

IV-112 - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ÁGUAS NATURAIS PARA ABASTECIMENTO DO RIO DE JANEIRO QUANTO À PRESENÇA DE BISFENOL A E SEUS EFEITOS

Mariana Tavares de Luna⁽¹⁾

Bióloga pela Universidade Santa Úrsula. Mestre em Engenharia Ambiental pela Faculdade de Engenharia da UERJ (FEN/UERJ).

Daniele Maia Bila

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

Alexsandro Araújo da Silva

Químico e Mestre em Agroquímica, ambos pela Universidade Federal de Viçosa (MG). Doutor em Ciências pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Prof. Adjunto no Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Endereço⁽¹⁾: Rua São Francisco Xavier, 524 sala 5029 bloco F- Rio de Janeiro - RJ - CEP: 20550-900 - Brasil
- Tel: (21) 2334-0311 ramal 17 e-mail: mariana.luna.usu@hotmail.com

RESUMO

Desreguladores endócrinos (DE) são compostos naturais ou sintéticos que tem a capacidade de desregular funções endócrinas, imitando ou bloqueando a função normal de hormônios endógenos. O Bisfenol A (BPA) é um conhecido desregulador endócrino que apresenta atividade estrogênica comprovada, ou seja, capacidade de se ligar aos receptores de estrogênio celulares, desencadeando efeitos estrogênicos (Vinas & Jeng, 2012). O ensaio YES, (Yeast Estrogen Screen), desenvolvido por Routledge & Sumpter (1996), permite a identificação de substâncias químicas que são capazes de mimetizar a atividade do hormônio estrogênio e dessa forma causar desregulação endócrina. Neste estudo foram detectadas as concentrações de BPA nas águas superficiais do rio Guandu e foi avaliada a atividade estrogênica nesta mesma matriz, que se constitui no rio de maior importância para o abastecimento da maior parte da região metropolitana do Rio de Janeiro. As coletas ocorreram no período de março a dezembro de 2015. A identificação e quantificação das concentrações do BPA foram realizadas pela técnica de cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas no modo monitoramento seletivo de íons (CGAR-EM-MSI) e a atividade estrogênica das amostras de águas superficiais e do padrão BPA foi determinada pelo ensaio *in vitro* YES. O composto BPA foi detectado nas águas brutas do rio Guandu na faixa de 90,29 a 1766,9 ng.L⁻¹ no ponto 1, próximo a captação de água pela ETA Guandu, e 219,55 a 758,05 9 ng.L⁻¹ no ponto 2, mais distante do ponto de captação.

As amostras de águas superficiais do rio Guandu apresentaram atividade estrogênica avaliada pelo ensaio *in vitro* YES para água bruta nos dois pontos amostrados, com valores de EQ-E2 0,06 a 0,39 9 ng.L⁻¹ no ponto 1, e de 0,05 a 1,59 9 ng.L⁻¹ no ponto 2, evidenciando a presença de xenoestrogênicos nas águas deste rio.

PALAVRAS-CHAVE: Bisfenol A, atividade estrogênica, ensaio *in vitro* YES, Rio de Janeiro.

INTRODUÇÃO

Desreguladores endócrinos (DE) são compostos naturais ou sintéticos que tem a capacidade de desregular funções endócrinas, imitando ou bloqueando a função normal de hormônios endógenos (Schug et al., 2011).

O Bisfenol A (BPA), objeto de estudo do presente trabalho, é um conhecido desregulador endócrino utilizado na produção de plásticos e resinas e sua presença no ambiente natural é proveniente da lixiviação ou degradação de plásticos (Mercea, 2009). Ele pode ser encontrado em diversas matrizes ambientais, como águas superficiais, esgoto sanitário, ar atmosférico e até mesmo em fluidos biológicos (Zafra-Gomes, 2008).

Este micropoluentes apresenta atividade estrogênica comprovada, ou seja, tem a capacidade de se ligar aos receptores de estrogênio celulares, desencadeando efeitos estrogênicos (Vinas & Jeng, 2012). O ensaio YES, (Yeast Estrogen Screen), desenvolvido por Routledge & Sumpter (1996), permite avaliar a atividade estrogênica de xenoestrogênicos que são capazes de mimetizar a atividade do hormônio estrogênio e causar desregulação endócrina.

Esses efeitos são discutidos na literatura, que reforça a afirmação de que a exposição ambiental ao BPA pode ser nociva para a saúde humana. Segundo uma revisão apresentada por Rochester (2013), a exposição ao BPA causa problemas de saúde no período perinatal, na infância e na idade adulta, incluindo efeitos no desenvolvimento e no processo reprodutivo, no metabolismo, dentre outros.

Ainda que não esteja tão clara a associação entre a exposição ambiental ao BPA e os efeitos a ele previamente relacionados, existe um aumento no número de estudos investigando essa associação e diversos outros aspectos, como o monitoramento ambiental deste poluente em matrizes ambientais. Nesse contexto, o presente trabalho é uma contribuição para o aumento de informações acerca do BPA nas águas superficiais do rio Guandu e das informações sobre atividade estrogênica nesta mesma matriz, que se constitui no rio de maior importância para o abastecimento da maior parte da região metropolitana do Rio de Janeiro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coletas

Foram realizadas seis coletas de águas superficiais do rio Guandu entre os meses de março a dezembro de 2015. Em cada coleta foram amostrados dois pontos, sendo que para cada ponto foi coletada triplicata para as análises por cromatografia e duplicata para análises pelo ensaio YES, totalizando 10 amostras por coleta e 60 amostras no total. Os pontos de coleta foram escolhidos com base no monitoramento realizado pelo INEA e as águas são consideradas, segundo este órgão, como sendo apropriadas para tratamento convencional visando o abastecimento público.

Filtração e Extração em Fase Sólida (EFS)

A metodologia de filtração e de EFS foi realizada de acordo com Lopes (2007). As amostras foram filtradas em sistema de filtração a vácuo para remoção de sólidos em suspensão, primeiramente em membranas de fibra de vidro de 1,2 μm e depois em acetato de celulose de 0,45 μm . A técnica de extração em fase sólida (EFS), que extrai e concentra DE de amostras aquosas, foi realizada com cartuchos Strata X (Phenomenex) de 500 mg / 6 mL de fase reversa e sorvente de base polimérica. A EFS iniciou-se pelo condicionamento dos cartuchos percolando-se uma sequência de solventes, iniciada por 6 mL de n-hexano, seguida por 2 mL de acetona, 6 mL de etanol e por último 10 mL de água Mill-Q em pH 3 ajustado com solução de HCl 3M. Os solventes foram percolados com o auxílio da bomba à vácuo ao fluxo de aproximadamente 3 mL min⁻¹, mantendo sempre o gotejamento e tendo o cuidado de não deixar a fase sólida do cartucho secar entre um solvente e outro. Após esta etapa, a amostra foi percolada, permitindo que os analitos de interesse ficassem retidos nos cartuchos. Na etapa seguinte de eluição, os analitos de interesse retidos nos cartuchos foram eluídos em acetona e então o eluato (acetona e analitos) foi submetido a secagem sob fluxo de nitrogênio e os analitos foram redissolvidos em diclorometano para as análises cromatográficas e em etanol para o ensaio YES. Todos os solventes utilizados na metodologia são grau HPLC, Tedia®.

Cromatografia EFS - CGAR- EM - MSI

A identificação e quantificação das concentrações do BPA foram realizadas pela técnica de cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas no modo monitoramento seletivo de íons (CGAR-EM-MSI); Para isto, foi utilizado um cromatógrafo gasoso (GC-456, Bruker Daltonics Inc.) acoplado a um espectrômetro de massas (Scion TQ-MS, Bruker Daltonics Inc.). Inicialmente o padrão BPA foi injetado para obtenção do tempo de retenção e para avaliação da sensibilidade do detector. Os parâmetros cromatográficos (fluxo do gás de arraste, programação do forno, temperaturas do injetor, interface, e voltagem do detector) foram testados e ajustados de forma a se chegar nas melhores condições. A seleção dos íons monitorados foi realizada com base na literatura e nos próprios espectros de massas (Tabela 1).

Tabela 1: Condições cromatográficas utilizadas na técnica no sistema CGAR-EM.

Coluna	BR-5MS (30m x 0.25mm x 0,25µm) de fase 95% polisiloxano e 5% fenil
Modo de Injeção	Splitless
Temperatura do Injetor	280 °C
Gás de arraste	Hélio
Fluxo	1,2 ml/min
Volume injetado	2,0 µL
Temperatura do forno	→ 100°C (0.60 min) / 200 °C à 15 °C / min → 275 °C à 3 °C / min (durante 5 min) → 300 °C à 15 °C / min (durante 10 min)
Temperatura da fonte de ionização	230 °C , 70 eV
Temperatura da linha de transferência	250 °C
Íons monitorados (m/z)	BPA (213,228 Da)
Tempo de retenção	13,5 min
Tempo de análise	52,93 min

Ensaio *in vitro* YES

A atividade estrogênica das amostras de águas superficiais e do padrão BPA foi determinada pelo ensaio *in vitro* YES, o qual é realizado com uma cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente através da integração de uma sequência de DNA do receptor de estrogênio humano (REh) no cromossomo principal da levedura. Quando existem substâncias estrogênicas presentes na amostra, estas se ligam aos receptores presente no genoma da levedura e exibem uma resposta colorimétrica que é detectada por espectrofotometria. (Routledge & Sumpter, 1996).

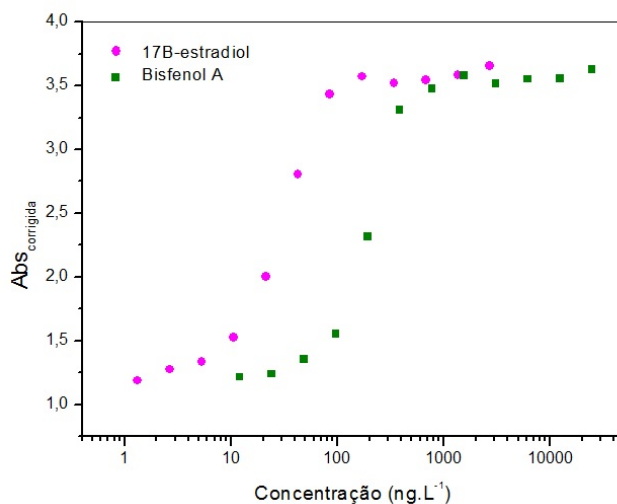
Os resultados obtidos são comparados com os do 17β-estradiol, que é o estrogênio humano primário e que representa o maior potencial estrogênico e o padrão pelo qual a atividade estrogênica é expressa, na forma de equivalentes de estradiol (EQ-E2). O ensaio permite determinar a atividade estrogênica total de uma amostra, não sendo possível distinguir quais compostos são responsáveis pela atividade estrogênica detectada (Routledge & Sumpter, 1996). No entanto, ao realizar o ensaio para detectar a atividade estrogênica de uma substância padrão, ou seja, que apresenta uma concentração conhecida, como o BPA, por exemplo, é possível avaliar a potência relativa do padrão em relação ao 17β-estradiol.

RESULTADOS

Atividade estrogênica do composto BPA pelo ensaio *in vitro* YES

Para a determinação da curva dose-resposta do composto BPA no ensaio YES (Figura 1), utilizou-se a faixa de concentração de 24750 µg.L⁻¹ a 12,08496 µg.L⁻¹. Foram realizados seis ensaios com o padrão BPA, com a média dos valores de CE₅₀ 248,9 ± 38,8 ng.L⁻¹.

Figura 1: Curva dose-resposta do composto BPA no ensaio YES na faixa de concentração de 24750 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a 12,08496 $\mu\text{g.L}^{-1}$.



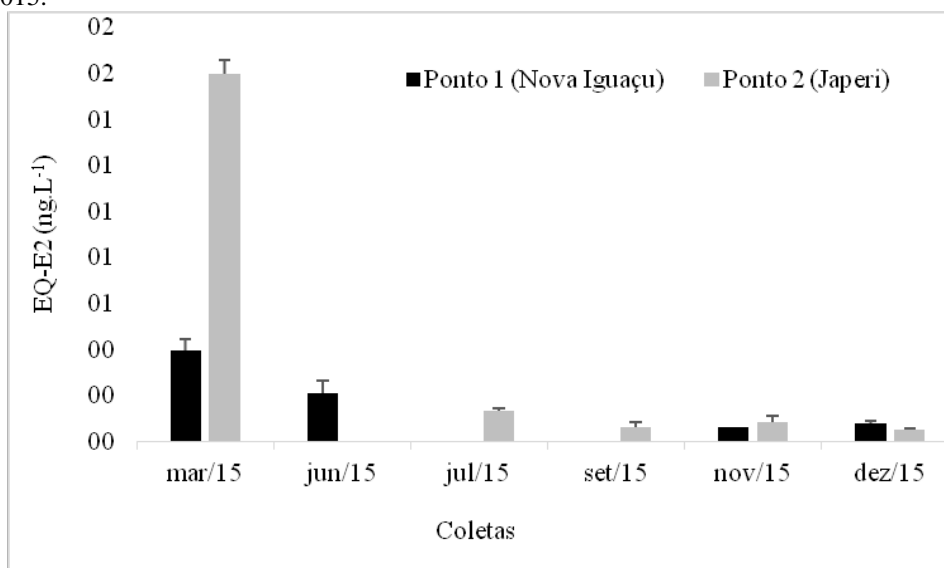
O potencial estrogênico de uma substância pode ser determinado pelo cálculo de sua potência relativa em relação ao 17 β -estradiol, que representa o maior potencial estrogênico e o padrão pelo qual a atividade estrogênica é medida. Assim, quanto mais próximo de 1 (valor máximo) for o valor da potência relativa, mais estrogênica será a substância. O valor da potência relativa encontrado para o BPA foi 0,14, evidenciando que o composto apresenta estrogenicidade, porém é menos estrogênico do que o estradiol, o que pode ser observado na Figura 1.

Em um estudo realizado por Chen et al., (2002), foi observado que o aumento na concentração de BPA proporcionou um aumento da atividade estrogênica, sendo obtidos resultados positivos para atividade estrogênica em concentrações mais elevadas do que 1 mg.L^{-1} . Comparando as curvas dose-resposta do E_2 e do BPA, os autores Chen et al., (2002) e Fic et al., (2014) verificaram que o BPA é cerca de 5 ordens de magnitude menos potente do que o E_2 .

Determinação da atividade estrogênica das amostras de água bruta e potável do rio Guandu.

As concentrações de EQ-E2 determinadas para água bruta variaram de 0,06 a 0,39 ng.L^{-1} no ponto 1, e de 0,05 a 1,59 ng.L^{-1} no ponto 2 (Figura 2). Dias et al., (2015), que também verificou atividade estrogênica de amostras de águas do rio Guandu, encontrou concentração máxima de 3,1 ng.L^{-1} , ou seja, valores maiores do que encontrados no presente trabalho, que foi de 1,59 ng.L^{-1} para o ponto 2. Segundo López-Roldán et al., (2010), a concentração de 1 ng.L^{-1} já é suficiente para causar efeitos estrogênicos em organismos aquáticos. No entanto, somente no ponto 2 referente a coleta de março de 2015 o valor da concentração de EQ E2 excedeu esta concentração.

Figura 2: Valores de EQ-E2 das amostras de água bruta coletadas no Rio Gandu no período de março a dezembro de 2015.

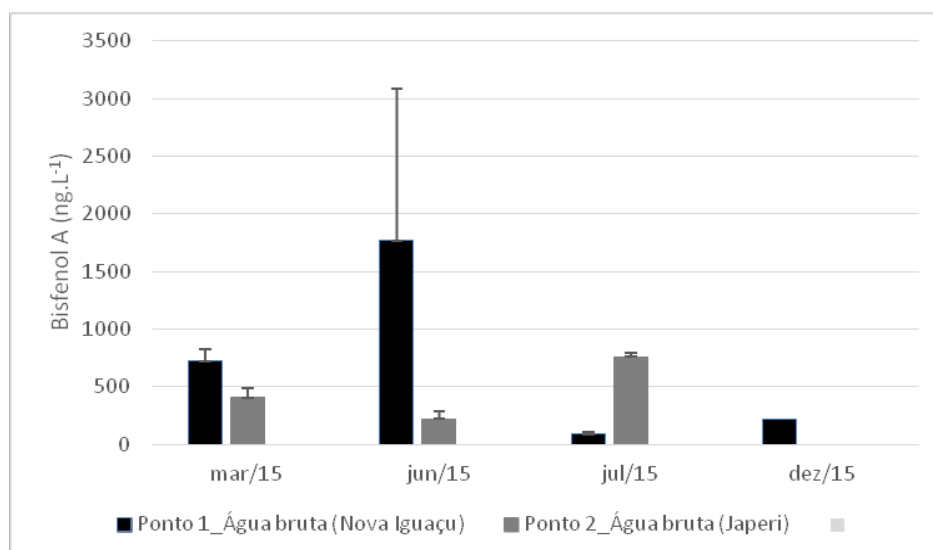


Em outros trabalhos nos quais também se avaliou atividade estrogênica de águas superficiais, os valores se assemelham aos encontrados no presente trabalho, como é o caso dos valores encontrados por Esteban et al., (2014) nas águas da região semiárida da Espanha, na faixa de 0.053 a 0,75 a ng.L⁻¹, por Murk et al., (2002), na faixa de 0 a 1,09 ng.L⁻¹ nos Países Baixos, também nas águas do mar Báltico (0,01 – 0,82 ng.L⁻¹) por Beck et al., (2006) e na faixa de 0.07 a 8.06 ng L⁻¹ por Yang et al., (2014) no sul da China.

Determinação do BPA em amostras de água bruta do rio Guandu por CGAR- EM – MSI.

Os resultados mostraram que das seis coletas realizadas, em três delas foram detectadas concentrações de BPA nos pontos 1 e 2, porém na coleta de dezembro somente no ponto 1 foram detectadas concentrações. As coletas de setembro e novembro o BPA não foi detectado em nenhum dos dois pontos de amostragem. A faixa das concentrações de água bruta variou de 90,29 a 1766,9 ng.L⁻¹ no ponto 1 e de 219,55 a 758,05 ng.L⁻¹ no ponto 2. O ponto 1, próximo a captação de água pela ETA Guandu, foi o que apresentou as maiores concentrações de BPA (Figura 3).

Figura 3: Concentrações do BPA detectadas nas amostras de água bruta e potável no período de março a dezembro de 2015.



As concentrações de BPA detectadas no presente trabalho foram menores que as encontradas anteriormente em águas superficiais em São Paulo, Brasil (Leandro, 2006). Em outros países, ainda em relação as águas superficiais, as concentrações encontradas na China por Zhang et al. (2011) foram muito superiores que as do presente trabalho. Zhao et al. (2009) também encontrou concentrações geralmente mais elevadas, na faixa acima de 1000 ng.L⁻¹, só ficando abaixo da concentração mais elevada do ponto 1, que foi de 1766,9 ng.L⁻¹. Em Portugal e na Espanha, Ribeiro et al. 2009 e Ballesteros-Gómez et al. (2007) detectaram concentrações semelhantes, enquanto que no Canadá, na Itália e na Suíça, Kleywegt et al. (2011), Loos et al. (2010) e Jonkers et al. (2009) encontraram concentrações bem menores que as do presente trabalho.

Ao analisar a ampla faixa de concentrações do BPA em águas superficiais reportadas na literatura em diversas regiões, percebe-se que não há um padrão de ocorrência para esse composto, o que nos leva a constatar a necessidade de estudos de monitoramento do BPA nas águas utilizadas para abastecimento público.

CONCLUSÕES

O composto BPA foi detectado nas águas brutas do rio Guandu na faixa de 90,29 a 1766,9 ng.L⁻¹ no ponto 1, próximo a captação de água pela ETA Guandu, e 219,55 a 758,05 no ponto 2, mais distante do ponto de captação.

As amostras de águas superficiais do rio Guandu apresentaram atividade estrogênica avaliada pelo ensaio *in vitro* YES para água bruta nos dois pontos amostrados, com valores de EQ-E2 0,06 a 0,39 ng.L⁻¹ no ponto 1, e de 0,05 a 1,59 ng.L⁻¹ no ponto 2, evidenciando que existe a presença de desreguladores endócrinos em concentrações detectáveis nas águas deste rio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALLESTEROS-GÓMEZ A, RUIZ FJ, RUBIO S, PÉREZ-BENDITO D. Determination of bisphenols A and F and their diglycidyl ethers in wastewater and river water by coacervative extraction and liquid chromatography-fluorimetry. *Anal Chim Acta* 2007;603: 51–9.
2. BECK, I.-C.; BRUHN, R.; GANDRASS, J. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. *Chemosphere*, v. 63, p. 1870-78, 2006.
3. CHEN, M.; IKE, M.; FUJITA, M. Acute Toxicity, Mutagenicity, and Estrogenicity of Bisphenol-A and Other Bisphenols. *Wiley Periodicals*, p. 80-86, 2002.
4. DIAS, A. C. V.; GOMES, F. W.; BILA, D. M.; SANT'ANNA, G. L.; DEZOTTI, D. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 120, p. 41–47, 2015.
5. ESTEBAN, S.; GORGAM, M.; PETROVIC, M.; GONZÁLEZ-ALONSO, S.; BARCELÓ, D.; VALCÁRCEL, Y. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. *Sci. Total Environ.* 466-467, 939-951, 2014.
6. FIC, A.; ZEGURA, B.; GRAMEC, D.; MASIC, L. P. Estrogenic and androgenic activities of TBBA and TBMEPH, metabolites of novel brominated flame retardants, and selected bisphenols, using the XenoScreen XL YES/YAS assay. *Chemosphere*, v. 112, p. 362–369, 2014.
7. JONKERS N., KOHLER H-P.E., DAMMSHAUSER A., GIGER W. (2009) Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions; *Environ. Pollut.*; 157; p 714.
8. KLEYWEGT S., PILEGGI V., YANG P., HAO C., ZHAO X., ROCKS C., THACH S., CHEUNG P., WHITEHEAD B. (2011) Pharmaceuticals, hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada - Occurrence and treatment efficiency; *Sci. Total Environ.*; 409; p 1481.
9. LEANDRO, Fernanda Zampieri. Bisfenol A: validação de método e ocorrência em água superficial e tratada da cidade de Araraquara. 2006. 94f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
10. LOOS R., LOCORO G., CONTINI S. (2010) Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS2 analysis; *Water Res.*; 44; p 2325.

11. LOPES, L. G. Estudo sobre ocorrência de estrógenos em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal - SP. 2005. 121f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
12. MERCEA, P. Physicochemical process involved in migration of Bisphenol A from polycarbonate. *Journal of Applied Polymer Science*, p. 579-593, 2009.
13. MURK, A. J.; LEGLER, J.; VAN LIPZIG, M. M.; MEERMAN, J. H.; BELFROID, A. C.; SPENKELINK, A.; VAN DER BURG, B.; RIJS, G. B.; VETHAAK, D. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environ Toxicol Chem*, v. 21, n. 1, p. 16-23, 2002.
14. RIBEIRO C., PARDAL M.A., MARTINHO F., MARGALHO R., TIRITAN M.E., ROCHA E., ROCHA M.J. (2009) Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary, Portugal; *Environ. Monit. Assess.*; 149, p 183.
15. ROCHESTER, J.R. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, v. 42, p. 132-155, 2013.
16. 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.
17. SCHUG, T., JANESICK, A., BLUMBERG, B., HEINDEL, J., 2011. Endocrinedisrupting chemicals and disease susceptibility. *J. SteroidBiochem. Mol. Biol.* 127, 204–211.
18. VINAS R, JENG YJ, WATSON CS. Non-genomic effects of xenoestrogen mixtures. *Int J Environ Res Public Health* 2012;9:2694–714.
19. YANG, J.; LI, H.; RAN, Y.; CHAN, K. Distribution and bioconcentration of endocrine disrupting chemicals in surface water and fish bile of the Pearl River Delta, South China. *Chemosphere*, v. 107, p. 439-446, 2014.
20. ZAFRA-GÓMEZ, A.; BALLESTEROS, O.; NAVALÓN, A.; VÍLCHEZ, J. L. Determination of some endocrine disrupter chemicals in urban wastewater samples using liquid chromatography-mass spectrometry. *Microchemical Journal*, v. 88, p. 87-94, 2008.
21. ZHANG YZ, SONG XF, KONDOH A, XIA J, TANG CY. Behavior, mass inventories and modeling evaluation of xenobiotic endocrine-disrupting chemicals along an urban receiving wastewater river in Henan Province, China. *Water Res.* 2011;45(1):292–302.
22. ZHAO JL, YING GG, WANG L, YANG JF, YANG XB, YANG LH, et al. Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography-negative chemical ionizationmass spectrometry. *Sci Total Environ* 2009;407:962–74.