

## II-393 – DEGRADAÇÃO DE BISFENOL A, 17 $\beta$ -ESTRADIOL E 17 $\alpha$ - ETINILESTRADIOL POR CL/UV E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA

### **Fernanda Pereira Chaves<sup>(1)</sup>**

Engenheira Civil pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Mestranda em Engenharia ambiental pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

### **Giselle Gomes<sup>(1)</sup>**

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), mestre em Engenharia Ambiental pela UERJ. Doutoranda em Engenharia ambiental pela UERJ.

### **Morgana Bosio<sup>(2)</sup>**

Possui graduação em Engenharia Química pela Faculdade Aracruz. Pós-graduação MBA em gerenciamento de projetos pela Faculdade do Centro Leste. Mestrado em Engenharia Química pela Universidade Federal de São Carlos. Cursando Doutorado Em Engenharia Química na Coppe pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### **Enrico Mendes Saggioro<sup>(2)</sup>**

Possui graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Federal de Juiz de Fora. Doutorado em Saúde Pública e meio ambiente pela Escola Nacional de saúde pública/Fiocruz. Pós-Doutorado no Programa de Engenharia Química da UFRJ/COPPE. Pesquisador do Departamento de Saneamento e saúde ambiental da Fiocruz/ENSP e professor adjunto de toxicologia clínica da Faculdade de medicina da Universidade Federal Fluminense.

### **Daniele Maia Bila<sup>(1)</sup>**

Engenheira Química pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Mestre, Doutora em Engenharia Química pela COPPE/UFRJ. Professor associado pelo Departamento de Engenharia sanitária e do meio ambiente da FEN/UERJ.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** R. São Francisco Xavier, 524 - Maracanã - Rio de Janeiro - RJ - Cep 20550-900.

**Endereço<sup>(2)</sup>:** R. Leopoldo Bulhões, 1480 - Bonsucesso, Rio de Janeiro - RJ, Cep. 21041-210. E-mail: [nandapchaves@gmail.com](mailto:nandapchaves@gmail.com)

## RESUMO

Desreguladores endócrinos são compostos que mesmo em concentrações muito baixas causam efeitos nocivos e desordens no sistema endócrino de seres vivos. Essas substâncias são encontradas em bens de consumo, medicamentos, pesticidas, estrogênios naturais, dentre outros. Estudos indicam que desreguladores endócrinos provocam efeitos adversos em seres vivos como feminização de peixes machos, deformações, problemas no sistema reprodutivo levando em alguns casos ao declínio da população. Dessa maneira, fica claro a importância de estudos que visem a degradação desses compostos resistentes aos tratamentos convencionais. A alternativa adotada nesse estudo é a oxidação utilizando cloro e radiação ultravioleta (Cl/UV) para degradação do bisfenol A, 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ - etinilestradiol em solução sintética com uma combinação dos três compostos, foram avaliadas a toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia similis* e a atividade estrogênica pelo ensaio *in vitro* *Yeast estrogen screen* (YES). O estudo demonstrou que para a concentração inicial de 100  $\mu$ g/L dos três compostos a solução sintética não apresentou toxicidade aguda para o organismo *Daphnia similis*. Os tratamentos CL/UV demonstraram remoção total da atividade estrogênica dos desreguladores endócrinos estudados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Desreguladores endócrinos, Ensaio *in vitro* YES, *Daphnia similis*, Cl/UV.

## INTRODUÇÃO

Com o avanço tecnológico, novas substâncias foram criadas para fins domésticos, comerciais e industriais. Muitas dessas substâncias se encontram no meio ambiente na ordem de ng/L a  $\mu$ g/L, sendo classificadas como micropoluentes (PETROVIC e BARCELÓ, 2006). Dentro dessa classificação, encontram-se substâncias capazes de alterar e causar danos as funções endócrinas de seres vivos, como a síntese, excreção, transporte e reprodução de hormônios naturais de organismos vivos causando diversos tipos de desordens patológicas (U.S EPA, 1997). Essa classe é denominada desreguladores endócrinos (DE), abrangendo compostos naturais e

sintéticos, como estrogênios, pesticidas, bisfenol A, ftalatos, parabenos, entre outros. Os desreguladores endócrinos podem ser encontrados em águas superficiais e potável, lixiviados, solos, sedimentos marinhos e efluentes de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) (BILA e DEZOTTI, 2007).

Como alternativa para remoção desses compostos de difícil degradação são utilizados os processos oxidativos avançados, que consiste na degradação de substâncias pela ação de um forte agente oxidante ou pela combinação desse agente com radiação ultravioleta.

A combinação de Cl/UV produz espécies reativas de oxigênio que podem degradar moléculas orgânicas de acordo com as Equações (1) a (3) (Yang et al 2016).



A eficiência desse tipo de tratamento pode ser verificada pela redução da toxicidade, assim como pela redução da atividade estrogênica.

O presente trabalho avaliou a eficiência do processo oxidativo avançado Cl/UV na degradação dos desreguladores bisfenol A (BPA), 17 $\beta$ -estradiol (E2) e 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) em solução aquosa pela redução da toxicidade aguda utilizando o organismo *Daphnia Similis*, e pela redução da atividade estrogênica empregando o ensaio *in vitro* (YES).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Preparação da solução sintética

Foi preparada uma solução estoque na concentração de 1mg/L de bisfenol A, 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol, diluídos em água ultrapura e armazenados a temperatura de aproximadamente 4°C. Para a realização dos testes foram preparadas amostras sintéticas por diluição para obtenção da concentração final de trabalho de 100 $\mu$ g/L de cada composto em água ultrapura.

### Sistema fotocatalítico

O sistema de tratamento é constituído por um reator (Figura 1) cuja solução aquosa sintética a ser tratada se encontra no volume de 500 mL, sendo exposta a radiação UV e Hipoclorito de Sódio.

A amostra aquosa composta pela mistura de BPA, E2 e EE2, com 100 $\mu$ g/L de cada composto, foi exposta ao Hipoclorito de Sódio nas concentrações de 100mM (experimento 1) e 500mM (experimento 2), radiação ultravioleta com 14,79 mW/cm<sup>2</sup> no comprimento de onda de 254nm e 6,80 mW/cm<sup>2</sup> no comprimento de onda de 356 nm, respectivamente. Um sistema de recirculação de água garante que a temperatura se mantenha constante, garantindo dessa forma que a temperatura não interfira na degradação dos compostos.

O tempo de tratamento adotado foi de três horas, sendo realizadas três coletas para cada concentração de Hipoclorito de Sódio analisada. Foram coletadas amostras nos tempos 90 e 180 minutos.



**Figura 1: Sistema reacional para fotocatalise**

### **Ensaio de toxicidade aguda com o organismo-teste *Daphnia similis***

O ensaio com microcrustáceo *Daphnia Similis* foi realizado segundo a norma NBR 12713 (ABNT,2009). As amostras foram analisadas nas concentrações de 100% e 50% utilizando água de cultivo como controle negativo. Foram expostos 5 organismos para 10 mL de cada concentração, sendo feito em quadruplicata, totalizando 20 organismos por diluição. O teste tem duração de 48 horas, sendo 16 horas em presença de luz e 8 horas no escuro, em temperatura de 20 °C. Ao final de 48 horas foi verificada a quantidade de organismos imóveis em cada tubo de 10 mL do teste. O programa estatístico usado foi TRIMMED SPEARMAN-LCPIN, sendo os resultados expressos em CE50 (concentração que elucida 50% da resposta).

### **Ensaio *in vitro* YES**

O ensaio YES (*Yeast Estrogen Screen*) foi utilizado para avaliar a atividade estrogênica das amostras. Foi seguida a metodologia desenvolvida por Routledge e Sumpter (1996) e adaptada por Bila (2005). O ensaio utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, construída por técnicas de engenharia genética. As análises foram realizadas em microplacas de 96 poços para cultura, com fundo chato e tampa estéril, e foram preparadas em uma capela de fluxo laminar, avaliadas em duplicatas.

As amostras foram diluídas na proporção 1:2, seguindo o roteiro:

- Adicionar 100  $\mu$ L de água Mili-Q nos poços da fileira de diluição da amostra, com exceção do primeiro poço;
- No primeiro poço, adicionar 200  $\mu$ L da amostra;
- No segundo poço, adicionar 100  $\mu$ L retirados do primeiro poço e agitar (a agitação foi feita com a própria pipeta, retirando e retornando o extrato ao poço algumas vezes);
- No terceiro poço, adicionar 100  $\mu$ L retirados do segundo poço e agitar;
- Seguir com este procedimento até o último poço, que ficará com o volume final de 200  $\mu$ L.
- 

As amostras, depois de diluídas, foram transferidas imediatamente para a placa de análise, no volume de 10  $\mu$ L para cada poço, em duplicata. Durante a preparação das placas, tomou-se o cuidado de não encostar a ponteira na borda dos poços, para evitar contaminação dos poços vizinhos.

Na placa de análise, utilizou-se uma fileira para amostra e uma para controle negativo, intercalando sempre as fileiras, a fim de garantir que não ocorreria contaminação cruzada.

A placa foi incubada por 72 horas a 30°. A absorbância é lida a 575 nm (cor) e 620 nm (turbidez). O etanol e o 17 $\beta$ -estradiol são usados como controle negativo e positivo, respectivamente, em cada ensaio. O resultado do

ensaio é expresso em EQ-E2 (equivalente estradiol), o qual é calculado pela interpolação com a curva do 17 $\beta$ -estradiol.

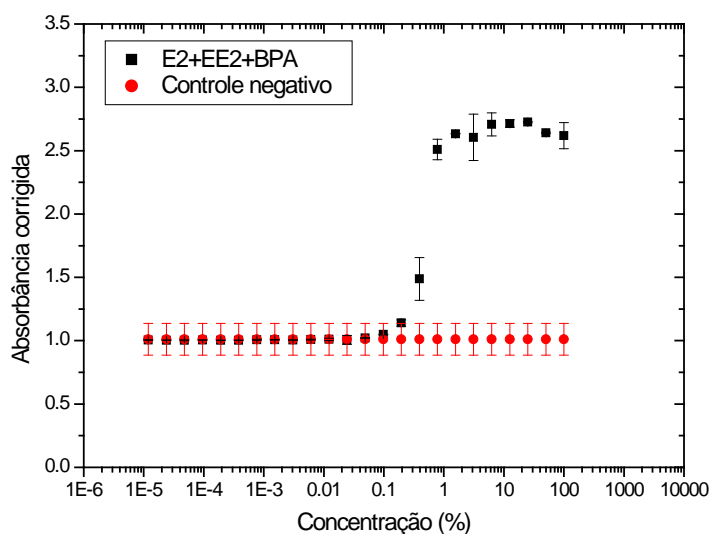
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os micropoluentes são compostos presentes em baixas concentrações nas matrizes ambientais e são capazes de provocar danos a diversos seres vivos, desse modo o desenvolvimento de processos de tratamento que removam esses compostos se torna essencial.

Para a análise da eficiência do tratamento empregado, utilizou-se os testes de toxicidade com o organismo *Daphnia similis* e o ensaio YES para a análise da redução da atividade estrogênica.

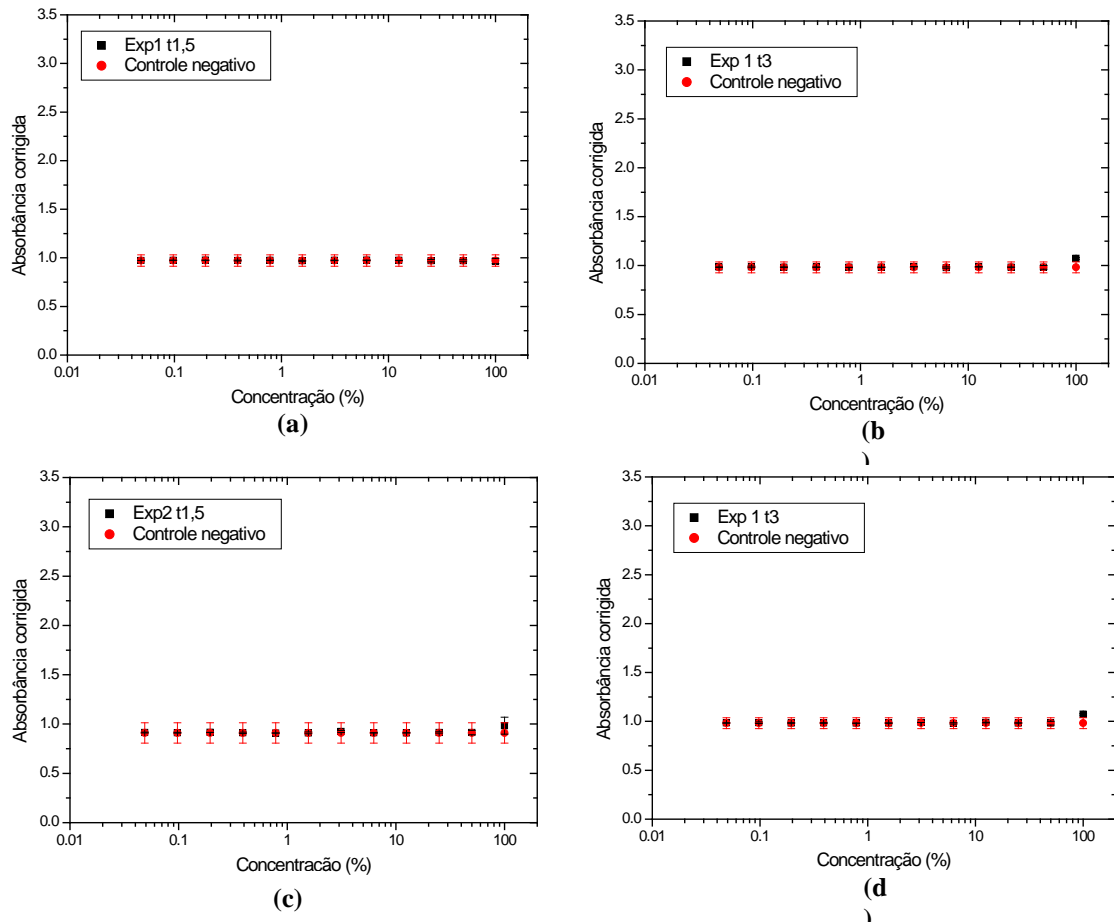
A solução sintética com 100  $\mu$ g/L de BPA, E2 e EE2 não apresentou toxicidade aguda para o organismo-teste *Daphnia similis*. As amostras após o tratamento com o Cl/UV também não apresentaram toxicidade aguda. Porém, a ausência de toxicidade aguda não elimina a caracterização da amostra como tóxica, sendo necessária uma avaliação de toxicidade crônica.

No ensaio YES foi possível avaliar a eficiência do tratamento pela a redução da atividade estrogênica desses compostos. A Figura 2 apresenta a curva dose-resposta da mistura de bisfenol A (BPA), 17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) no ensaio YES.



**Figura 2: Curvas dose-respostas da mistura dos 3 compostos (BPA, E2, e EE2) no ensaio**

As curvas dose-respostas das amostras após o processo de tratamento com o Cl/UV nas concentrações de 100mM e 500 nM de Hipoclorito de Sódio em diferentes tempos de reação (90 e 180 min) são apresentadas na Figura 3. Observou-se a redução da atividade estrogênica, demonstrando a eficiência do tratamento para a remoção desses compostos nos dois tempos de reação. Além disso, os subprodutos formados não apresentaram atividade estrogênica.



**Figura 3: Curvas dose-respostas das amostras após o processo de tratamento com o CL/UV nas concentrações de 100mM e 500 nM de Hipoclorito de Sódio em diferentes tempos de reação. (a) 100mM de Hipoclorito de Sódio e 90 min; (b) 100mM de Hipoclorito de Sódio e 180 min; (c) 500mM de Hipoclorito de Sódio e 90 min; (d) 500mM de Hipoclorito de Sódio e 180 min**

## CONCLUSÕES

A ausência de toxicidade aguda para a espécie *Daphnia similis* não garante que a amostra não é tóxica, seria necessário a confirmação com ensaios de toxicidade crônica para esse organismo. Além da avaliação de organismos em outros níveis tróficos;

A solução sintética 100 µg/L de bisfenol A, 17β-estradiol e 17α- etinilestradiol sem tratamento apresentou atividade estrogênica;

O processo de tratamentos CL/UV utilizando 100mM, assim como 500mM de hipoclorito de sódio demonstraram remoção da atividade estrogênica dos desreguladores endócrinos estudados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. Química Nova, v. 30, p.651-66, 2007
2. BILA, D. M. Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17β-estradiol pelo Processo de Ozonização. Tese de Doutorado em Ciências em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2005.

3. KLANING, UK., SEHESTED, K., WOLFF, T., 1984. Ozone formation in laser flash photolysis of oxoacids and oxoanions of chlorine and bromine. *J. Chem. Soc. Farad. T. 1* (80), 2969 e 2979, 11.
4. PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography–mass spectrometry in the analysis of emerging environmental contaminants. *Anal Bioanal Chem*, v. 385, p. 422– 424, 2006
5. ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P. Estrogenic Activity of Surfactants and Some of their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 3, p. 241-248, 1996.
6. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US. EPA). Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis, Report n. EPA/630/R-96/012, Washington, D.C. 1997.