

I-137 - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS ÁGUAS SUPERFICIAIS DO RIO DE JANEIRO QUANTO A PRESENÇA DE MICROPOLUENTES, ATIVIDADE ESTROGÊNICA E TOXICIDADE

Giselle Gomes Moreira da Silva

Bióloga e Mestranda em Engenharia Ambiental pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Daniele Maia Bila⁽¹⁾

Engenheira Química pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Mestre, Doutora em Engenharia Química pela COPPE/UFRJ. Prof. Adjunto no Depto. de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente da FEN/UERJ

Hélio Guedes de Brito Neto

Engenheiro Químico pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Mestre em Engenharia Química pela UFRJ.

Endereço⁽¹⁾: Rua São Francisco Xavier, 524 - Maracanã - Rio de Janeiro - RJ - CEP: 20550-900 - Brasil – Tel.: (21) 23340512 - e-mail: gisellegomesms@gmail.com

RESUMO

Uma série de compostos químicos tem sido classificada como desreguladores endócrinos (Des), tais como pesticidas, produtos químicos empregados e produzidos por indústrias e estrogênios naturais e sintéticos. A presença destes compostos em matrizes ambientais tem gerado cada vez mais preocupação na comunidade científica, em virtude dos seus potenciais efeitos adversos à saúde de várias espécies, uma vez que estas substâncias interferem na produção, liberação, metabolismo e eliminação de hormônios, podendo ainda simular a ação destes. Para a determinação da presença de desreguladores endócrinos podem ser utilizadas diferentes metodologias. Um dos principais ensaios *in vitro* utilizados para determinação da atividade estrogênica é o ensaio YES (Yeast Estrogen Screen), um método que utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada. Neste trabalho foi analisada a presença de atividade estrogênica, pelo ensaio *in vitro* YES, em água bruta e potável no Rio Guandu, localizado no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Ensaios de toxicidade aguda, parâmetros físico-químicos e a quantificação do composto 17 α -etinilestradiol também foram determinados nessas matrizes. Com base nos resultados, observou-se a presença de atividade estrogênica tanto na água bruta como potável provenientes do Rio Guandu, além disso, não observou-se toxicidade aguda. A maior concentração de 17 α -etinilestradiol foi encontrada em água bruta atingindo o valor de 207 ng.L⁻¹, já a menor foi encontrada em água potável no valor de 56 ng.L⁻¹, o que indica um elevado nível de contaminação por esse composto, uma vez que estudos na literatura reportam que a concentração de 0,1 ng.L⁻¹ já ocasiona danos à biota. Esse estudo demonstrou que o ensaio *in vitro* YES é uma importante ferramenta na análise de DEs em matrizes ambientais, sendo um importante aliado como forma de selecionar quais das amostras estudadas deverão ser submetidas a análises químicas posteriores para uma caracterização mais completa dos compostos presentes nelas. Além disso, esse estudo sugere a necessidade de uma avaliação criteriosa dos limites de concentrações para o lançamento de DEs em corpos receptores, uma vez que elevados níveis de atividade estrogênica tem sido detectado em matrizes ambientais e esses compostos estrogênicos são responsáveis por sérios danos ocasionados à biota.

PALAVRAS-CHAVE: Desreguladores endócrinos, ensaio *in vitro* YES, toxicidade aguda, águas superficiais.

INTRODUÇÃO

Ainda que a contaminação química da água não seja um problema novo, desde alguns anos tem se detectado a presença de certos compostos químicos ou contaminantes não regulamentados, de origem antrópica ou natural, os quais têm se dispersado no meio ambiente e estão presentes em águas superficiais e subterrâneas, inclusive em água potável, e podem constituir um risco à saúde dos seres vivos. Esses compostos denominados como “contaminantes emergentes” se apresentam em baixas concentrações, na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} e muitos deles não estão regulamentados na maioria dos países (KUSTER et al., 2008).

Dentro deste variado grupo de compostos, se encontram os desreguladores endócrinos (DEs), ou em inglês endocrine disrupters chemicals (EDC), onde se incluem pesticidas, produtos químicos industriais, farmacêuticos, cosméticos e fitoquímicos. Os DEs são definidos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency*, USEPA) como “*um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento*” (USEPA, 1997). Já o Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) em conjunto com o Japão, os EUA, o Canadá, a OECD e a União Européia, definiram da seguinte maneira: “*Um desregulador endócrino é uma substância ou um composto exógeno que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e tem, consequentemente, efeitos adversos sobre a saúde num organismo intacto, sua descendência, ou (sub) populações*” (COM (1999)706).

Devido à grande dificuldade na identificação desses micropoluentes, métodos analíticos estão sendo desenvolvidos para identificar e quantificar essas substâncias em matrizes ambientais. Além disso, a necessidade de se conhecer o efeito tóxico dos desreguladores endócrinos conduz ao desenvolvimento de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Os ensaios *in vitro* e *in vivo* em conjunto com análises químicas têm sido utilizados como métodos complementares para analisar amostras ambientais. Os ensaios *in vitro* e *in vivo* permitem a determinação da atividade biológica de substâncias, já as análises químicas são importantes para identificar e quantificar as substâncias químicas. A utilização desses métodos em conjunto permite confirmar a atividade biológica e identificar os compostos responsáveis.

Este estudo pretende avaliar o ensaio *in vitro* YES para a determinação de atividade estrogênica de amostras ambientais, para subsidiar as discussões sobre a segurança e confiabilidade do uso de ensaios biológicos para a determinação dos efeitos potenciais causados por micropoluentes no ambiente. Além de monitorar a presença e as concentrações dos micropoluentes em águas superficiais do Rio de Janeiro.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade das águas superficiais do Rio Guandu, Rio de Janeiro quanto à presença de micropoluentes, atividade estrogênica e toxicidade.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade estrogênica pelo ensaio *in vitro* YES em águas superficiais;
- Avaliar a ocorrência de desreguladores endócrinos em águas superficiais;
- Determinar a toxicidade aguda utilizando o organismo-teste *Danio rerio*;
- Determinar os parâmetros físico-químicos em águas superficiais.

METODOLOGIA UTILIZADA

As coletas foram realizadas no Rio Gandu, no município de Nova Iguaçu, próximo a Estação de Tratamento de Água (ETA) que abastece a área metropolitana do Rio de Janeiro. As coletas das amostras de água bruta e de água potável (coletada após a ETA) foram realizadas duas vezes por mês, no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015. Após as coletas, as amostras foram preservadas em isopor com gelo para posteriormente serem acondicionadas à temperatura abaixo de 4 °C, até a realização dos ensaios em laboratório.

A fim de facilitar, as amostras foram identificadas de acordo com a data da coleta e a natureza da água (bruta ou potável) os códigos estão apresentados na Tabela 1:

Tabela 1: Identificação das amostras de água bruta e água potável

Código utilizado para água bruta	Código utilizado para água potável	Data da coleta
1A	1B	10/09/2014
2A	2B	24/09/2014
3A	3B	09/10/2014
4A	4B	31/10/2014
5A	5B	14/11/2014
6A	6B	27/11/2014
7A	7B	15/12/2014
8A	8B	30/12/2014
9A	9B	15/01/2015
10A	10B	26/01/2015

A metodologia analítica empregada no preparo das amostras para os ensaios biológicos foi a extração em fase sólida (EFS), segundo metodologia descrita em Bila (2005). Na EFS foram utilizados cartuchos de extração em fase C₁₈ de 500mg e 6 mL (STRACTA X). Antes de receber a amostra, os cartuchos foram condicionados pela lavagem com 3 X 2 mL de hexano, seguido por 1 X 2 mL de acetona e 3 X 2 mL de metanol, por último 5 X 2 mL de água (pH 3). Em seguida, 1 litro de amostra com pH 2 previamente ajustado passou pelo cartucho. Subsequentemente, os analitos foram eluídos com 4 X 1 mL de acetona. A acetona foi totalmente evaporada por uma corrente de nitrogênio e as amostras reconstituídas com 2 mL de etanol. Os extratos foram estocados a 4°C até serem usados no ensaio YES. Para análise em HPL/FLU foi realizado o mesmo procedimento com diferença na reconstituição, pois foram reconstituídas com 500 µL de acetonitrila.

A atividade estrogênica das amostras foi determinada pelo ensaio *in vitro* YES, realizado segundo metodologia desenvolvida por Routledge & Sumpter (1996) com algumas adaptações, e os resultados foram expressos em equivalente estradiol (EQ-E₂).

As condições cromatográficas foram estabelecidas de acordo com metodologia desenvolvida no estudo de Cordeiro (2009) onde os parâmetros cromatográficos para realização dos testes para o hormônio 17α-etinilestradiol tiveram alguns ajustes visando melhoria de desempenho frente à matriz analítica utilizada. Foi utilizado o cromatógrafo líquido modelo Breeze 2 fabricado pela Waters Corporation®. As condições de realização das análises foram de fluxo de 1 mL.min⁻¹ de fase móvel, sendo 0,6 mL.min⁻¹ de acetonitrila (grau HPLC) e 0,4 mL.min⁻¹ de água ultrapura. O volume injetado foi de 50 µL de amostra em um loop de 100 µL para detecção por fluorescência nos comprimentos de onda de 230 e 280 nm de excitação e 306nm de emissão. A coluna cromatográfica foi a Novapak PAH nas dimensões de 4,6x250mm e com partícula de 5 micras mantida sob uma temperatura de 26°C com auxílio do forno de colunas. A temperatura do amostrador automático foi fixada a 18°C. O tempo da análise cromatográfica fixado para as amostras foi de 30 minutos em função de outros compostos presentes na matriz e para os padrões foi de 15 minutos.

Todas as amostras foram caracterizadas com base nos seguintes parâmetros físico-químicos: pH (Método 4500 - H+ B), turbidez (Método 2130 B), DQO (Método 5220 D), nitrogênio amoniacal (Método 4500-NH3 D), fósforo (Método 4500 - P E) e COD - carbono orgânico dissolvido (Método 5310 B), seguindo metodologias descritas em APHA (2012).

Foram realizados ensaios de toxicidade aguda com o organismo-teste *Danio rerio*, segundo metodologias descritas nas normas da ABNT (NBR 15088 (ABNT, 2004).

RESULTADOS

Para cada ensaio YES realizado, uma curva dose-resposta do controle positivo 17β-estradiol foi determinada, produzida na faixa de 2724 ng.L⁻¹ a 1,330 ng.L⁻¹. O limite de detecção do método foi de 1,108 ± 0,027 ng.L⁻¹, a máxima indução da β-galactosidase foi de 3,723 ± 0,025 ng.L⁻¹. A curva dose-resposta padrão do controle positivo 17β-estradiol no ensaio YES é apresenta na Figura 1.

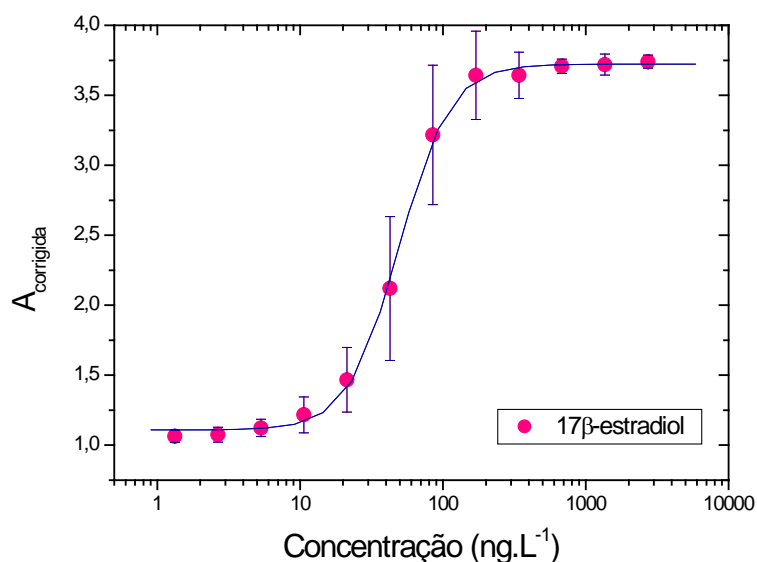


Figura 1: Curva dose-resposta padrão do controle positivo 17β-estradiol no ensaio YES. Curva de calibração do estrogênio foi produzida pela análise de 17β-estradiol na faixa de 2724 ng.L⁻¹ a 1,330 ng.L⁻¹.

Foi realizado o ensaio YES para o composto 17α-etinilestradiol a fim de detectar o seu potencial estrogênico em relação ao composto 17β-estradiol. A substância 17α-etinilestradiol é um hormônio sintético criado para 17β-estradiol, sendo assim utilizou-se a mesma faixa de concentração (2724 ng.L⁻¹ a 1,330 ng.L⁻¹) para as duas substâncias. A curva dose-resposta do 17α-etinilestradiol está apresentada na Figura 2.

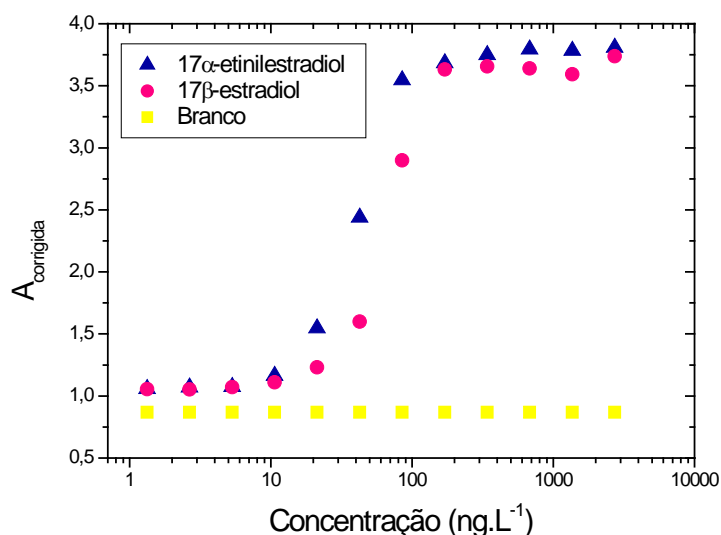


Figura 2: Curvas dose-resposta dos compostos 17α-etinilestradiol e 17β-estradiol, ambos na faixa de concentração de 2724 ng.L⁻¹ a 1,330 ng.L⁻¹.

O composto 17α-etinilestradiol foi desenvolvido a partir da adição de um radical etinil à molécula de 17β-estradiol, no carbono 17. Segundo Combalbert and Hernandez-Raquet (2010) e Iarc (2007) esta diferença faz com que o 17α-etinilestradiol possua maior potencial estrogênico e também resistência à degradação com relação ao composto original. No ensaio YES essa diferença foi observada, pois o 17α-etinilestradiol

apresentou EC_{50} de 40,8 $ng.L^{-1}$ enquanto que o 17 β -estradiol referente a esse ensaio apresentou EC_{50} de 64,99 $ng.L^{-1}$. E quanto menor o EC_{50} maior a estrogenicidade do composto.

Quanto às amostras da matriz ambiental estudada, encontrou-se atividade estrogênica tanto na água bruta como na água potável. De 10 amostras de água bruta coletada, 7 apresentaram estrogenicidade pelo ensaio YES e das 10 amostras de água potável em 5 foi apresentaram atividade estrogênica. A Figura 3 expressa o equivalente estradiol (EQ-E₂) das amostras coletadas.

É possível perceber que a amostra de água bruta coletada em 15/12/2014 (7A) foi a que apresentou maior valor de Eq-E₂, enquanto que as amostras 1A, 4A, 5A, 1B, 4B, 5B, 6B, 7B não apresentaram atividade estrogênica.

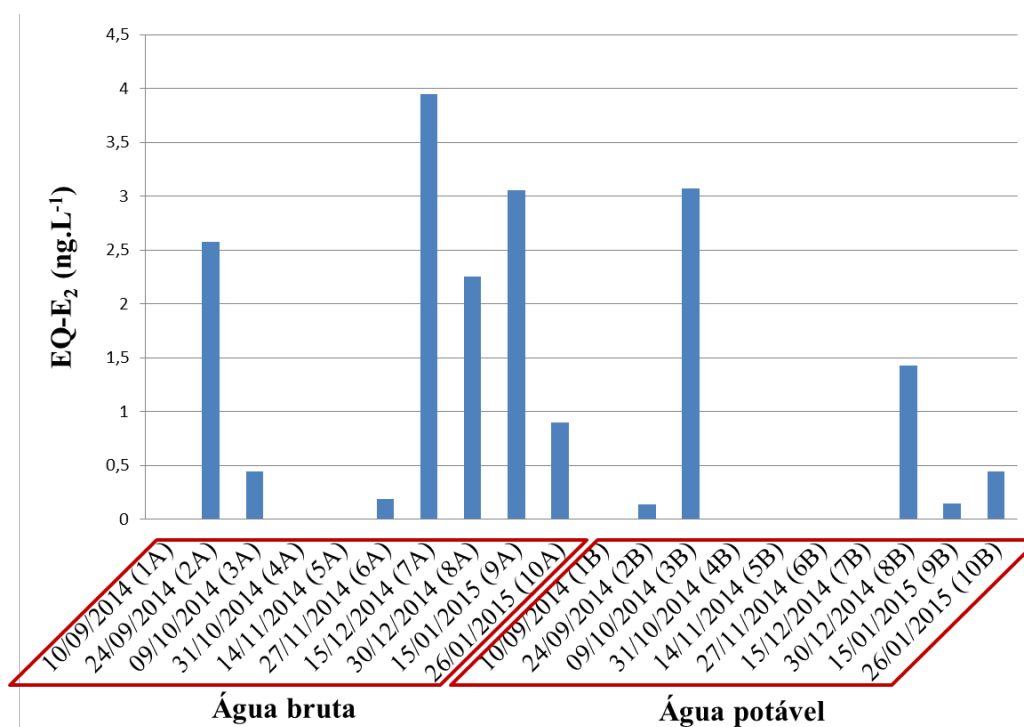


Figura 3: Valores de EQ-E₂ das amostras de água bruta e potável, coletadas no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015.

A Tabela 2 apresenta os valores de EC_{50} das amostras que apresentaram um paralelismo entre sua curva dose-resposta e a curva dose-resposta do 17 β -estradiol, permitindo assim o cálculo desses parâmetros.

Tabela 2: Valores de EC_{50} das amostras que apresentaram um paralelismo entre a sua curva dose-resposta e a do 17 β -estradiol.

Tipo de amostra	Data de coleta	EC_{50}
Água bruta	24/09/2014 (2A)	0,17206
	15/12/2014 (7A)	0,05362
	30/12/2014 (8A)	0,04547
	15/01/2015 (9A)	0,16402
	26/01/2015 (10A)	0,27688
Água potável	09/10/2014 (3B)	0,27284

A partir dos dados da Tabela 1 observa-se que a amostra de água bruta coletada em 30/12/2014 (8A) foi a que apresentou menor EC_{50} e, portanto, a maior atividade estrogênica.

O composto 17 α -etinilestradiol foi detectado e quantificado por HPLC/FLU. A Figura 4 apresenta as concentrações encontradas nas amostras de águas bruta e potável. Pelos dados apresentados observou-se elevados níveis de 17 α -etinilestradiol nas amostras de água nos dois pontos de coleta no Rio Guandu.

Analisando o ensaio YES juntamente com a análise química realizada nesse estudo no Rio Guandu, é possível verificar que um dos responsáveis pela atividade estrogênica encontrada é o composto 17 α -etinilestradiol detectado, porém devem existir outros compostos estrogênicos nessa matriz ambiental.

Na Figura 4 observa-se que a amostra de água bruta coletada em 09/10/2015 (3A) foi a que apresentou uma maior concentração de 17 α -etinilestradiol e a amostra de água potável coletada em 15/12/2014 (7B) foi a que apresentou a menor concentração. Já na amostra de água bruta coletada em 10/09/2014 (1A) não foi detectado o composto 17 α -etinilestradiol.

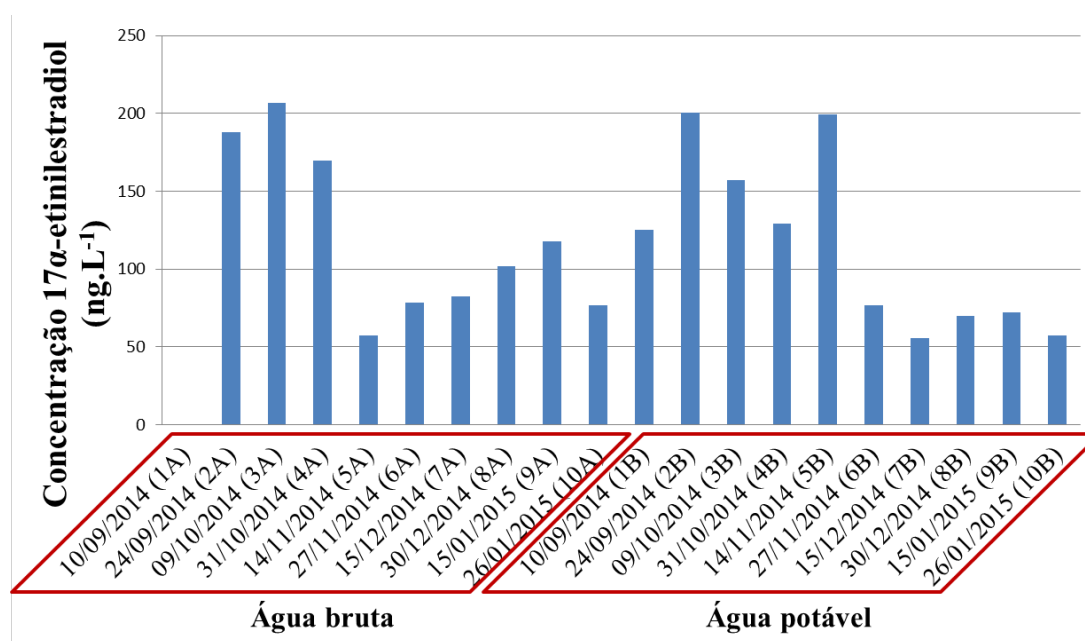


Figura 4: Concentrações de 17 α -etinilestradiol encontradas em amostras de água bruta e potável coletadas no Rio Guandu.

Todas as amostras foram submetidas a ensaios de toxicidade com o organismo *Danio rerio* (consumidor secundário) e não apresentaram danos consideráveis ao organismo de modo a permitir o cálculo do EC₅₀ (%).

Os parâmetros físico-químicos das amostras também foram determinados, a fim de avaliar a qualidade da água nos pontos de amostragem, os resultados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros físico-químicos das águas bruta e potável coletadas no Rio Guandu no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015 (Continua).

Tipo de amostra	Data e código das amostras	pH	Turbidez (NTU)	DQO baixa (mg.L ⁻¹)	Nitrogênio amoniacal (mg.L ⁻¹)	Fósforo (mg.L ⁻¹)	COD (mg.L ⁻¹)
Água bruta	24/09/2014 (2A)	7,47	6,3	1	0,48	**	2,18
	09/10/2014 (3A)	7,85	2,6	2	0,41	**	1,80
	31/10/2014 (4A)	8,03	1,4	*	4,45	0,2	1,59
	14/11/2014 (5A)	8,1	0,45	3	2,15	**	2,90
	27/11/2014 (6A)	9,73	1,24	*	2,16	0,9	2,59
	15/12/2014 (7A)	13,16	1,78	*	2,09	1,6	2,17

Tabela 3: Parâmetros físico-químicos das águas bruta e potável coletadas no Rio Guandu no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015 (Continuação).

Tipo de amostra	Data e código das amostras	pH	Turbidez (NTU)	DQO baixa (mg.L ⁻¹)	Nitrogênio amoniacal (mg.L ⁻¹)	Fósforo (mg.L ⁻¹)	COD (mg.L ⁻¹)
Água bruta	30/12/2014 (8A)	7,66	1,78	*	1,1	0,2	3,18
	15/01/2015 (9A)	7,47	2,1	*	1,35	0,3	4,90
	26/01/2015(10A)	7,78	1,8	*	1,59	0,2	2,65
Água potável	10/09/2014 (1B)	7,61	0,91	*	0,20	0,2	0,75
	24/09/2014 (2B)	8,22	1,5	*	0,20	**	0,62
	09/10/2014 (3B)	8,02	0,7	*	**	**	1,18
	31/10/2014 (4B)	8,71	0,6	1	2,36	0,3	1,11
	14/11/2014 (5B)	12,38	3,1	*	0,42	1,8	1,21
	27/11/2014 (6B)	9,39	1,3	*	2,27	0,2	0,97
	15/12/2014 (7B)	10,52	1,36	*	1,58	0,6	1,45
	30/12/2014 (8B)	9,6	0,1	*	0,71	0,4	0,90
	15/01/2015 (9B)	6,86	1,8	*	1,59	0,2	2,64
	26/01/2015(10B)	6,94	0,83	*	2,44	0,8	1,60

* Abaixo da faixa de medição;

**Não analisado

Segundo as normas ambientais brasileiras vigentes, a resolução de Conselho Nacional de Meio Ambiente, CONAMA nº 357/2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, no Capítulo V, Art. 38 informa que “o enquadramento dos corpos de água dar-se-á de acordo com as normas e procedimentos definidos pelo Conselho Nacional de Recursos Hídricos – CNRH e Conselhos Estaduais de Recursos Hídricos”, já o Art. 42 informa que “enquanto não aprovados os respectivos enquadramentos, as águas doces serão consideradas classe 2, as salinas e salobras classe 1, exceto se as condições de qualidade atuais forem melhores, o que determinará a aplicação de classe mais rigorosa correspondente.”

Ainda de acordo com a Resolução CONAMA 357/2005 (Brasil, 2005) e os dados da tabela 3, Foram encontrados teor de fósforo total e a amônia acima do estabelecido em amostras de águas brutas examinadas (limite máximo permitido para fósforo 0,1 mg/L e limite máximo permitido para amônia: 3,7mg/L N, para pH ≤ 7,5; 2,0 mg/L N, para 7,5 < pH ≤ 8,0; 1,0 mg/L N, para 8,0 < pH ≤ 8,5; 0,5 mg/L N, para pH > 8,5).

Já nas águas potáveis estudadas, de acordo com a Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, o teor de amônia também foi encontrado acima do limite estabelecido (< 1,5mg/L).

CONCLUSÕES

O ensaio YES mostrou-se uma importante ferramenta na análise de DEs em matrizes ambientais, sendo um importante aliado como forma de selecionar quais das amostras estudadas serão submetidas a análises químicas posteriores para uma caracterização mais completa dos compostos presentes. Isto pode levar a redução dos custos com análises laboratoriais, uma vez que análises químicas são mais dispendiosas que o ensaio *in vitro* YES.

O rio Guandu, importante fonte de abastecimento de água potável para a população do Rio de Janeiro, não apresentou toxicidade aguda, porém mostrou há a presença de DEs, entre eles o 17 α -etinilestradiol, o qual é comprovadamente responsável por danos à biota.

O fato das amostras não ter apresentado toxicidade aguda comprova que uma amostra mesmo não sendo tóxica, pode apresentar atividade estrogênica e em longo prazo ocasionar efeitos negativos aos seres vivos, já que mesmo em baixas concentrações os contaminantes estrogênicos podem causar graves danos. Além disso, a ausência de toxicidade aguda não elimina a caracterização da amostra como tóxica, sendo necessária uma avaliação de toxicidade crônica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA; AWWA; WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22nd ed. Washington, DC: WEF: 1360 pp. 2012.
2. BILA, D. M. **Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 β -Estradiol pelo Processo de Ozonização**. Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, 281 p., 2005.
3. BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria n.º 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.
4. BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, 18 de março de 2005, p. 58-63.
5. COM, 1999 (706) final de 17/12/1999 “Estratégia comunitária em matéria de desreguladores endócrinos – substâncias suspeitas de interferir com os sistemas hormonais dos seres humanos e dos animais” *Comissão Das Comunidades Europeias*.
6. COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1671–1692, 2010.
7. CORDEIRO, D. **Uso de bioindicador de efeito endócrino e validação do método para determinação de hormônios na água da Represa Municipal de São José do Rio Preto, SP**. Tese – Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Paulo, 90 p., 2009.
8. IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Combined estrogen–progestogen contraceptives and combined estrogen–progestogen menopausal therapy**. Volume 91. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. World Health Organization. Lyon, France, 2007.
9. KUSTER, M.; ALDA, M. J. L.; HERNANDO, M. D.; PETROVIC, M.; ALONSO, J. M.; BARCELÓ, D. **Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain)**. *Journal of Hydrology*, v. 358, p. 112– 123, 2008.
10. 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**, 15 (3), 241-248, 1996.
11. USEPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis, report Nº EPA/630/R-96/012**, Washington D. C., 1997.