

Levedura luminescente

Pesquisadores utilizam microrganismo para detectar hormônio em rios

Yuri Vasconcelos

Um novo tipo de teste realizado por uma equipe de pesquisadores da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) em cooperação com colegas norte-americanos da Universidade do Tennessee revelou que alguns mananciais do estado de São Paulo possuem níveis elevados de compostos estrogênicos, uma classe de contaminante que pode trazer sérios riscos ao ambiente, aos animais e à saúde humana. O teste, baseado no uso de leveduras transgênicas luminescentes, mostrou que a situação é pior no rio Cotia, curso d'água da Região Metropolitana de São Paulo usado para abastecimento de várias cidades. Ao todo, amostras de água de quatro mananciais – rios Cotia, Atibaia e Sorocaba e represa Tanque Grande, em Guarulhos – foram examinadas pela equipe, que contou também com a participação de técnicos da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb), ligada à Secretaria do Meio Ambiente do governo paulista.

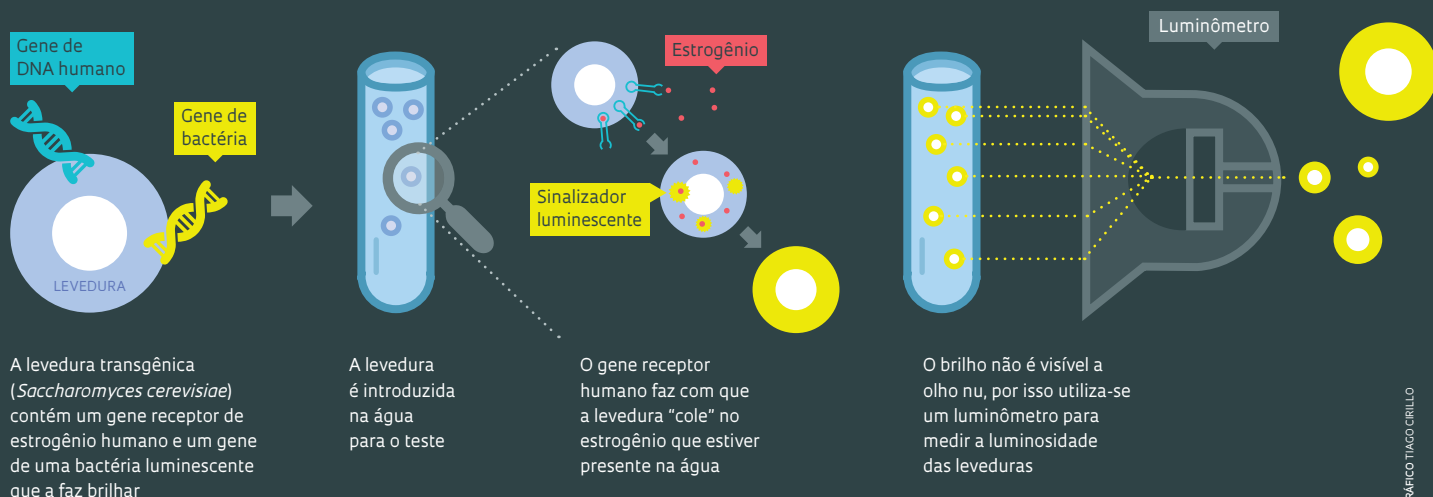
A análise revelou que 83% das amostras apresentavam atividade estrogênica, sendo que oito dos 16 compostos rastreados foram encontrados em pelo menos uma amostra. “Nossa pesquisa encontrou valores mais elevados nos lugares sabidamente mais contaminados por esgoto doméstico”, afirma a toxicologista Gisela Umbuzeiro, professora da Faculdade de Tecnologia da Unicamp, que coordenou o trabalho. “Não é ainda uma situação alarmante, mas requer uma ação

imediate das autoridades no sentido de melhorar a situação do tratamento de esgoto no país.” Segundo Gisela, o bioensaio é muito sensível e pode ter aplicação imediata no monitoramento da qualidade das águas por órgãos ambientais. “O projeto foi concebido com esse fim”, diz ela.

Também chamados de interferentes endócrinos, por apresentarem atividade de desregulação das glândulas endócrinas, produtoras de hormônios, os compostos estrogênicos têm preocupado cientistas e autoridades sanitárias em função de sua rápida disseminação pelas reservas de água do planeta. Estudos revelam que, dependendo do nível de concentração em que se encontram na água, eles podem provocar a feminilização de peixes e anfíbios, gerar anomalias sexuais em moluscos e reduzir a taxa de fertilidade de ursos-polares, no caso do hemisfério Norte.

Suspeita-se, também, de que a presença desses poluentes na água para consumo humano esteja antecipando a primeira menstruação de meninas e reduzindo o número de espermatozoides em homens. Esses compostos são um vasto grupo de hormônios, entre eles os hormônios sexuais naturais femininos estrona (E1), 17β-estradiol (E2) e estriol (E3), o estrogênio sintético 17-alfatínilestradiol (EE2), usado em pílulas anticoncepcionais, e o bisfenol A, composto industrial que participa da produção de vários produtos, como plásticos policarbonatos, resinas epóxi, fungicidas e alguns tipos especiais de papel.

Levedura detecta estrogênio na água



O problema é que muitas dessas substâncias são eliminadas na urina. Também se tornam contaminantes por meio do despejo de medicamentos no vaso sanitário, urina de animais que recebem hormônios e a chuva os leva pelas redes de esgoto ou diretamente para os rios e lagos ou ainda da tinta que reveste o casco de navios e barcos. São compostos de diferentes fontes difusas que se não forem removidas, das redes de esgoto, acabam contaminando rios, lagos e reservatórios de água. “Em geral, os métodos convencionais de tratamento de água e esgoto não são capazes de remover esses compostos com a eficiência desejada. Quando isso ocorre, eles podem atingir a água usada para consumo humano”, afirma o professor Wilson Jardim, responsável pelo Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química da Unicamp e coordenador de um projeto apoiado pela FAPESP sobre o tema.

Existem métodos de tratamento de esgoto eficientes para a eliminação desses hormônios, como os oxidativos avançados e os que utilizam ultrafiltração, mas nem sempre são usados porque possuem custos elevados. O risco de contaminação é maior em países com deficiências no serviço de saneamento, como o Brasil, onde, em muitos lugares, o tratamento de esgoto é inexistente.

A importância do estudo feito no Brasil é o seu inéditismo. Depois de desenvolverem a levedura bioluminescente, os pesquisadores da Universidade do Tennessee passaram a usá-la em ensaios pa-

ra detectar atividade estrogênica em rios dos Estados Unidos, como o Potomac, que banha a capital do país. Mas os resultados foram negativos porque a presença desses compostos nos mananciais de lá é pequena. “A inovação do nosso trabalho foi que, pela primeira vez, aplicou-se em larga escala o teste com as leveduras para monitorar a qualidade de águas brutas e tratadas, comparando os resultados com análises químicas de compostos estrogênicos. Isso nunca havia sido feito antes”, diz Gisela, que trabalhou durante 22 anos na Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental da Cetesb. Para usar a levedura transgênica no Brasil, a empresa pediu autorização para a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

MONITORAMENTO FUTURO

Em razão dos bons resultados do projeto, a companhia informou que pretende usar o ensaio em suas atividades de monitoramento. “Estamos ajustando a metodologia e temos interesse em implantar no futuro o teste em nossos monitoramentos de água superficial e subterrânea”, afirmou Rúbia Kuno, a atual gerente da mesma divisão da Cetesb.

O teste Blyes (sigla de *bioluminescent yeast estrogen screen* ou ensaio com levedura bioluminescente para detecção de estrogênio) bem como a levedura transgênica empregada para monitorar a qualidade dos mananciais paulistas foram desenvolvidos pela equipe do microbiologista John Sanseverino e da bióloga molecular Melanie Eldridge, do Centro de Bio-

tecnologia Ambiental da Universidade do Tennessee, com quem a pesquisadora Gisela mantém contato desde 2008. “Fiz duas visitas ao laboratório para aprender a realizar o ensaio. Minha aluna de mestrado Ana Marcela Bergamasco, da Faculdade de Farmácia da USP, também esteve lá”, conta Gisela. Em 2010 foram feitas análises de várias amostras de água nos Estados Unidos. No começo de 2011 foi possível implantar o ensaio na Cetesb com um lote de leveduras doadas pelos pesquisadores do Tennessee.

Para desenvolver o teste, os cientistas norte-americanos precisaram, inicialmente, fazer alterações no código genético da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

OS PROJETOS

1. Ocorrência e atividade estrogênica de interferentes endócrinos em água para consumo humano e em mananciais do estado de São Paulo - nº 2007/58449-2
2. Implementação do teste para avaliação da atividade endócrina em leveduras luminescentes Blyes e Blyas - nº 2010/17918-2

MODALIDADES

1. Projeto Temático
2. Auxílio Regular a Projeto de Pesquisa - Pesquisador Visitante

COORDENADORES

1. Wilson de Figueiredo Jardim - Unicamp
2. Gisela Umbuzeiro - Unicamp

INVESTIMENTO

1. R\$ 349.285,93 e US\$ 350.654,38 (FAPESP)
2. R\$ 20.697,01 (FAPESP)

a fim de torná-la luminescente e capaz de detectar os compostos estrogênicos. Em laboratório, o organismo recebeu um gene que produz o receptor de estrógeno humano e um conjunto de genes envolvidos na produção de luz, oriundos de uma bactéria luminescente. “A produção da linhagem das leveduras luminescentes levou dois anos. Ela ficou pronta em 2005 e está em contínuo aperfeiçoamento”, diz a pesquisadora Melanie Eldridge.

O gene produtor do receptor de estrógeno está sempre ativo na levedura, ou seja, produzindo o receptor ininterruptamente. Quando este se liga a compostos estrogênicos presentes na amostra de água testada, o conjunto receptor mais compostos estrogênicos ativa os genes da produção de luz e a levedura fica luminescente. Para quantificar essa luminescência – que não é visível a olho nu –, os cientistas usam um equipamento muito sensível chamado luminômetro. “A intensidade da luz é proporcional à quantidade de compostos estrogênicos detectados”, explica Gisela. Essa medida de luz é sempre relativa a um composto padrão, como o E2. “Por isso, dizemos que uma amostra tem o equivalente a xis nanogramas de E2 por litro.”

Perto de 400 amostras de água colhidas nos rios Sorocaba, Cotia e Atibaia e no reservatório Tanque Grande foram analisadas pela Cetesb e Unicamp, com apoio de Melanie. A bióloga norte-americana passou três meses no Brasil no início de 2011 ajudando

Rio Cotia, na Região Metropolitana de São Paulo, tem o pior nível de contaminação

É preciso mudar a legislação para eliminar a contaminação com estrógenos nos rios

na implantação do teste e na capacitação do grupo de pesquisa. As amostras foram coletadas e em seguida levadas ao laboratório em caixas de isopor com gelo, onde passaram por um procedimento de extração em fase sólida, com o objetivo de torná-las mais concentradas. Essa etapa é importante, pois facilita a detecção dos compostos estrogênicos eventualmente presentes na água.

As mesmas amostras foram submetidas à análise química pela técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, método já utilizado por algumas companhias de saneamento na detecção de compostos estrogênicos em água. Assim, os pesquisadores compararam os resultados do Blyes com os da análise química convencional.

“Concluímos que o nosso teste é muito eficiente, mais fácil de usar e mais barato. Uma vez implantado, requer apenas alguns

reagentes de baixo custo para preparar o meio de cultura da levedura. É necessário um investimento inicial com o medidor de luz que não chega nem a 10% do valor de um cromatógrafo líquido, que custa entre US\$ 200 mil e US\$ 500 mil. Além disso, ele é mais rápido, porque permite realizar centenas de amostras por mês. Uma vez padronizado, ele não requer grande infraestrutura para sua operação”, diz Gisela. Sensibilidade é outra vantagem do Blyes. No caso do EE2, que é um composto

muito potente, o limite de quantificação do método químico foi estimado em 4,2 nanogramas por litro (ng/litro), enquanto o ensaio com as leveduras é capaz de detectar concentrações de apenas 0,01 ng/litro. No caso do E2, o limite de quantificação por análise química é de 1,8 ng/litro diante de 0,1 ng/litro do Blyes. Esse sistema não substitui as análises químicas mas em programas de monitoramento pode ser uma opção muito eficiente.

A expectativa dos pesquisadores é que os resultados chamem a atenção das instituições regulatórias ligadas ao ambiente e ao saneamento básico para a necessidade de definir normas e ações corretivas na gestão dos serviços de água e esgoto. “Nosso objetivo é prover um cenário da contaminação de importantes mananciais de água do estado e ferramentas para a solução ou minimização do problema. É preciso mudar a legislação para combater o problema”, destaca o professor Wilson Jardim. No futuro, o bioensaio com as leveduras luminescentes poderá estar disponível para qualquer interessado. “Planejamos comercializar o teste Blyes”, afirma Melanie. Estamos verificando como vender as linhagens de forma que muita gente – e não apenas cientistas – possa usá-las para testar suas amostras de água.” ■



Artigos científicos

1. BERGAMASCO, A.M.D.D. *et. al.* Bioluminescent yeast estrogen assay (Blyes) as a sensitive tool to monitor surface and drinking water for estrogenicity. *Journal of Environmental Monitoring*, v. 13, p. 3288-93, 2011.
2. MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and Seasonal Variations of Pharmaceuticals and Endocrine Disruptors in the Atibaia River, Sao Paulo State (Brazil). *Journal of The Brazilian Chemical Society*, v. 22, n. 8, p. 1.452-62, 2011.