002-0721-1447>
Nascimento MT  <https://orcid.org/0000-0003-2400-0067>
Fonseca EM  <https://orcid.org/0000-0002-9990-9681>
Baptista Neto JA  <https://orcid.org/0000-0002-3638-4435>
Bila DM  <https://orcid.org/0000-0002-7988-0893>

Resumo

A poluição de sistemas aquáticos com contaminantes emergentes é uma crescente preocupação. Dentre estes, os desreguladores endócrinos (DE) são substâncias que podem alterar o sistema endócrino de seres vivos até em baixas concentrações. Suas características físico-químicas indicam afinidade com matéria orgânica, sendo relevante o estudo de sedimentos. A atividade estrogênica pode ser avaliada pelo ensaio *in vitro* YES, porém matrizes ambientais complexas podem apresentar citotoxicidade e interferir no resultado do ensaio. Este estudo objetivou avaliar métodos de preparo de amostras de sedimento utilizando extração em fase sólida para remoção de compostos citotóxicos no ensaio *in vitro* YES. O uso isolado de EDTA para remoção de metais não foi eficiente para reduzir a citotoxicidade, enquanto a remoção foi completa com o cartucho SAX. Conclui-se que o uso combinado de cartuchos foi a técnica mais viável para a avaliação da atividade estrogênica de amostras de sedimento com ensaio YES.

Palavras-chave: Sedimento. Atividade estrogênica. Efeito matriz. Citotoxicidade. Ensaio YES.

Abstract

*Pollution of aquatic systems with emerging contaminants is a growing concern. Among these, endocrine disruptors (EDC) are substances that can alter the endocrine system of living beings even at low concentrations. Its physicochemical characteristics indicate affinity with organic particles, being relevant the study of sediments. Estrogenic EDCs can be evaluated with the *in vitro* YES assay, but complex environmental matrices can be cytotoxic and interfere with the assay. This study aimed to evaluate sediment sample preparation methods using solid phase extraction to remove*

¹ Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) - Rio de Janeiro - Rio de Janeiro - Brasil.

² Universidade Federal Fluminense (UFF) - Niterói - Rio de Janeiro - Brasil.

³ Universidade de Aveiro - Campus Universitário de Santiago- Aveiro - Portugal.

* **Autora correspondente:** louisecefelix@gmail.com.

cytotoxic compounds in the in vitro YES assay. The isolated use of EDTA for metal removal was not efficient to reduce cytotoxicity, while the SAX cartridge showed good results. It was concluded that the combined use of cartridges was the most viable technique for evaluating the estrogenic activity of sediment samples with the YES assay.

Keywords: Sediment. Estrogenic activity. Matrix effect. Cytotoxicity. YES assay.

1 INTRODUÇÃO

Os sedimentos fazem parte do ecossistema aquático, sendo considerados o resultado de interações biótica, química, física e mineralógica, e podem se comportar como depósito final de contaminantes ou como fontes de contaminação do corpo d'água por dinâmica e suspensão (ESTEVEZ, 1988). Além disso, possuem uma característica de adsorção de contaminantes, incluindo substâncias estrogênicas, devido às características físico-químicas de ambos, que podem favorecer essa interação (SCHMITT et al., 2012; LI et al., 2014). Desta forma, por sua grande afinidade a diversos contaminantes, sedimentos são tidos como uma matriz complexa para diversas metodologias analíticas.

Desreguladores endócrinos (DE) são contaminantes capazes de produzir uma disfunção no sistema endócrino de organismos vivos (BERGMAN et al., 2013). Nessa classe encontram-se as substâncias estrogênicas, que são compostos que atuam na via metabólica do receptor de estrogênio e são capazes de induzir resposta análoga à do hormônio estrógeno (BILA e DEZOTTI, 2007). Esses contaminantes são diariamente lançados no meio ambiente por diversas fontes de poluição, principalmente decorrentes de atividades domésticas, industriais e agroindustriais (AQUINO et al., 2013; BARBOSA et al., 2016), e seus valores de coeficiente de partição octanol/água (k_{ow}), potencial de dissociação iônica (pka) e coeficiente de partição para parte orgânica (k_{oc}) indicam que essas substâncias possuem uma afinidade maior com matrizes orgânicas e sólidas,

a bem dizer os sedimentos (BIRKETT e LESTER, 2003; SUN E ZHOU, 2015; YARAHMADI et al., 2018). Por isso, o estudo de contaminação desta matriz com DE se faz tão importante.

Galluba-Oehlma et al. (2012) avaliaram a presença de EDC em amostras de sedimentos coletados em 50 pontos de diferentes rios da Alemanha pelos ensaios *in vitro* *Yeast Estrogen Screen* e *Yeast Androgen Screen* (YES e YAS). Para isso, utilizou-se o método de extração com preparo de elutriado dos sedimentos por sonicação usando água ultrapura como extrator. O resultado obtido foi que seis pontos apresentaram citotoxicidade às células de levedura dos ensaios e os demais pontos apresentaram valores de EQE2 (Equivalente-estradiol) e EQT (Equivalente testosterona) abaixo do esperado para os ensaios estrogênicos e antiestrogênicos, respectivamente.

Osman et al. (2015) analisaram a presença de DE em seis pontos de água e sedimentos do rio Nilo com uso dos ensaios *in vitro* YES e YAS. Os autores adotaram a metodologia de extração com diferentes solventes em ultrassom e reportam que não observaram atividade estrogênica nas amostras de sedimentos analisadas. Contudo, as amostras de água superficial dos pontos equivalentes apresentaram resposta positiva nos ensaios propostos.

Apesar dos avanços na sensibilidade das técnicas analíticas para análise de DE, a avaliação de matrizes complexas, como sedimentos, ainda apresenta limitações (GALLUBA-OEHLMA et al., 2012 e OSMAN et al., 2015). No caso de bioensaios,

um entrave nesse tipo de estudo é a ocorrência de substâncias interferentes que podem ocasionar citotoxicidade e impedir a quantificação da atividade estrogênica da amostra (FRISCHER et al., 2009). Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas para reduzir ou remover os interferentes por meio de um pré-preparo da amostra a fim de isolar os analitos para a análise. Para isso, subsequentes passos de purificação dos extratos devem ser aplicados, mantendo assim a confiabilidade dos resultados e melhor desempenho dos métodos analíticos aplicáveis (bioensaios ou métodos químicos).

Em estudo realizado por Pule (2011), a remoção de interferentes em matrizes complexas foi aplicada para quantificação analítica de fármacos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Fez-se uso de diferentes métodos de extração, sendo eles: ultrafiltração, diálise, extração líquido-líquido, extração de fluido supercrítico, extração em fase sólida (EFS), microextração em fase sólida, QuEChERS (acrônimo para *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), extração sortiva por barra magnética e extração por imunoafinidade (no caso de matrizes biológicas). Dentre os métodos apresentados, a extração em fase sólida (EFS) foi apontada como a técnica mais predominante para uso em matrizes complexas (ambientais, farmacêuticas, bioquímicas, indústria alimentícia) e com boa eficácia. Contudo, essa técnica não foi aplicada para avaliação de DE estrogênico em sedimento.

O trabalho elaborado por Denier et al. (2009) avaliou o potencial estrogênico de cinco metais (Cd, Cu, Hg, Pb e Zn) específicos em concentrações que variaram de 954 pM a 1 mM com o ensaio YES. Para esses mesmos parâmetros, o estudo também avaliou o crescimento celular da levedura utilizada para o ensaio. O resultado obtido foi que a presença desses metais altera as quantificações do potencial estrogênico para o ensaio YES. Foi observada uma relação de

concentração dos compostos com a inibição do crescimento da levedura para os metais Cádmio, Zinco e Cobre. A presença de mercúrio em todas as concentrações avaliadas apresentou inibição do crescimento da levedura em 100%. Foi observado ainda que a quantificação do CE50 para esses ensaios também sofreu variações quando os metais estavam presentes no ensaio.

Creusot et al. (2013) avaliaram a presença de DE em água, sedimento e material particulado dissolvido em diferentes tempos de coleta. O trabalho apresentou o uso da EFS associado à limpeza com coluna C18 e sílica como uma boa possibilidade para análise de DE em sedimentos a depender de parâmetros físico-químicos determinados das amostras.

Queiroz (2011) avaliou uso do cartucho de troca iônica SAX para remoção de compostos LAS (linear alquil benzeno sulfonato de sódio) e observou que este também é capaz de remover e concentrar compostos de interesse, como bisfenol-A (BPA), 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2). O autor fez uso de três metodologias, são elas: apenas o cartucho STRATA-X, apenas o cartucho SAX ou ambos os cartuchos acoplados. Extratos do cartucho X não estiveram bem definidos nas análises cromatográficas, ao passo que o cartucho SAX reteve parte dos compostos de interesse. O uso combinado de cartuchos (SAX+X) resultou em melhores quantificação e recuperação. O autor indicou a possibilidade do uso desta fase do STRATA-SAX (troca iônica forte com amina quaternária) como técnica de concentração dos compostos em amostras de esgoto.

Mediante a complexidade de detecção e quantificação de DE na matriz sedimento, este trabalho foi desenvolvido para avaliar as condições favoráveis para remoção de interferentes para a análise substâncias estrogênicas. A caracterização físico-química e de teor de metais das amostras de sedimento foi realizada para determinação

dos possíveis interferentes e posterior definição das técnicas mais apropriadas para sua remoção. Foram desenvolvidas quatro metodologias diferentes com uso combinado de técnicas de pré-preparo de amostras e com método de extração associados à limpeza dos extratos. A análise usada como ferramenta para comparação de resultados foi o ensaio *in vitro* YES (*Yeast Estrogen Screen*) para a avaliação de atividade estrogênica nas amostras de sedimento lagunares.

2 METODOLOGIA

2.1 Reagentes e materiais

O ácido clorídrico (HCl - 37% fulming) e galactopiranosídeo vermelho β -D-clorofenol (CPRG) foram adquiridos da Merck® e ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) da Fluka®. Todos os solventes utilizados (Metanol, Acetona e n-Hexano) foram de grau HPLC (*High Performance Liquid Chromatography Solutions*) da J.T. Backer® e a água ultrapura foi obtida a partir do Sistema Milli-Q Biocell (Millipore®).

Os cartuchos utilizados na extração em fase sólida (EFS) foram Strata-X (sorvente polimérico à base de estireno-divinilbenzeno com superfície modificada), 500 mg/6 mL da Phenomenex® e Strata-SAX (sorvente à base de sílica), 500 mg/6 mL da Phenomenex®.

Para o ensaio YES, a solução padrão de 17 β -estradiol foi preparada em etanol, com a concentração da solução estoque de 54,48 $\mu\text{g L}^{-1}$. Essa solução foi armazenada em frasco de vidro com tampa a -4 °C. Foram utilizados materiais estéreis descartáveis em toda a realização deste ensaio.

Toda a vidraria de suporte, coleta e armazenamento usada nas etapas deste trabalho foi previamente descontaminada com lavagem sequencial por sabão neutro (Extran®), acetona, água ultrapura, hexano e água ultrapura para evitar interferências nos resultados finais da análise.

2.2 Origem e coleta de amostras

Os pontos de coleta para o estudo foram localizados no sistema lagunar Itaipu-Piratininga, situado na região costeira a leste da entrada da Baía de Guanabara. Ambas as lagoas e suas respectivas bacias drenantes se localizam inteiramente na Região Oceânica do Município de Niterói, Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, no sudeste do Brasil. O ponto 1 foi coletado na lagoa de Itaipú, que possui uma profundidade máxima de 2 m, dimensão do espelho d'água de 2 km e uma conexão artificial com o mar. O ponto 2 foi coletado na lagoa de Piratininga, a qual possui profundidade máxima de 1,5 m e uma extensão de espelho d'água de 2,9 km (FEEMA, 1988).

Os sedimentos superficiais foram coletados utilizando um amostrador Van Veen de aço inoxidável. Parte desse sedimento foi armazenada em sacos plásticos de polietileno para análise de metais pesados, e outra foi armazenada em vidrarias (previamente descontaminadas) para análise dos parâmetros físico-químicos e de atividade estrogênica pelo ensaio YES. Em seguida, as amostras foram preservadas a 4°C, transportadas para o laboratório e armazenadas a 4°C até a análise.

2.3 Caracterização físico-química do sedimento

Os parâmetros físico-químicos analisados foram nitrogênio Kjeldahl total (NKT) e fósforo total (PT), segundo metodologias recomendadas por APHA (2017), e carbono orgânico total (COT) e granulometria, seguindo o Manual Embrapa (1997) e a NBR 6457 (ABNT, 1986), respectivamente. Para análise dos metais pesados, as amostras primeiramente foram digeridas em ácido nítrico conforme descrito no método 3050B da U.S. EPA (1996). Em seguida suas concentrações foram determinadas por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), com base no método 200.8 da U.S. EPA (1994).

2.4 Preparo e tratamento das amostras de sedimento

Foram selecionados dois pontos de sedimentos com granulometria similar, porém com características físico-químicas distintas. A coleta foi realizada na Lagoa de Itaipu e Piratininga, um ambiente lacustre com grande impacto antrópico em Niterói - Rio de Janeiro. A matriz sedimento é considerada uma amostra bastante heterogênea. Dessa forma, os materiais coletados foram preparados e analisados em um mesmo dia sob as mesmas condições.

Em estudo realizado por Santos (2017), foi definido o uso dessa matriz moderadamente seca em dessecador por 24 h como protocolo de análise de DE em sedimentos a fim de eliminar possíveis perdas em virtude da mudança de temperatura da amostra. Com isso, o presente trabalho adotou esse protocolo interno, sendo posteriormente descontado o teor de umidade dos sedimentos, para fins de cálculo de EQE2.

Cada um dos pontos utilizados foi homogeneizado manualmente com uso de espátulas de aço descontaminada previamente até que a amostra apresentasse um caráter visualmente mais homogêneo. Em sequência, alíquotas de 10 g de cada um dos sedimentos foram separadas em 4 réplicas, colocadas em tubos de vidro com adição de 10 mL de metanol em cada um. Essa mistura foi colocada para homogeneização em vórtex por 1 min, seguido por 10 min de ultrassom (sem aquecimento) e posterior centrifugação a 2500 rpm por 5 min. Essa sequência de processos configura um ciclo de preparo, o qual foi repetido 3 vezes para cada réplica de amostra. Ao término de cada ciclo, o sobrenadante da amostra foi transferido para um único recipiente para homogeneização dos extratos no vórtex. Em seguida, foram separados 30 mL de cada extrato em balão volumétrico de 200 mL para que assim pudessem ser feitas 4 réplicas de cada ponto amostral. Os extratos das amostras foram avolumados nos balões com água ultrapura. A Fig. 1 é um desenho esquemático das etapas realizadas.

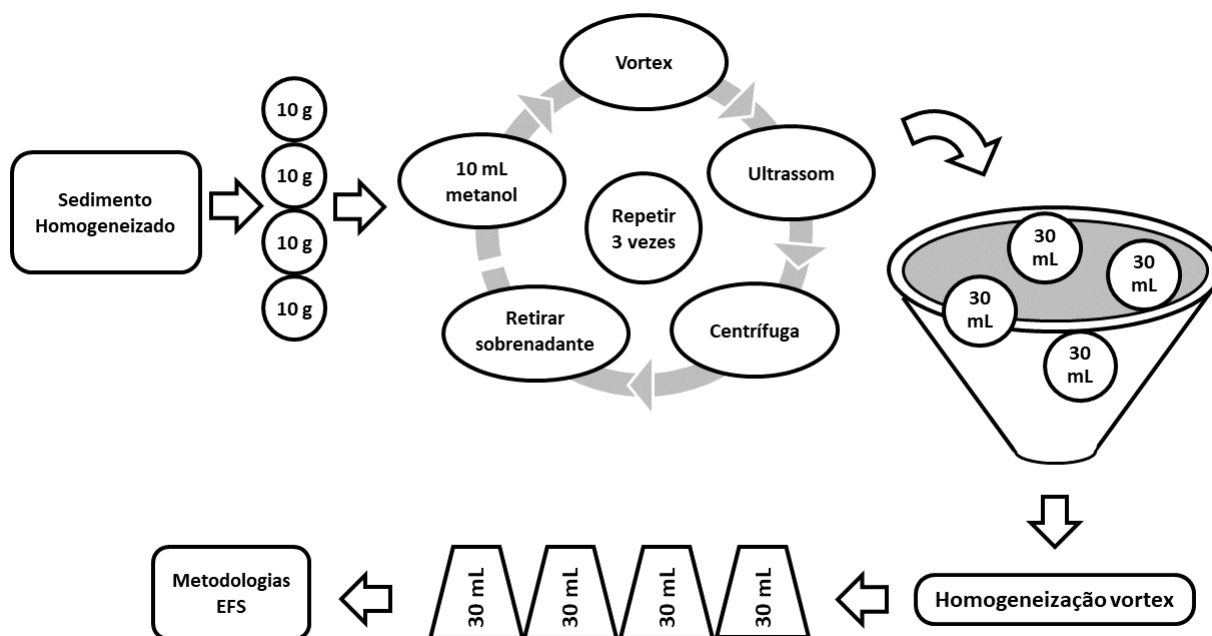


Figura 1 - Extração dos sedimentos pelo método de ultrassom com solvente.

A partir desta etapa, cada ponto amostral com suas respectivas 4 réplicas foi submetido a diferentes metodologias para a remoção de interferentes. A partir de metodologias descritas na literatura, foram definidas 4 alternativas para avaliação da melhor resposta obtida para remoção de interferentes.

A primeira metodologia traçada foi intitulada de M-I, a qual consistiu na utilização da extração em fase sólida (EFS), com uso exclusivo do cartucho Strata-X para concentração dos analitos de interesse. Essa metodologia é a consolidada para avaliação de DE em amostras ambientais, contudo não promove a remoção completa de interferentes de matrizes complexas para o ensaio YES.

A metodologia M-II foi desenvolvida a fim de avaliar se a presença de metais seria causa de citotoxicidade para o ensaio YES. Para tal, fez-se uso de EDTA na amostra antes da EFS para que houvesse o processo de remoção dos metais.

Na terceira metodologia proposta (M-III), foi testada a presença de metais e compostos iônicos como interferentes da matriz na análise de atividade estrogênica pelo ensaio YES. Além de EDTA, foi utilizado o cartucho de troca iônica Strata-SAX como um instrumento de polimento do preparo de amostra.

Por último, foi investigado na metodologia M-IV o uso do cartucho Strata-SAX acoplado ao Strata-X, sem a adição de EDTA. Essa etapa teve como objetivo observar se houve diferença entre os resultados obtidos com a metodologia M-III e os resultados de amostras sem remoção de metais.

Em suma, todas as metodologias fizeram uso do cartucho Strata-X. As metodologias M-III e M-IV fizeram o uso adicional do cartucho Strata-SAX, enquanto as metodologias M-II e M-III fizeram uso de EDTA, conforme representado na Fig. 2.

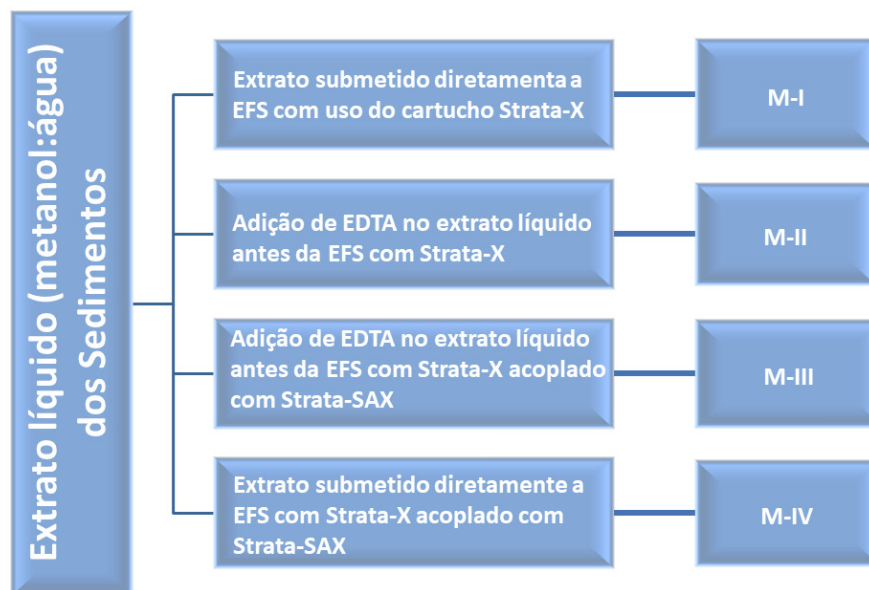


Figura 2 - Metodologias aplicadas para remoção de interferentes.

A adição de EDTA nas metodologias M-II e M-III foi feita na proporção que garantisse a concentração final de $0,5 \text{ g L}^{-1}$, sendo deixada em repou-

so por 1 h antes de submetê-las a EFS. Todas as amostras tiveram o pH ajustado para 2 com adição de HCl (3 mol L^{-1}).

A etapa de EFS foi realizada com o condicionamento de ambos os cartuchos, sendo o Strata-X condicionado com uma sequência de 2 x 3 mL de hexano; 2 mL de acetona; 2 x 3 mL de metanol seguido por 10 mL de água ultrapura ajustada a pH 3. Já o cartucho Strata-SAX fez uso de 2 x 5 mL de metanol e 2 x 5 mL de água ultrapura sem ajuste de pH para o condicionamento.

O cartucho Strata-SAX foi acoplado na parte superior do cartucho Strata-X, nas metodologias indicadas, e 200 mL das amostras foram percolados pelos cartuchos em sistema manifold com o fluxo de 3 ml s⁻¹. Em seguida, o cartucho Strata-SAX foi desacoplado e descartado ao término da percolação de amostras e apenas o cartucho Strata-X submetido às etapas seguintes. O *clean-up* foi realizado percolando uma solução de metanol:água (1:9 v/v), seguido por secagem completa do cartucho a vácuo por 10 min. Ao final, foi realizada a eluição dos analitos de interesse retidos no cartucho com o uso de 2 x 2 mL de acetona, volume este que foi recolhido em um *vial*. Os extratos obtidos foram evaporados sob vácuo, ressolubilizados em 2 mL de etanol, homogeneizados no vórtex e submetidos ao ensaio YES.

2.5 Yeast Estrogen Screen (YES)

Este ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Routledge e Sumpter (1996) com algumas modificações. O ensaio YES é baseado na expressão do receptor de estrogênio humano que foi incorporado ao genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Quando essa levedura é exposta a amostras que contenham substâncias estrogênicas, o receptor de estrogênio é ativado e o receptor de gene lac-Z induz a produção da enzima β-galactosidase. Essa enzima é secretada no meio e degrada o substrato cromogênico chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG), que é amarelo, em um produto rosado (chlorophenol red - CPR). Por-

tanto, é um ensaio colorimétrico mensurado por espectrofotometria.

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços com 12 diluições seriais das amostras em etanol (grau HPLC). O 17β-estradiol (E2) foi usado como controle positivo e a sua curva foi na faixa de 2724 to 1,33 ng L⁻¹ no poço. Como controle negativo foi usado etanol (grau HPLC). Na placa de ensaio, 10 μL de cada diluição da amostra foram adicionados e deixados para evaporar naturalmente; em seguida, 200 μL do meio de cultivo contendo levedura (1,2 x 10⁶ células mL⁻¹) e CPRG (100 mg mL⁻¹) foram adicionados.

As placas de ensaio foram incubadas por 72 h a 30°C e a colorimetria e a turbidez foram mensuradas a 575 nm e 620 nm, respectivamente, numa leitora de placas por espectrofotometria (VersaMax microplate reader - Molecular Devices).

Com os resultados da leitura obtiveram-se as absorbâncias corrigidas pela Eq. 1.

$$\text{Abs}_{\text{corrigida}} = \text{Abs}_{575 \text{ Amostra}} - (\text{Abs}_{620 \text{ Amostra}} - \text{Abs}_{620 \text{ Branco}}) \quad (1)$$

As curvas dose-resposta foram plotadas com o software Origin® 6.0 e a atividade estrogênica foi reportada em Equivalente Estradiol (EQE2) em ng g⁻¹, obtido pela interpolação das curvas das amostras com a do controle positivo E2 segundo as Eq. 2 e 3.

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

$$\text{EQE2} = \frac{x_i}{\text{FC}/\text{FD}} \quad (3)$$

Onde: A₁, A₂, x₀ e p são, respectivamente, a absorbância corrigida máxima, absorbância corrigida mínima, a concentração de efeito mediano (CE50) e a inclinação da curva dose-resposta do controle positivo E2, y é a absorbância corrigida

observada da diluição da amostra no ensaio, x é a concentração de 17β -estradiol equivalente ao efeito y , x_i é a concentração de E2 equivalente à menor concentração-teste da amostra que elucidou resposta positiva no ensaio, FC é o fator de concentração do processo de extração e concentração da amostra e FD é o fator de diluição utilizado no ensaio.

Outro procedimento de cálculo realizado foi o da citotoxicidade, isto é, a inibição do crescimento da levedura devido a substâncias tóxicas presentes na amostra, o que se traduz na ausência de turbidez ao final do ensaio. Para quantificar esse efeito, foi realizado o controle da absorbância a 620 nm segundo a Eq. 4, tal como apresentado por (FRISCHE et al., 2009).

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

Valores negativos ou iguais a zero são interpretados como ausência de toxicidade, pois indicam que

o crescimento da levedura na amostra foi igual ou superior ao do controle negativo. De contrário, valores positivos indicam a toxicidade e a inibição do crescimento e é expressa em percentual.

3 RESULTADOS

A granulometria dos sedimentos influencia a capacidade de adsorção de contaminantes em seus grãos e na atração iônica dos compostos (HOROWITZ e ELRICK, 1987; DUONG et al., 2010). Com isso, a fim de eliminar mais um parâmetro de influência no processo de extração de DE dos sedimentos para a análise com o ensaio YES, foram selecionados dois pontos de sedimentos com granulometrias semelhantes. Ambos os pontos foram classificados como arenosos, com predominância de grãos finos a muito finos. A Tabela 1 apresenta os resultados das análises de granulometria, parâmetros orgânico-inorgânicos e teor de metais presentes nos sedimentos.

Tabela 1 - Caracterização físico-química das amostras de sedimento

Pontos	Granulometria (%)			Físico-químico			Metais			
	Argila	Silte	Areia	COT (%)	NKT (mg Kg ⁻¹)	PT (mg Kg ⁻¹)	Zinco (mg Kg ⁻¹)	Níquel (mg Kg ⁻¹)	Cobre (mg Kg ⁻¹)	Chumbo (mg Kg ⁻¹)
1	6	16	78	4,1	996,1	253,4	63,7	14,9	18,8	13,0
2	6	16	78	6,0	3248,5	632,4	481,5	56,5	55,0	33,0

A investigação da citotoxicidade para o ensaio YES se baseou na hipótese de que alguns metais, teor de matéria orgânica e nitrogenados/fosfatos causam interferência no preparo de amostras de sedimento para extração de analitos (no caso, os DE). Desta forma, os pontos foram escolhidos com base nos níveis de contaminação. O ponto 1 apresenta menor concentração dos metais zinco, níquel, cobre e chumbo, respectivamente 63,7 mg Kg⁻¹, 14,9 mg Kg⁻¹, 18,8 mg Kg⁻¹ e 13,0 mg Kg⁻¹.

O parâmetro fósforo total (PT) nos sedimentos é composto pela fração orgânica (compostos hú-

micos, fosfatos ligados organicamente, fosfolípidios) e fração inorgânica (apatítico, ligados ao cálcio, e não apatítico, com ligações com ferro, alumínio e manganês). O parâmetro nitrogênio total (NKT) é o somatório de nitrogênio amoniacal (resultado de degradação de matéria orgânica) com o nitrogênio orgânico (forma predominante no esgoto doméstico). A diferença entre os pontos esteve relacionada com o teor de matéria orgânica/inorgânica e a presença de metais.

O ponto 2 teve um maior aporte de poluentes, podendo ser considerado um ponto de maior

interferência antrópica, com possíveis descargas de esgoto. Isso pode ser inferido devido aos valores elevados de nitrogênio (3248,5 mg Kg⁻¹) e fósforo (632,4 mg Kg⁻¹), apontando para a eutrofização do local. O nitrogênio total (NTK) do ponto 2 foi 3,26 vezes maior do que no ponto 1 (996,1 mg Kg⁻¹). O ponto 2 além de maior aporte orgânico apresentou maior presença de metais associados aos grãos dos sedimentos, sendo possível quantificar valores elevados de cobre, níquel e zinco.

As peculiaridades específicas dos xenoestrogênicos, como solubilidade, log kow, log koc e massa molecular podem favorecer a sua adsorção ou não ao sedimento. Essa premissa também é válida para compostos não estrogênicos, que podem

ser coextraídos com as substâncias de interesse e dificultar a detecção e quantificação da estrogenicidade das amostras. Ademais, esses compostos podem ocasionar citotoxicidade à levedura, acarretando um falso-negativo ao ensaio e sendo um dificultador da utilização do ensaio YES para essa matriz (FRISCHE et al., 2009).

Para minimizar esse efeito, foram testadas 4 metodologias de preparo das amostras. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos de atividade estrogênica e citotoxicidade e as curvas dose-resposta obtidas no ensaio são apresentadas na Fig. 3. Os elevados valores de citotoxicidade encontrados corroboram a discussão sobre a necessidade de pré-tratamento das amostras.

Tabela 2 - Resultados do ensaio YES para as metodologias testadas para cada ponto de coleta.

Pontos	EQE2 (ng L ⁻¹)				Citotoxicidade (%)			
	M-I	M-II	M-III	M-IV	M-I	M-II	M-III	M-IV
Ponto 1	0,68±0,32	0,39±0,12	0,71±0,08	0,37±0,01	95	96	ND	ND
Ponto 2	0,68±0,05	1,28±0,10	0,78±0,08	1,57±0,18	70	ND	ND	ND

ND: Não detectado.

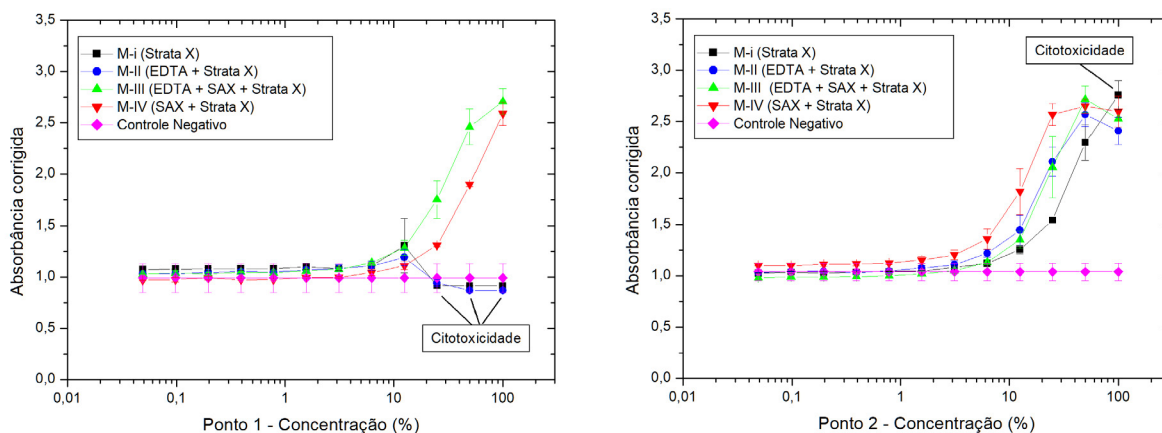


Figura 3 - Curvas dose-resposta das amostras de sedimento avaliadas com o ensaio YES segundo as metodologias de preparo.

A citotoxicidade pode ser superada com a diluição da amostra (COMPREHEND, 2002), de modo que os valores de EQE2 obtidos foram calculados a partir de diluições sem citotoxicidade. Contudo,

perde-se a informação de EQE2 em diluições tóxicas à levedura, o que pode levar à subquantificação da atividade estrogênica de amostra com reduzida estrogenicidade. Portanto, ao detectar

citotoxicidade em uma amostra ambiental, deve-se verificar se esta impediu a quantificação da atividade estrogênica ou não.

Os resultados para a metodologia M-I indicam que o uso do cartucho Strata-X favoreceu a extração de substâncias estrogênicas. Contudo, houve também a ocorrência de compostos citotóxicos, resultando em até 95% e 70% de inibição do crescimento da levedura induzida pelos pontos 1 e 2, respectivamente. Porém essa citotoxicidade não impediu o cálculo da atividade estrogênica, sendo obtidos os valores de EQE2 de $0,68 \pm 0,32 \text{ ng g}^{-1}$ para o ponto 1 e $0,68 \pm 0,05 \text{ ng g}^{-1}$ para o ponto 2.

O resultado de M-III (EDTA + Strata X + Strata SAX) mostrou que houve a remoção total da citotoxicidade em ambos os pontos analisados, quantificando $0,71 \pm 0,08 \text{ ng g}^{-1}$ de EQE2 para o ponto 1 e $0,78 \pm 0,08 \text{ ng g}^{-1}$ de EQE2 para o ponto 2. Porém, o uso exclusivo do EDTA não se mostrou eficaz, uma vez que a citotoxicidade não foi completamente removida no ponto 1 com a metodologia M-II (EDTA + Strata X). Nesse caso, sugere-se que a citotoxicidade da amostra seja oriunda de outro fator que não a presença de metais.

Os resultados de EQE2 obtidos demonstraram uma variação de comportamento entre os dois pontos estudados em relação aos métodos aplicados. Comparando M-I e M-II, houve redução do EQE2 na adição do EDTA para o ponto 1, enquanto um aumento foi observado no ponto 2 para as mesmas metodologias. Comparando M-III e M-IV, o uso de EDTA associado ao SAX gerou maior resultado de atividade estrogênica no ponto 1; em contrapartida, o inverso foi observado para o ponto 2. Portanto, novos ensaios podem ser realizados para avaliar o efeito do EDTA na quantificação de atividade estrogênica de amostras com o ensaio YES. Como exemplo, possíveis interações com os analitos ou um efeito antagonista podem ser avaliados.

Analisando as curvas dose-resposta obtidas (Fig. 3), depreende-se que as metodologias M-II e M-IV apresentaram comportamento em melhor conformidade e mais à esquerda, indicando maior atividade estrogênica dos extratos. Contudo, a metodologia M-IV (Strata X + Strata SAX) apresentou melhor custo-benefício, pois foi capaz de remover a citotoxicidade da amostra, apresentou baixos índices de desvio padrão nas amostras analisadas e fez uso de menos insumos no preparo da amostra.

4 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a importância do uso combinado de técnicas para remoção de interferentes da detecção e quantificação de compostos estrogênicos em matrizes complexas. As duas amostras analisadas e suas réplicas apresentaram resultados citotóxicos para as células de levedura utilizadas no ensaio YES quando não submetidas aos métodos de remoção de interferentes.

No caso de sedimentos, apesar de conhecida a sua grande afinidade por metais, o uso exclusivo do EDTA não apresentou 100% de eficácia na remoção da citotoxicidade provocada no ensaio YES. Sendo assim, a origem da toxicidade às células de levedura no ensaio não pode ser atribuída somente à presença de metais na amostra. O uso do cartucho de troca iônica SAX apresentou boa remoção dos interferentes das amostras testadas, sendo eficiente na remoção da citotoxicidade tanto em amostras com carga orgânica alta como nas de menor teor. Contudo, novos estudos devem ser elaborados para avaliar a capacidade de retenção dos compostos de interesse do cartucho SAX. Infere-se que ensaios de recuperação das metodologias empregadas sejam feitos para melhor avaliação de perda de compostos durante a execução dos métodos.

A metodologia que apresentou melhores resultados foi a M-IV, a qual fez uso de menos insu-
mos laboratoriais, apresentou baixo desvio pa-
drão entre as réplicas e promoveu a remoção da
citotoxicidade em todos os pontos.

Entretanto, o estudo mostrou que ainda há limi-
tações nas metodologias estudadas, o que indica
a necessidade de novos estudos que visem à me-
lhora das análises. Novos estudos devem abor-
dar as questões de outros possíveis interferentes
nessas amostras, buscando entender os efeitos
de antagonismo ou sinergismo ou anti-estroke-
nicidade nesta complexa matriz.

5 AGRADECIMENTOS:

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Cien-
tífico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apar-
o a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ),
pelo apoio e financiamento desta pesquisa. Ao
Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) - UERJ
e ao Laboratório de Geologia Marinha (LAGE-
MAR) - UFF pelo suporte técnico.

6 CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Conceitualização: Felix LC, Gomes GM, Santos
ADO, Bila DM. **Metodologia:** Felix LC, Argolo AS,
Gomes GM e Santos ADO. **Investigação:** Cunha
DL, Nascimento MT, Gomes GM, Santos ADO e
Felix LC. **Redação - Primeira versão:** Felix LC e
Gomes GM. **Redação - Revisão & Edição:** Felix
LC, Argolo AS, Gomes GM e Bila DM. **Aquisição
de financiamento:** Bila DM, Neto, JAB e Fonseca
EM. **Recursos:** Bila DM, Neto JAB e Fonseca EM.
Supervisão: Bila DM, Neto JAB e Fonseca EM.

7 REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6457:**
Amostras de Solo. Preparação para ensaios de compactação e
ensaios de caracterização. 1986.

APHA - American Public Health Association. **Standard Methods**
for the Examination of Water and Wastewater. 22th Edition,
American Water Works Association and Water Environmental
Federation, Washington DC. 2012.

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. Disponível em: <[https://doi.org/10.3390/
ijerph182211765](https://doi.org/10.3390/ijerph182211765)>.

BERGMAN, Å.; HEINDEL, J.J.; JOBLING, S.; KIDD, K.A.; ZOELLER, R.T.
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 consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3,
p. 651–666, 2007. Disponível em: <[https://doi.org/10.1590/
S0100-40422007000300027](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. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0304-
3894\(03\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(03)00103-1)>.

COMPREHEND - COMMUNITY PROGRAMME OF RESEARCH ON
ENDOCRINE DISRUPTERS AND ENVIRONMENTAL HORMONES.
ENV4-CT98-0798, 2002.

CREUSOT, N., TAPIE, N., PICCINI, B., BALAGUER, P., PORCHER, J.
M., BUDZINSKI, H., & AÏT-AÏSSA, S. Distribution of steroid- and
dioxin-like activities between sediments, POCIS and SPMD in a
French river subject to mixed pressures. **Environmental Science**
and Pollution Research, v. 20, n. 5, p. 2784-2794, 2013. [https://
doi.org/10.1007/s11356-012-1452-5](https://doi.org/10.1007/s11356-012-1452-5)

DENIER, X.; HILL, E.M.; ROTCHELL, J.; MINIER, C. Estrogenic activity
of cadmium, copper and zinc in the yeast estrogen screen.
Toxicology in Vitro, v. 23, n. 4, p. 569-573, 2009. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.01.006>>.

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. Disponível em: <[https://doi.org/
10.1007/s00244-009-9429-1](https://doi.org/10.1007/s00244-009-9429-1)>.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
Manual de métodos de análise de solo. Centro Nacional de
Pesquisa de Solos. 2ª Ed. Rio de Janeiro, 1997.

ESTEVEES, F. A. 1988. Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro:
Interciência/ FINEP, cap 19 p. 291-306.

FEEMA – Fundação Estadual do Meio Ambiente. **Relatório de**
Avaliação das Condições Físico-Químicas do Sistema Lagunar
de Piratininga-Itaipu, DEP / DIAG, 08 p. Rio de Janeiro. 1988.

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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-009-0184-7>>.

GALLUBA, S.; OEHLMANN, J. Widespread endocrine activity in river sediments in Hesse, Germany, assessed by a combination of in vitro and in vivo bioassays. **Journal of Soils and Sediments**, v. 12, n. 2, p. 252–264, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11368-011-0454-0>

HOROWITZ, A.J., ELRICK, K.A. The relation of stream sediment surface area, grain size and composition to trace element chemistry. **App Geochem**, v. 2(4), p.437–451, 1987.

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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/es9912729>>.

LI, Y.; ZHANG, C.; LI, S.; ZHOU, C. ; LI, X. Single and competitive adsorption of 17 α -etinyloestradiol and bisphenol A with estrone, b-estradiol and estriol onto sediment. **Marine Drug**, v.12, p.1349–1360, 2014. <https://doi.org/10.3390/md12031349>

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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.021>>.

OSMAN, A. G., ABOUELFADL, K. Y., KRÜGER, A., & KLOAS, W. Screening of multiple hormonal activities in water and sediment from the river Nile, Egypt, using in vitro bioassay and gonadal histology. **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, n. 6, p. 1–16, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4553-z>

PULE, Bellah Oreeditse. **Solid-phase extraction based sample preparation for the determination of drug and organic pollutant residues**. 2011. Tese (Doutorado). Rhodes University.

QUEIROZ, F. B. de. **Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de fármacos e perturbadores endócrinos em amostras de esgoto utilizando extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/3267>>

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. Disponível em: <[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)>.

SANTOS, A. D. O. **Determinação de Atividade Estrogênica e Detecção de Micropoluentes em Sedimentos de Fundo na Baía de Guanabara**. Tese (Doutorado em Dinâmica dos Oceanos e da Terra) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2017.

SCHMITT, S.; REIFFERSCHIED, G.; CLAUS, E.; SCHLUSENER, M.; BUCHINGER, S. Effect directed analysis and mixture effects of estrogenic compounds in a sediment of the river Elbe. **Environmental Science Pollution Research**, v.19, p. 3350–3361, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0852-x>

SUN, W.; ZHOU, K. Adsorption of three selected endocrine disrupting chemical by aquatic colloids and sediments in single and binary systems. **J. Soils Sediments**, v. 15, p. 456–466, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11368-014-1042-x>

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