

O USO DA CLORAÇÃO NA REMOÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA DO ESTRONA

Thamara Costa Resende

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Renata de Oliveira Pereira

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Sue Ellen Costa Bottrel

Resumo – Desreguladores endócrinos (DEs), são substâncias que mesmo em baixas concentrações possuem a capacidade de imitar ou bloquear os hormônios naturais, gerando respostas ou estímulos indesejáveis a saúde humana. Dentre os DEs, o estrogênio natural estrona (E1) possui maior excreção diária, cerca de 3,9 µg/d para os homens e 8 µg/d para mulheres. A descarga dos efluentes, contendo DEs, acarreta na contaminação de mananciais de captação, chegando até as Estações de Tratamento de Água (ETA). Portanto, o estudo analisa a cloração (método mais utilizado na etapa de desinfecção em ETA), com o objetivo de remover a atividade estrogênica causada pelo E1. As amostras de água dopada com 1 µg.L⁻¹ de E1, foram concentradas pelo método de extração em fase sólida (SPE). A análise da remoção foi realizada pelo teste YES (Yeast Estrogen Screen), no qual usa-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* modificada, que ao entrar em contato com substâncias com atividade estrogênica, metaboliza o composto cromogênico clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosina (CPRG) adicionado no teste, alterando a cor de amarelo para rosa. Como resultados, têm-se que a cloração com 5 mg.L⁻¹ no tempo de contato de 1 minuto, obteve a melhor remoção (98,0%) da atividade estrogênica. Sendo a faixa de remoção de 16,5 a 98,0%, para diferentes tempos de contato e doses de cloro.

Palavras-Chave – Hormônio, teste YES, cloração, qualidade da água.

THE USE OF CHLORINATION IN REMOVING THE ESTROGENICITY OF ESTRONA

Abstract – Endocrine disrupters (EDs), are substances that even at low concentrations have the ability to imitate or block natural hormones, producing unwelcome responses or stimuli to human health. Among the EDs, the natural estrogen estrone (E1) has the highest daily excretion, about 3,9 µg/d for men and 8 µg/d for women. The outflow of the effluents, containing EDs, causes the contamination of sources of supply and reaching Water Treatment Plant (WTP). Within this context, the study analyzes chlorination (the most used method in the disinfection stage in WTP), with the purpose of removing the estrogenic activity caused by E1. Samples of water doped with 1 µg.L⁻¹ of E1, were concentrated by the solid phase extraction method (SPE). The removal analysis was performed by YES test (Yeast Estrogen Screen), which the modified yeast *Saccharomyces cerevisiae* is used. When in contact with substances with estrogenic activity, the yeast metabolizes the chromogenic compound chlorophenol red-β-D-galactopyranosin (CPRG) added in the test, changing the color from yellow to pink. As result, chlorination with 5 mg.L⁻¹ at the contact time of 1 minute resulted in the best removal (98,0%) of the estrogenic activity. Being the strip of removal from 16.5 to 98.0%, for different contact times and doses of chlorine.

Keywords – Hormone, YES test, chlorination, water quality.

“O USO DA CLORAÇÃO NA REMOÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA DO ESTRONA”

THAMARA COSTA RESENDE

Trabalho Final de Curso submetido à banca examinadora constituída de acordo com o artigo 9º da Resolução CCESA 4, de 9 de abril de 2012, estabelecida pelo Colegiado do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro Ambiental e Sanitarista.

Aprovada em 22 de agosto de 2017, pela banca examinadora constituída pela Prof.^a Dr.^a Renata de Oliveira Pereira (Orientadora), Prof.^a Dr.^a Sue Ellen Costa Bottrel (Coorientadora), Prof. Dr. Edgard Henrique Oliveira Dias e Prof.^a Dr.^a Iara Furtado Santiago.

1 Introdução

Desreguladores endócrinos (DEs) são substâncias que, mesmo em baixas concentrações (encontrados na ordem de ng e μg na matriz aquática), possuem a capacidade de imitar os hormônios naturais, gerando respostas ou estímulos indesejáveis no corpo, prejudicando a saúde humana. Cita-se como efeitos causados por essas substâncias: interferência na reprodução; aumento do risco de câncer; perturbação do sistema nervoso e imunológico (USEPA, 2017).

Diversas substâncias são classificadas como desreguladores endócrinos, dentre elas os hormônios sintéticos, como o 17α -etinilestradiol, e os naturais, como o 17β -estradiol, estrona e o estriol (BILA, 2005). O 17β -estradiol (E2) é o estrogênio com maior atividade estrogênica, sendo o estrona (E1) e o estriol (E3) seus derivados. Porém, quando quantificado, o E1 possui maior excreção humana diária, na ordem de $3,9 \mu\text{g}/\text{d}$ para os homens e $8 \mu\text{g}/\text{d}$ para mulheres durante a menstruação (JOHNSON *et al.*, 2000).

Resende *et al* (2017) destaca os valores encontrados do estrona nas matrizes aquáticas, a partir de estudos no Brasil e internacionalmente. A Tabela 1 apresenta as medianas e as concentrações máximas encontrada na literatura estudada.

Tabela 1 - Concentrações de estrona (ng.L^{-1}) em diversas matrizes.

Matriz	Dados Nacionais		Dados Internacionais	
	Mediana	Máximo	Mediana	Máximo
Esgoto doméstico	715 (n=12)	4830 (n=12)	32 (n=31)	188 (n=31)
Efluente de ETE ⁽¹⁾	2080 (n=3)	4130 (n=3)	11,4 (n=40)	200 (n=40)
Água superficial	36,3 (n=21)	3500 (n=21)	3,8 (n=58)	141,6 (n=58)
Água Tratada	35,1 (n=6)	3300 (n=6)	0,4 (n=2)	0,6 (n=2)

(1) ETE = Estação de Tratamento de Esgoto
n = número de dados.

Fonte: Resende *et al.* (2017).

As águas superficiais, principal fonte de abastecimento das Estações de Tratamento de Água (ETA), são contaminadas diariamente pelas descargas dos esgotos domésticos, situação preocupante no Brasil, visto que apenas 40,8% desses são tratados (SNIS, 2014).

Em relação à remoção do E1 em ETA, após passar pela etapa de clarificação, a literatura cita uma baixa remoção de apenas 39% (LIMA, 2014). Atenta-se, portanto, para a etapa de desinfecção, no qual a cloração é método mais utilizado, sendo esse um método promissor devido a facilidade de reação do cloro com os grupamentos fenólicos, que constituem os hormônios naturais e sintéticos (AWWA, 2007). De acordo com Pereira (2011), relata-se a

remoção de 44% a 97% do E1 a partir da oxidação com o cloro, para tempo de contato de 10 minutos à 1 mg.L⁻¹ de cloro e tempo de 30 minutos à 6,4 mg.L⁻¹ de cloro, respectivamente. Além disso, relata-se a possibilidade de formação de subprodutos, que também possuem atividade estrogênica durante a cloração (PEREIRA 2011).

A quantificação da atividade estrogênica na matriz aquática, assim como a eficiência de remoção da cloração, possuem alto grau de dificuldade, visto que os DEs se encontram em baixas concentrações e próximos ao limite de detecção dos métodos analíticos (FISCHER, 2013). Visto isso, atenta-se para a utilização do teste YES (*Yeast Estrogen Screen*), que possui alta especificidade e sensibilidade para a detecção de substâncias estrogênicas, identificando todos os composto com essa atividade (produtos e subprodutos). Além disso, o teste possui a capacidade de realizar análises de grande número de amostras de maneira econômica, sem usar substâncias radiomarcadas (BILA, 2005).

O teste *in vitro* YES quantifica a atividade estrogênica utilizando uma linhagem geneticamente modificada de *Saccharomyces cerevisiae*, que indica compostos através da interação com o receptor de estrogênio humano (hER), o qual foi acrescentado em seu DNA. A detecção da estrogenicidade acontece quando a levedura produz a enzima β-galactosidase, que metaboliza o composto cromogênico clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosina (CPRG), alterando a cor da amostra que será identificada em espectrofotometria a 540 nm, sendo assim comparada com uma curva dose - resposta (ROUTLEDGER & SUMPTER, 1996).

Nesse panorama, o estudo teve como objetivo pesquisar o uso da cloração para remoção da atividade estrogênica causada pelo estrona, identificando a melhor dose e o melhor tempo de contato em condições usadas em ETA. O teste YES foi utilizado para quantificar a atividade estrogênica antes e depois da cloração, determinando a eficiência de remoção.

2 Metodologia

Todos os procedimentos da pesquisa foram realizados no Laboratório de Qualidade Ambiental (LAQUA) do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). O estudo iniciou-se com a implementação do Teste YES, que foi possível após a confirmação da ausência de contaminantes microbianos na levedura modificada *Saccharomyces cerevisiae*, com a colaboração da Dr. Iara Furtado Santiago, e pelo treinamento no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (AquaTox) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob supervisão da MsC. Natália Rezende e da professora Dr^a. Ann Honor Munteer. Após a implementação do teste, os ensaios de cloração foram realizados, seguidos

pela extração em fase sólida das amostras, concentradas em nitrogênio gasoso sendo posteriormente as mesmas analisadas no teste YES para a verificação de sua estrogenicidade.

2.1 Ensaios de Cloração

A matriz utilizada nos ensaios de cloração foi uma amostra de água de mina localizada no Distrito de Torreões, pertencente a Juiz de Fora - Minas Gerais. Essa água foi escolhida pois suas características se aproximam da qualidade das águas tratadas em ETA. A partir de uma solução mãe de 100 mg.L^{-1} em metanol (armazenada a 4°C em frasco âmbar), preparou-se uma solução intermediária de E1 (10 mg.L^{-1}). Essa solução foi usada para dopar a água, deixando essa com concentração final de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de estrona (Sigma-Aldrich, 99.9% de pureza. Para a cloração, as doses de hipoclorito de sódio (Sigma-Aldrich, 10-15%) utilizadas foram de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e 5 mg.L^{-1} , ambos nos tempos de contato de 1 e 30 minutos. Além disso, como ponto central, têm-se a dose de $2,75 \text{ mg.L}^{-1}$ de cloro no tempo de 15,5 minutos. Os tempos foram determinados de acordo com uma análise do anexo IV da Portaria 2914/2011, onde o maior e o menor tempo de cloração em ETA devem ser de 30 e 1 minuto, respectivamente. A dose de cloro aplicada foi determinada de acordo com os valores de cloro residual, no qual o valor mínimo deve ser de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e o máximo de 5 mg.L^{-1} de cloro na saída da ETA. Ambos os ensaios foram realizados em duplicata, totalizando em dez ensaios de cloração.

Primeiramente, a água de mina foi caracterizada através dos parâmetros físico químicos cor e turbidez. Após a adição do E1, os parâmetros físico químicos analisados foram pH, condutividade e temperatura.

Antes da aplicação do cloro, houve a calibração do mesmo, visto que a concentração de cloro altera com a temperatura e com as condições do ensaio. Portanto, foram simulados as concentrações dos ensaios em soluções com água destilada, sendo o cloro total conferido com o método DPD com o kit da Hach® antes de cada ensaio (PEREIRA, 2011).

Os ensaios foram feitos a partir da adição do cloro em 600 mL de água dopada mantida sob agitação magnética. Após o tempo de contato determinado, retirou-se 200 mL para a análise do pH, condutividade, cloro livre e cloro total. O cloro foi analisado utilizando o método DPD com o kit da Hach® na faixa de $0,02\text{-}2,00 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cl_2 . Nos 400 mL restantes adicionou-se metabissulfito de sódio a 3% (m/v), na proporção de 0,2 mL para cada 100 mL de amostra, a fim de eliminar o cloro residual. Em seguida, retirou-se 100 mL para a determinação da cor, turbidez, temperatura e os 300 mL restantes foram separados para a extração. Todos os

parâmetros foram lidos em triplicata, com exceção do cloro livre e total que foram lidos apenas uma vez.

2.2 Metodologia de Extração em Fase Sólida

Com o objetivo de concentrar o E1 e detectá-lo no teste YES, utilizou-se a Extração em Fase Sólida (SPE) baseada na metodologia proposta por Pereira (2011), alterando apenas o volume da amostra para 300 mL e a ressuspensão do analito em 1 mL de etanol, concentrando-a em 300 vezes. A extração foi realizada utilizando cartucho C18 (Agilent Technologies, 500mg de 6 mL), acoplado em um *manifold* de 20 posições ligado a uma bomba à vácuo.

Para o condicionamento do adsorvente C18, utilizou-se 6 mL de hexano, seguido por 2 mL de acetona, 6 mL de metanol e 10 mL de água em pH 3 (ajustado com ácido clorídrico). Após o condicionamento, houve a passagem de 300 mL da amostra e a etapa *clean-up*, que constitui em 10 mL solução de metanol e água deionizada (proporção 1:9). Após esse processo, a bomba permaneceu ligada durante 10 minutos para a secagem do cartucho.

A eluição do analito de interesse, no caso o E1, foi feita a partir da passagem de 4mL de acetona, que foi seca em fluxo de nitrogênio e ressuspensa em 1 mL de etanol.

2.3 Teste Yes (*Yeast Estrogen Screen*)

A atividade estrogênica foi analisada através do Teste *in vitro* YES (*Yeast Estrogen Screen*). Esse método utilizou a levedura *Saccharomyces cerevisiae* modificada, cedida pelo Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da UFV e pelo Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ).

A fim de evitar contaminações e falsos positivos no teste, todo o teste foi preparado dentro da capela de fluxo laminar e o material envolvido no preparo das soluções, sendo esses exclusivos do teste, fo previamente limpo com água de torneira, deixadas em banho ácido (ácido nítrico 10%) por 24 horas, enxaguadas com água deionizada, rinsadas com etanol absoluto e autoclavados. De acordo com Bila (2005), todos os reagentes devem apresentar alto grau de pureza e devem ser utilizados exclusivamente para a realização deste teste. Ressalta-se que todo material que entrou em contato com a levedura, foi autoclavado antes do seu descarte.

As soluções de meio mínimo, vitamina, glicose, ácido L-aspártico, L-treonina, sulfato de cobre (II), CPRG (10 mg.mL⁻¹), meio de cultivo, meio de análise e solução estoque de 17β-estradiol (E2) em etanol (54,48 µg.L⁻¹ – curva do Teste YES), utilizadas no teste foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Routledge & Sumpter (1996).

Com a finalidade de isolar a levedura *Saccharomyces cerevisiae* de possíveis contaminações microbiológicas, seguiu-se o protocolo elaborado pela professora Dr. Daniele Maia Bila da UERJ com modificações (Figura 1). No processo de congelamento, adicionou-se de 3-4 gotas de glicerol autoclavado em 900 μL do meio de cultivo contendo a levedura, em tubo criogênico de 2 mL conservado a -20°C . Já o descongelamento, feito em temperatura ambiente, foi realizado colocando todo o conteúdo do tubo criogênico em 10 mL de meio de cultivo.

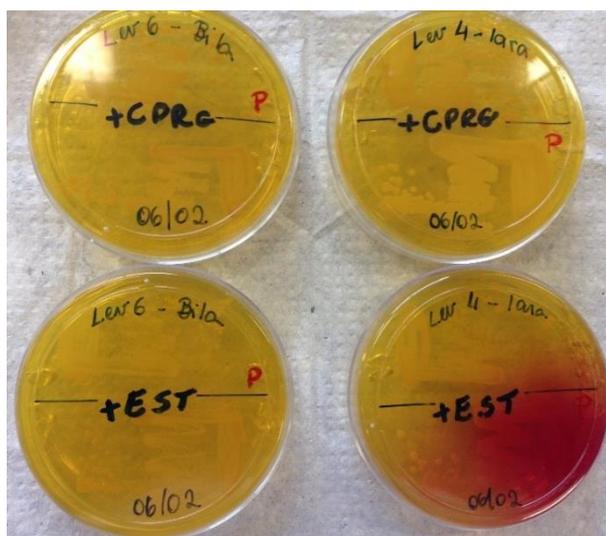


Figura 1 - Procedimento de isolamento da levedura para o Teste YES.

A preparação da levedura, assim como todo o procedimento do Teste YES foi o mesmo utilizado no AquaTox. No preparo da cultura para o teste, adicionou-se 10 mL de meio de cultivo e 100 μL de levedura em um frasco T, mantidos em uma estufa a 28°C nas 24 horas anteriores ao teste. A levedura usada no teste obteve 0,734 de absorvância (turbidez relacionada com o número de células), medida no espectrofotômetro a 620 nm.

O teste foi feito em placas de 96 poços de fundo chato, onde as amostras e a curva foram elaboradas em duplicatas (linhas A, C, E e G, Figura 2), e entre essas são deixadas linhas em “branco”, para controle de contaminação (linhas B, D, F e H, Figura 2). A curva utilizada para quantificar as demais amostras é uma solução de $54,48 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 em etanol e sua diluição foi feita juntamente com as amostras em placas iguais a Figura 2, na proporção 1:2. Começando com um volume de 200 μL da amostra no primeiro poço e 100 μL de etanol nos demais, sendo assim retirados 100 μL do primeiro poço e passado para o segundo, fazendo o procedimento até o último poço, que ficou com 200 μL .

As amostras que estavam na placa de diluição foram transferidas para a placa de análise a partir de uma alíquota de 10 μL . Além disso, 10 μL de etanol foram colocados nas linhas do

branco. Essa placa de análise foi deixada em repouso por 15 minutos para que sofresse evaporação. Após esse período, 200 µL do meio de análise (composto por 25 mL de meio de cultivo, 25-50 µL do meio de cultivo com levedura e 200 µL de CPRG 10 mg.mL⁻¹, proporção definida para uma placa) foram adicionados nos poços com a pipeta automática multicanal, com o cuidado de trocar as ponteiras a cada fileira para evitar a contaminação do meio de análise.

Em seguida, as placas foram seladas e inseridas em um agitador orbital ajustado para 100 rpm por dois minutos. As placas foram então incubadas a 32°C por 72 horas. Após esse período, foram agitadas novamente e em seguida permaneceram em repouso por uma hora, estando prontas para serem submetidas à determinação da absorbância à 540 nm para cor e 620 nm para turbidez na leitora de placas (Thermo Scientific, Multiskan FC).

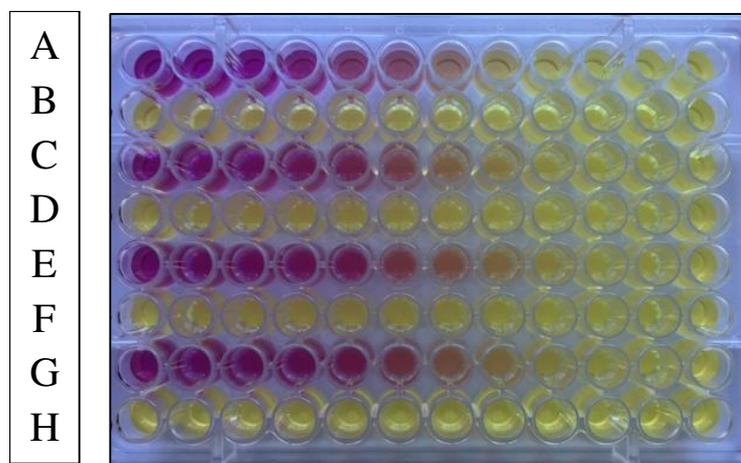


Figura 2 – Placa utilizada no Teste YES.

2.4 Análise dos dados do teste YES

Os resultados obtidos pela leitura a 540 nm, correlaciona o valor da cor com a atividade estrogênica da amostra. Para tanto uma correção é feita para cada poço, como demonstrado na Equação 1.

$$A_{cor amostra} = A_{540 amostra} - (A_{620 amostra} - A_{620 branco}) \quad \text{Eq. 1}$$

A partir do valor corrigido, elaborou-se a curva padrão, onde as absorbâncias corrigidas (eixo Y) correlacionam-se com as concentrações da curva padrão de 17 β-estradiol (eixo X) em escala logarítmica (Figura 3). O cálculo realizado através do *software* Origin® (Versão 6.0, OriginLab Corporation) através de regressão não linear, obtendo o valor de EC₅₀ (concentração correspondente a uma atividade igual a 50% do controle positivo do 17 β-estradiol), de A (máxima indução da β-galactosidade), B (limite de detecção) e p (inclinação do trecho linear da curva entre A e B), como representado na Figura 3.

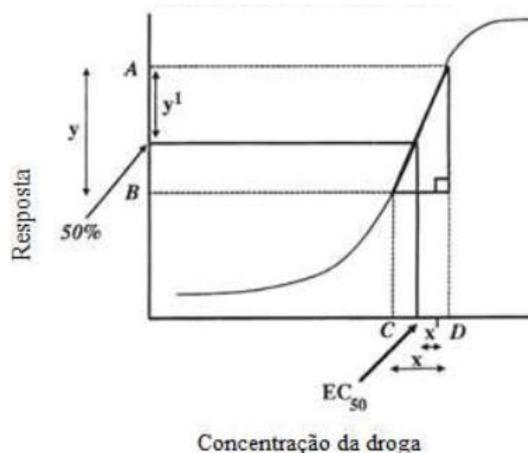


Figura 3 - Curva dose – resposta hipotética. Fonte: Adaptado de Alexander *et al* (1999).

O valor de EC_{50} das amostras, determinado através do ajuste à curva sigmoideal dose resposta (Equação 2), no qual seu valor é calculado em função dos fatores encontrados na curva padrão do 17 β -estradiol. O valor de y corresponde à absorbância corrigida do EC_{50} referente a cada amostra.

$$EC_{50amostra} = EC_{50padr\tilde{a}o} \times \left(\frac{(A-B)}{(y-B)} - 1 \right)^{\frac{1}{p}} \quad \text{Eq. 2}$$

Os valores de EC_{50} das amostras são expressos em equivalentes em estradiol (EQ-E2), com o objetivo de comparar os testes entre si, relacionando todas as amostras à atividade do estrogênio E2. Essa relação foi feita no *software* Excel®, assim como todo ajuste.

3 Resultados e Discussão

O teste YES representou os resultados dos ensaios de cloração feitos no LAQUA. NA Figura 4, têm-se a curva padrão de 54,48 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 (linhas “C”) e as linhas do branco (linhas “B”). Observa-se a mudança de cor da curva, indicando a atividade estrogênica. A curva atendeu a faixa de concentração de 5448 a 21,3 ng.L^{-1} de E2. Faixa próxima foi obtida em Fischer (2013), 5448 a 27 ng.L^{-1} , e em Bila (2005), 5448 a 26,61 ng.L^{-1} . Ressalta-se ainda que os resultados de todas as curvas dose – resposta, são feitos através da média das duplicatas do YES como, por exemplo, as linhas “C”, que representam as duplicatas da curva do E2.

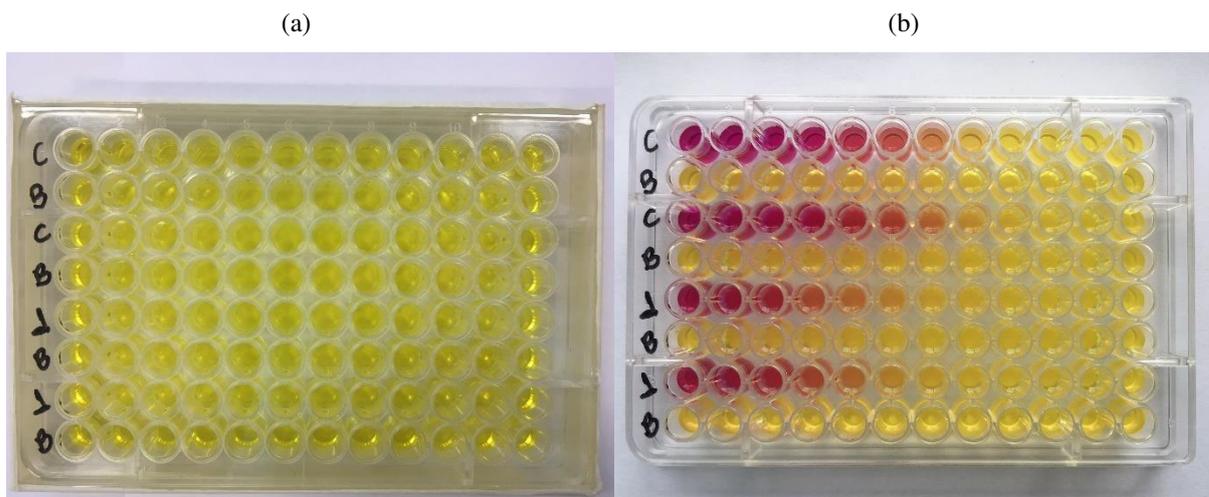


Figura 4 - Microplacas do ensaio YES com a curva padrão do 17 β -estradiol (Linhas “C”), (a) no tempo zero e (b) após 72h de incubação a 32°C.

A partir dos dados das leituras das placas (Figura 4), fez-se o ajuste sigmoidal através de regressão não linear, obtendo assim a curva padrão de 17 β -estradiol, como representado na Figura 5.

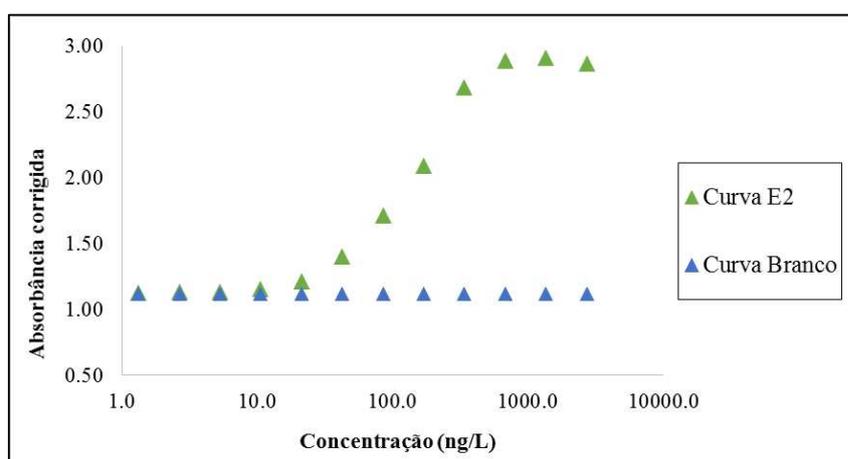


Figura 5 - Curva padrão de 17 β -estradiol e do branco (referente à Figura 4).

A curva apresentou formato sigmoidal esperado, como apresentado na Figura 3, tendo como resultados os seguintes valores: concentração correspondente a uma atividade igual a 50% do controle positivo do 17 β -estradiol ($EC_{50} = 139 \pm 9 \text{ ng.L}^{-1}$); máxima indução da β -galactosidase ($A = 2,952 \pm 0,043$); limite de detecção ($B = 1,135 \pm 0,028 \text{ ng.L}^{-1}$) e inclinação do trecho linear da curva entre A e B ($p = 1,681 \pm 0,169$).

O valor de EC_{50} ($0,139 \mu\text{g.L}^{-1}$) foi inferior ao encontrado na literatura, visto que Fischer (2013) obteve $0,48 \mu\text{g.L}^{-1}$, e Bila (2005) $2,13 \mu\text{g.L}^{-1}$. Tal fato pode ser explicado visto que esse valor é influenciado pelo número inicial de células e o tempo de incubação (FISCHER, 2013). Como a densidade óptica do teste no valor de 0,734, está abaixo da faixa recomendada (0,8 a

1,0), deve-se entender que o menor número de células influenciou o baixo valor do EC₅₀ (BILA, 2005).

A água de mina foi analisada para a verificação de ausência de atividade estrogênica, como forma de validação dos resultados. A Figura 6, apresenta a curva dose-resposta, em escala logarítmica, da água de mina pura e da água de mina dopada com 1 µg.L⁻¹ do estrona, ambas concentradas no fator de trezentas vezes durante a extração, assim como as demais amostras apresentadas. Constata-se portanto, que a água mina é livre de atividade estrogênica.

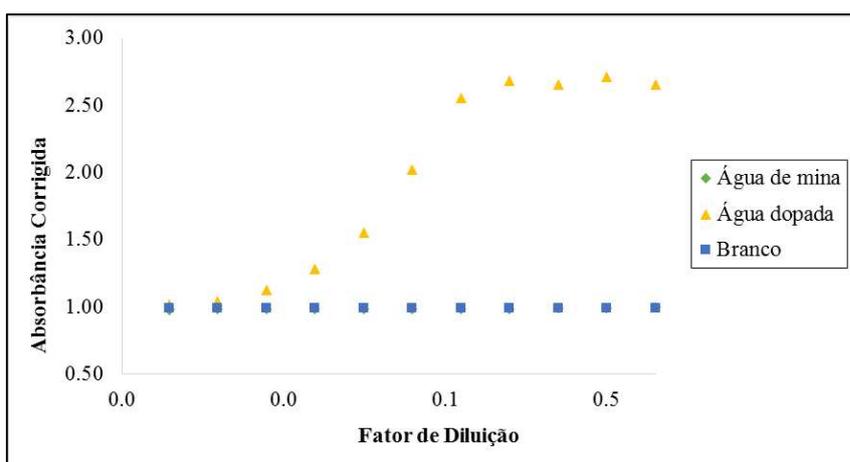


Figura 6 - Curva dose-resposta para as amostras de água de mina, água dopada e do branco após SPE.

Além disso, verificou-se a recuperação do cartucho C18 utilizado na extração de fase sólida, para concentrar as amostras em trezentas vezes. Para isso, comparou-se os valores de absorbância entre a água dopada com 1 µg.L⁻¹ do E1, extraída no *manifold*, com uma solução de E1 300 µg.L⁻¹ em etanol. O resultado apresentado, Figura 7, indicou uma boa recuperação do analito E1. A água dopada ultrapassa a absorbância máxima da curva padrão, demonstrando a alta atividade estrogênica devido a sua concentração.

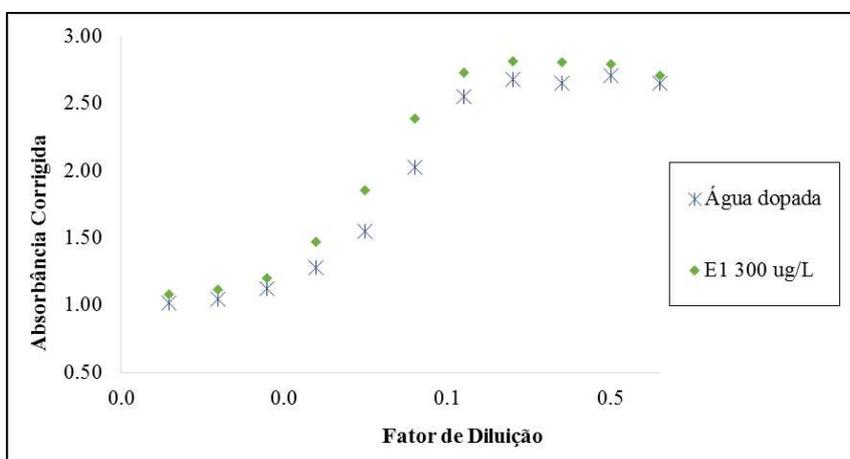


Figura 7 - Curva dose-resposta para as amostras de água dopada (1 µg.L⁻¹ E1 após SPE) e solução de E1 300 µg.L⁻¹ em etanol.

3.1 Ensaio de Cloração – Dose de 0,5 mg.L⁻¹ de cloro

Na Tabela 2, têm-se os parâmetros físico-químicos aferidos antes e depois da cloração.

Tabela 2 - Resultados obtidos nos ensaios de cloração com dose de 0,5 mg.L⁻¹ de cloro.

Parâmetros	Depois da cloração		
	Antes da cloração	(1 minuto)	(30 minutos)
	Média ± DP (n=3)	Média ± DP (n=6)	Média ± DP (n=6)
pH	7,7 ± 0,1	8,5 ± 0,1	8,1 ± 0,2
Cor (uC)	5,5 ± 0,2	5,9 ± 0,6	6,3 ± 0,9
CE (µs.cm⁻¹)	17,4 ± 0,0	19,3 ± 0,1	19,4 ± 0,6
Turbidez (uT)	1,9 ± 0,2	1,6 ± 0,3	1,4 ± 0,3
Temperatura (°C)	24,0 ± 0,0	24,0 ± 1,0	26,0 ± 1,1
Cloro livre (mg.L⁻¹)	0,5**	0,44 ± 0,06	0,33 ± 0,01*
Cloro total (mg.L⁻¹)	-	0,46 ± 0,06	0,40 ± 0,04*

DP= Desvio padrão; n= número de amostras; CE= condutividade elétrica; *média e desvio de apenas de duas alíquotas; **cloro adicionado.

A temperatura do ensaio variou de 24°C a 26°C. Já a condutividade aumentou após a cloração, como também observa-se nos demais testes, sendo essa proporcional a dose de cloro adicionada (Tabela 2, 4 e 6). A cor diminuiu de acordo com o tempo de contato, sendo que o oposto ocorre com a turbidez, tal fato pode ter como causa a oxidação do material em suspensão da amostra.

Os resultados das curvas dose-respostas das duplicatas de cada amostra, obtidas no teste YES, estão representados na Figura 8. A curva correlaciona o valor das absorbâncias corrigidas versus o fator de diluição, observa-se que ambas as curvas apresentaram formato sigmoidal como da curva padrão.

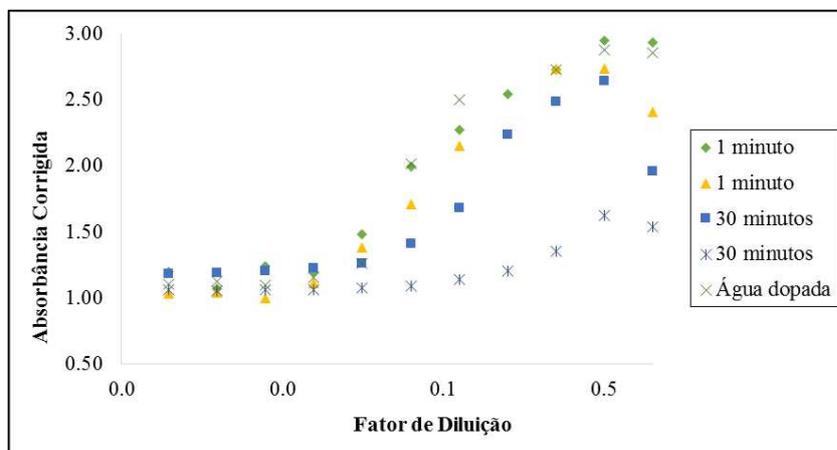


Figura 8 - Curva dose-resposta para as amostras do ensaio de cloração de 0,5 mg.L⁻¹ de cloro.

Através das curvas, observa-se que ocorreu uma maior remoção da atividade estrogênica no maior tempo de contato (30 minutos). A diferenciação entre as duplicatas, principalmente as de 30 minutos, pode estar relacionada com o menor número de células encontrados nos poços das amostras, erro causado devido ao grande volume do meio de análise, resultando em uma baixa dispersão da levedura. Assim, recomenda-se um máximo de nove amostras por teste YES.

Para uma melhor comparação entre os resultados, calcula-se o equivalente de 17 β -estradiol (EQ-E2) para cada amostra. O EQ-E2, causado pelo E1 no caso destes ensaios, compara a potência estrogênica da amostra com a que é causada pelo 17 β -estradiol. Estes resultados estão apresentados na Tabela 3, assim como a eficiência de remoção para cada tempo de contato do cloro.

Tabela 3 - EQ-E2 das amostras do ensaio de 0,5 mg.L⁻¹ de cloro.

Valor de EQ-E2 (ng.L⁻¹)	1 minuto	30 minutos
Água dopada	11,6	11,6
Amostra 1	11,5	4,9
Amostra 2	7,9	0,5
Média \pm DP (n=2)	9,7 \pm 2,5	2,7 \pm 3,1
Remoção EQ-E2 (%)	16,5	76,8

DP= Desvio padrão; n= número de amostras.

A remoção do EQ-E2 é calculada em função do valor médio da amostra sob o valor da água dopada. A dose de cloro de 0,5 mg.L⁻¹ se mostrou pouco eficaz, não sendo adequada para a remoção de estrona em ETA, principalmente quando observa-se os altos valores encontrados nas águas superficiais do Brasil (Tabela 1), sendo o maior valor relatado três vezes maior que o valor da água dopada.

Valores encontrados em Chen *et al.* (2007), mostram que a estrona foi removida em 28% a 25%, com a dose de cloro de 1 mg.L⁻¹ a 10 minutos de tempo de contato, nas concentrações iniciais de 100 e 500 ng.L⁻¹ de estrona, respectivamente.

O tempo de contato foi diretamente relacionado com a remoção de EQ-E2, visto que a remoção foi maior para o tempo de 30 minutos, quando comparada ao de 1 minuto. O mesmo ocorre em Pereira (2011), onde houve a remoção em 44% e 95%, para a dose de cloro de 1 mg.L⁻¹ e tempo de 10 e 30 minutos, respectivamente.

3.2 Ensaio de Cloração – Dose de 2,75 mg.L⁻¹ de cloro

Para a cloração com 2,75 mg.L⁻¹ de cloro, os parâmetros físico-químicos aferidos estão na Tabela 4. Observa-se que ambos os parâmetros de cor e turbidez apresentaram decréscimo após a cloração.

Tabela 4 - Resultados obtidos nos ensaios de cloração com dose de 2,75 mg.L⁻¹ de cloro.

Parâmetros	Antes da cloração	Depois da cloração (15,5 minutos)
	Média ± DP (n=3)	Média ± DP (n=6)
pH	7,2 ± 0,0	7,5 ± 0,0
Cor (uC)	7,0 ± 0,4	5,6 ± 0,8
CE (µs.cm⁻¹)	16,9 ± 0,0	30,2 ± 0,9
Turbidez (ut)	2,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1
Temperatura (°C)	22,0 ± 0,0	24,8 ± 0,3
Cloro livre(mg.L⁻¹)	2,75**	2,05 ± 0,07*
Cloro total (mg.L⁻¹)	-	2,58 ± 0,04*

DP= Desvio padrão; n= número de amostras; CE= condutividade elétrica; *média e desvio de apenas de duas alíquotas; **cloro adicionado.

As curvas dose-respostas estão representados na Figura 9. Observa-se que ambas as curvas apresentaram formato sigmoidal como a curva padrão.

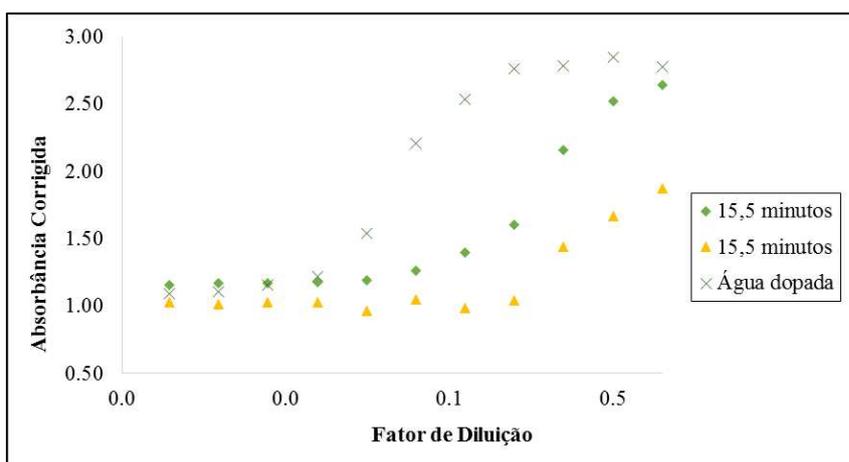


Figura 9 - Curva dose-resposta para as amostras do ensaio de cloração de 2,75 mg.L⁻¹ de cloro.

O equivalente de 17 β-estradiol (Tabela 5), detalha a remoção de estrona para o ensaio de 2,75 mg.L⁻¹ de cloro, como também observado na Figura 9.

A remoção observada foi de 90,2% de EQ-E2, em relação a média das duplicatas. Em Pereira (2011), houve a remoção em 96% e 95% de E1, para dose de cloro de 2 mg.L⁻¹ e tempo

de 10 e 30, respectivamente. Gerolin (2008) observou que a remoção do E1 para doses de cloro que variaram de 2,5 a 4,5 mg.L⁻¹ em ETA, foi de 80,5% a 99,1%. Portanto, o valor encontrado condiz com a faixa de remoção relatada na literatura.

Tabela 5 - EQ-E2 das amostras do ensaio de 2,75 mg.L⁻¹ de cloro.

Valor de EQ-E2 (ng.L⁻¹)	15,5 minutos
Água dopada	14,1
Amostra 1	2,2
Amostra 2	0,5
Média ± DP (n=2)	1,4 ± 1,2
Remoção EQ-E2 (%)	90,2

DP= Desvio padrão; n= número de amostras.

3.3 Ensaio de Cloração – Dose de 5 mg.L⁻¹ de cloro

A Tabela 6, apresenta os parâmetros físico-químicos aferidos antes e depois da cloração de acordo com o tempo de contato. O valor de cloro livre, como esperado, é maior para o tempo de 1 minuto. Além disso, ambos os parâmetros de cor e turbidez aumentaram no primeiro tempo e reduziram aos 30 minutos.

Tabela 6 - Resultados obtidos nos ensaios de cloração com dose de 5 mg.L⁻¹ de cloro.

Parâmetros	Antes da cloração	Depois da cloração (1 minuto)	Depois da cloração (30 minutos)
	Média ± DP (n=3)	Média ± DP (n=6)	Média ± DP (n=6)
pH	7,5 ± 0,0	8,0 ± 0,0	7,8 ± 0,2
Cor (uC)	6,5 ± 0,8	7,4 ± 0,8	5,9 ± 0,4
CE (µs.cm⁻¹)	17,4 ± 0,0	40,6 ± 0,4	40,4 ± 0,1
Turbidez (ut)	1,9 ± 0,3	2,0 ± 0,3	1,8 ± 0,3
Temperatura (°C)	22,0 ± 0,0	25,0 ± 0,0	25,5 ± 0,5
Cloro livre (mg.L⁻¹)	5,0**	4,43 ± 0,04	4,25 ± 0,07*
Cloro total (mg.L⁻¹)	-	4,95 ± 0,00	4,70 ± 0,00*

DP= Desvio padrão; n= número de amostras; CE= condutividade elétrica; *média e desvio de apenas de duas alíquotas; **cloro adicionado.

As curvas dose-respostas (Figura 10), apresentam as absorvâncias de cada amostra do ensaio, em relação ao fator de diluição.

apresentou menor EQ-E2_{final} do que o tempo de 30 minutos, fato esse provavelmente causado pelos subprodutos formados (PEREIRA, 2011; ALUM *et al.*, 2004; WESTERHOFF *et al.*, 2005).

O resultado dos ensaios foram satisfatórios (Tabela 8), quando comparados com a literatura. Além disso, todas as curvas apresentaram formato sigmoidal e a mesma faixa de absorvância, indicando que houve total indução da β -galactosidade (VILLENEUVE *et al.*, 2000; FINNEY, 1965).

Tabela 8 - Valores de EQ-E2 das amostras e suas respectivas remoções.

Dose de Cloro (mg.L ⁻¹)	Tempo (minutos)	EQ-E2 inicial (ng.L ⁻¹)	EQ-E2 final (ng.L ⁻¹)	Remoção do EQ-E2 (%)
0,5	1	11,6	9,7 ± 2,5	16,5
	30	11,6	2,7 ± 3,1	76,8
2,75	15,5	14,1	1,4 ± 1,2	90,2
5,00	1	14,2	0,3 ± 0,2	98,0
	30	14,2	0,9 ± 0,3	93,8

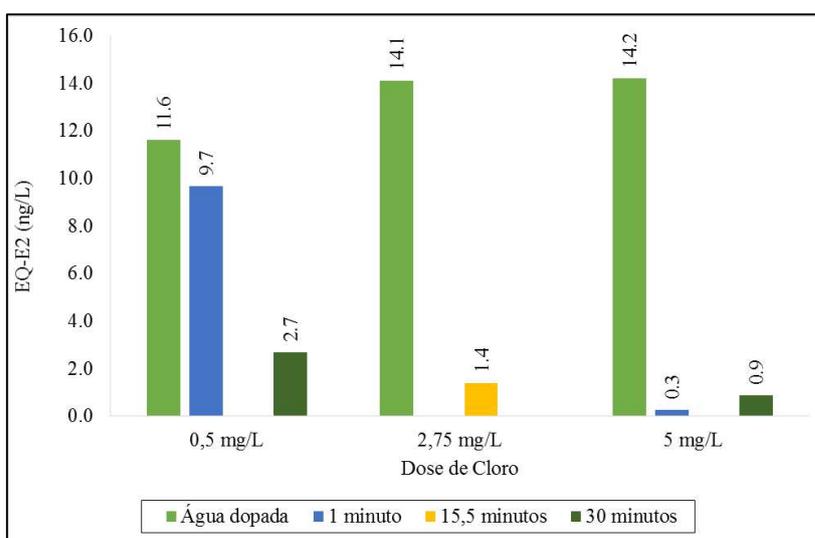


Figura 11 - Valores de EQ-E2 das amostras dos ensaios de cloração.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios realizados neste estudo, o tratamento mais indicado para uso em ETA, seria a cloração com 5 mg.L⁻¹ de cloro no tempo de 1 minuto (remoção de 98,0%), resultando em um residual de 20 ng.L⁻¹ de compostos formados a partir da cloração do estrona, que podem ser identificados através de técnicas de cromatografia.

A literatura relata que a concentração prevista para não provocar efeito negativo na vida aquática (PNEC), é de 100 ng.L⁻¹ de E1 (CALDWELL *et al.*, 2012). Em humanos, a aquisição diária aceitável através de comida seria de 1000 ng.L⁻¹ para homens e 50000 ng.L⁻¹ para

mulheres (SHARGIL *et al.*, 2015). Como consequência de ingestão (via alimento ou água) de elevadas concentrações, têm-se a indução menopausa prematura, problemas com o desenvolvimento reprodutivo, aumento de casos de câncer de mama e de próstata (BOLONG *et al.*, 2009; SUMPTER e JOBLING, 2013; NELLES *et al.*, 2011; MOORE *et al.*, 2016).

4 Conclusões

Através da análise dos resultados, verifica-se que a implementação do teste YES no LAQUA foi bem sucedida, não apresentando contaminações e contabilizando de forma coerente a atividade estrogênica. O teste YES valida-se devido a não atividade estrogênica da água de mina usada, apresentando atividade somente após a adição do estrona. Além disso, ressalta-se que para melhor entendimento dos resultados, o YES deve ser complementando com análises químicas e ensaios *in vivo*.

Em relação a abrangência da curva padrão e conseqüentemente o valor de EC₅₀ padrão, entende-se que para melhores resultados, o crescimento da levedura deve ser acompanhado para a obtenção de uma maior concentração inicial, indicado pela densidade óptica da mesma. Além disso, para evitar a baixa dispersão da levedura no meio de análise, deve-se analisar menores números de amostras por teste YES, sendo nove amostras o valor recomendado.

Nota-se que a cloração obteve bons resultados para a remoção da atividade estrogênica, com remoção de 16,5% a 98,0%. Sendo que nas condições definidas pela Portaria 2914/2011, a maior remoção ocorreu para a dose de cloro de 5 mg.L⁻¹ no tempo de contato de 1 minuto. Para a mesma dose de cloro, porém no tempo de 30 minutos houve formação de subprodutos com atividade estrogênica maior do que os formados anteriormente, deixando claro que mais ensaios devem ser feitos, visando uma melhor análise da remoção dos compostos estrogênicos.

5 Agradecimentos

Agradeço a Deus por me permitir chegar aqui e aprender tanto durante o caminho. Agradeço à toda minha família, namorado e amigos, pelo apoio e as orações que me mantiveram de pé. Agradeço aos meus parceiros João, Taiza e Juliana, pelas horas de amizade no Laboratório de Qualidade Ambiental da UFJF e a querida Iramaia por toda ajuda. Agradeço as minhas professoras Renata Pereira e Sue Ellen Bottrel, pelos ensinamentos e paciência. Ao Laboratório de Ecologia e ao Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos da UFJF; ao Laboratório de Engenharia Sanitária da UERJ, em especial à professora Daniele Maia Bila; e ao Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da UFV, principalmente a Natália

Rezende e a professora Ann Honor Mountheer, por toda disponibilidade em nos ajudar. À querida Nicole Hastenreiter por toda paciência. Aos meus professores do Departamento de Engenharia Ambiental e Sanitária, em especial a Iara Furtado Santiago e o Emanuel Brandt. Ao apoio da FAPEMIG e de toda a Universidade Federal de Juiz de Fora.

6 Referências

ALEXANDER, B. et al. A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC50. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 41, n. 2–3, p. 55-58, 1999.

ALUM, A. et al. *Oxidation of bisphenol A, 17 beta-estradiol, and 17 alpha-ethynyl estradiol and byproduct estrogenicity*. *Environmental Toxicology*, v.19. n.3, p.257-264, 2004.

AWWA - AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION. *Removal of EDCs and pharmaceuticals in drinking and reuse treatment processes*. Washington, CC, 2007. Disponível em: < http://environmentalhealthcollaborative.org/images/91188_Removal-Treatment.pdf> Acesso em: 05 de abril de 2017.

BILA, D.M. *Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17β-Estradiol pelo Processo de Ozonização*. Tese de Doutorado em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2005.

BOLONG, N., ISMAIL, A., SALIM, M.R., MATSUURA, T. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 239, 229–246, 2009.

BRASIL. *Portaria nº 2.914, de 12 de Dezembro de 2011 do Ministério da Saúde*. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, DF, 2011.

CALDWELL, D.J., MASTROCCO, F., ANDERSON, P.D., LÄNGE, R., SUMPTER, J.P. Predicted-no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17β-estradiol, estriol, and 17α- ethinylestradiol. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1396–1406, 2012.

CHEN, C.Y.; WEN, T.Y.; WANG, G.S.; CHENG, H.W.; LIN, Y.H.; LIEN, G.W. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow

solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Science of the Total Environment*, 378, 352–365, 2007.

FINNEY, D. J. *The Meaning of Bioassay*. *Biometrics*, v. 21, n. 4, p. 785-798, 1965.

FISCHER, N. *Cloração da água com 17 β -estradiol e utilização do teste YES para avaliação da estrogenicidade*. Dissertação de mestrado em Ciências em Engenharia Hidráulica e Saneamento. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2013. .

GEROLIN, E.R.R. *Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré - São Paulo*. Tese de Doutorado em Engenharia Civil. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Campinas, 2008.

JOHNSON, A.C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *The Science of the Total Environmental*, n. 256, p. 163-173, 2000.

LIMA, D.R.S.; AFONSO, R.J.; LIBANIO, M.; AQUINO, S.F. Avaliação da remoção de fármacos e de desreguladores endócrinos em águas de abastecimento por clarificação em escala de bancada. *Química Nova*, v.37, n.5, p.783-788, 2014.

MOORE, S.C., MATTHEWS, C.E., SHU, X.O., YU, K., GAIL, M.H., XU, X., JI, B.-T., CHOW, W.-H., CAI, Q., LI, H. Endogenous bstrogens, estrogen metabolites, and breast cancer risk in postmenopausal Chinese women. *J. Nat. Cancer Inst.* 108, 2016.

NELLES, J.L., HU, W.-Y., PRINS, G.S. Estrogen action and prostate cancer. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 6, 437–451, 2011.

PEREIRA, R. D. O. *Formação de subprodutos do estrona e 17 β -estradiol na oxidação utilizando cloro e o ozônio em água*. Tese de Doutorado em Hidráulica e Saneamento. 192 p. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

RESENDE, T.C; NETO, J.M.; AZEVEDO, T.S.; BOTTREL, S.E.C.; PEREIRA, R.O. *Estudo Comparativo entre as concentrações de hormônios reportados em matrizes ambientais aquosas no Brasil e no exterior*. In: Congresso ABES – FENASAN 2017. São Paulo. No prelo 2017.

ROUTLEDGE, E. J., SUMPTER, J. P., 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 3, p. 241-248, 1996.

SHARGIL, D., GERSTL, Z., FINE, P., NITSAN, I., KURTZMAN, D. Impact of biosolids and wastewater effluent application to agricultural land on steroidal hormone content in lettuce plants. *Sci. Total Environ.* 505, 357–366, 2015.

SNIS - SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO. *Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos*. Disponível em: < <http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos/diagnostico-ae-2014>> Acesso em: 4 de abril de 2017.

SUMPTER, J.P., JOBLING, S. The occurrence, causes, and consequences of estrogens in the aquatic environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 249–251, 2013.

USEPA -UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *Endocrine Disruption*. Disponível em: <<https://www.epa.gov/>> Acesso em: 03 de março de 2017.

VILLENEUVE, D. L.; BLANKENSHIP, A. L.; GIESY, J. P. Derivation and application of relative potency estimates based on in vitro bioassay results. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 19, n. 11, p. 2835-2843, 2000.

WESTERHOFF, P. et al. Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. *Environmental Science & Technology*, v. 39, n. 17, p. 6649-6663, 2005.