

Avaliação do potencial toxicológico de hormônios sexuais sintéticos utilizando bioensaios

Luane Ferreira Garcia

Graduada em biotecnologia, pela Universidade Federal de Goiás. Mestranda em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.

Jhéssica Cavalcante de Souza Golveia

Farmacêutica, pela Universidade Federal de Goiás. Mestranda em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.

Mariângela Fontes Santiago

Nutricionista pela Universidade Federal de Viçosa. Mestre em Microbiologia Agrícola, pela Universidade Federal de Viçosa e Doutora em Química, pela Universidade Estadual de Campinas. Professora Associada III da Universidade Federal de Goiás, e bolsista de desenvolvimento tecnológico e extensão inovadora nível II.

E-mail: mariangelafs@gmail.com.

RESUMO

Diversos compostos orgânicos despejados diariamente em corpos d'água, como hormônios, embora não contemplados nas legislações ambientais brasileira, necessitam ser melhor investigados por terem a característica de interferentes endócrinos, causando prejuízos a saúde de diversos seres vivos. É necessário determinar ensaios biológicos de fácil aplicação e de baixo custo, para monitorar a presença desses compostos nas águas do Brasil e do mundo. Os hormônios sexuais sintéticos Etinilestradiol, Gestodeno, Acetato de Ciproterona e Levonorgestrel, são bastante utilizados pela indústria farmacêutica na produção de anticoncepcionais e repositores hormonais. O objetivo deste trabalho constituiu-se em determinar se os bioensaios utilizados são suficientes para avaliar algum efeito maléfico dos hormônios sexuais sintéticos em diferentes concentrações. Foram realizados os bioensaios com *Artemia salina*, *Allium cepa* e células MCF-7 de adenocarcinoma de mama. Observou-se que mesmo em altas concentrações, os hormônios não demonstraram toxicidade para a *Artemia salina*. No teste com *Allium cepa* observou-se que entre os tempos de exposição aos compostos (24-72 horas), houve diferenças estatísticas significativas, mas não entre as diferentes concentrações testadas no mesmo tempo e os controles. O teste com as células MCF-7 não apresentou diferenças estatísticas entre os tempos de exposição (24-48 horas) e concentrações dos hormônios, não houve proliferação e morte celular significativa. Concluiu-se que as metodologias utilizadas foram eficientes para comprovar que os hormônios sexuais sintéticos não são tóxicos, mesmo em altas concentrações, com exposições breves. Não foi possível avaliar maiores danos nos organismos e células testados, em relação à exposição prolongada e efeito acumulativo desses compostos, é necessário organismos com maior tempo de vida. Sendo assim não são testes de segurança para monitoramento de hormônios sexuais sintéticos.

Palavras-chave: Artemia salina, Allium cepa e células MCF-7.

ABSTRACT

Several organic compounds discharged daily in water bodies, such as hormones, although not covered by Brazilian environmental laws, ought to be further investigated for having characteristic of endocrine disruptors, causing harm to the health of many living beings. It is necessary to determine biological tests easy to apply and cost effective to monitor the presence of these compounds in the waters of Brazil and the world. The synthetic sex hormones Ethinylestradiol, Gestodene, Cyproterone Acetate and Levonorgestrel, are widely used by pharmaceutical industries in production of hormonal contraceptives. The aim of this work was to determinate whether bioassays used are sufficient to assess any harmful effect of synthetic sex hormones in different concentrations. Bioassays with *Artemia salina*, *Allium cepa* and MCF-7 breast adenocarcinoma cells were performed. It was observed that even at high concentrations, hormones did not show toxicity to *Artemia salina*. In test with *Allium cepa* is observed that between the times of exposure to compounds (24-72 hours) there were statistically significant differences, but not between the different concentrations tested at the same time and controls. The test with MCF-7 cells showed no statistical differences between exposure times (24-48 hours) and concentrations of hormones. No significant proliferation and cell death was observed. It was concluded that the methodologies used were efficient to prove that synthetic sex hormones are not toxic, even at high concentrations, with brief exposures. It is necessary the use of organisms with longer life to evaluate further damage in organisms and cells tested, in relation to prolonged exposure and cumulative effect of these compounds. Therefore are not safety tests for monitoring synthetic sex hormones.

Keywords: Artemia salina, Allium cepa, and MCF-7 cells.

INTRODUÇÃO

O uso de hormônios sintéticos está bastante difundido pelo mundo. Estão presentes principalmente em anticoncepcionais, repositores hormonais e anticoncepcionais de emergência (pílula do dia seguinte). Quando presentes principalmente em recursos hídricos, vários autores os caracterizam como desreguladores endócrinos, que por definição é qualquer substância que cause desequilíbrio, interferência ou alteração no sistema endócrino, independentemente se atua diretamente no sítio receptor ou não (BILA & DEZOTTI 2007).

As origens dos desreguladores endócrinos e seus metabólitos, no meio ambiente, são a urina, fezes humanas ou esterco animal, sendo então encontrados no esgoto doméstico (BILA & DEZOTTI 2003), além das indústrias farmacêuticas na produção e descarte dos medicamentos derivados de hormônios, que também podem ser despejados no esgoto ou diretamente nos rios.

De acordo com Guimarães e Duarte (2008) os desreguladores endócrinos são inseridos no meio ambiente em baixas concentrações, porém devido às entradas diárias, essas substâncias podem atingir altos índices em longo prazo se não degradados, como é o caso de hormônios sintéticos.

Estudos em diversas partes do mundo como Eslovênia, Áustria, Suécia, França e Inglaterra têm identificado a presença de fármacos como hormônios naturais e sintéticos em seus corpos hídricos. No Brasil estudos realizados nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Goiás, também detectaram a presença de hormônios (FONSECA et al. 2012).

Segundo Andrade (2012) testes biológicos de toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para a avaliação das reações de organismos vivos à poluição ambiental.

Artemia salina é um microcrustáceo sem carapaça, da classe Anostracea, e uma apreciável fonte de alimento para peixes e outros crustáceos, tanto em ecossistemas marinhos quanto em aquários marinhos. Fotossensível, como outros organismos aquáticos primitivos, essa larva apresenta sensibilidade a substâncias tóxicas, sendo considerada um indicador de toxicidade. Os bioensaios realizados com esse organismo são comumente empregados em análises prévias de toxicidade geral ou como primeira análise do potencial citotóxico de novos compostos. Alguns estudos correlacionam o ensaio de toxicidade com larvas de *Artemia salina* com atividades fungicida, viruscida, bactericida e parasiticida, o que mostra o amplo campo de efetividade da técnica (SOUZA 2011).

Segundo Montanher et al. (2003), o teste de letalidade *in vivo* em animais simples, como a *Artemia salina*, pode ser usado como um guia de triagem e fracionamento do biomonitorado, onde a resposta mais simples para monitorar a letalidade é apenas um critério, vida ou morte. Este bioensaio correlaciona-se razoavelmente bem com citotoxicidade e outras propriedades biológicas.

O gênero *Allium* tem sido utilizado na avaliação da toxicidade de efluentes e de muitos compostos. A espécie *Allium cepa*, é a primeira escolha quando se trata de monitoramento de efluentes industriais, recomendada por agências internacionais de proteção ambiental para verificação preliminar da toxicidade de misturas complexas, principalmente devido às características que possui, tais como: (1) o crescimento rápido de suas raízes, (2) grande número de células em divisão, (3) sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, (4) sua disponibilidade durante todo o ano, (5) seu fácil manuseio e (6) por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho (ANDRADE 2012).

A exposição a substâncias tóxicas para o organismo, como certos contaminantes, pode estar diretamente associada à morte celular, quer por

apoptose quer por necrose, revelando assim propriedades citotóxicas. Além do potencial citotóxico, os contaminantes podem também possuir um potencial genotóxico que se caracteriza através de métodos que avaliam lesões ao nível do genoma (VICENTE 2012).

De acordo com Andrade (2012), o teste com *Allium cepa*, por ser um sistema eucarioto, pode conferir maior grau de proximidade na comparação com os prováveis efeitos causados na biota exposta a substâncias tóxicas.

Células derivadas de metástase de carcinoma ductal invasivo foram isoladas de uma paciente e estabelecidas como uma linhagem celular permanente classificada como MCF-7 (Michigan Cancer Foundation - 7). As células MCF-7 apresentam fenótipo tumoral e sua presença resulta na formação de espaços luminiais muito diferentes dos observados em células saudáveis. É uma linhagem que cresce de forma aderente ao substrato, responde positivamente à presença de estrógeno e não possui Caspase 3 (DIAS 2012).

Um dos ensaios amplamente utilizados para avaliação citotóxica de novas drogas, de produtos naturais, ou de qualquer outro composto, é o que emprega linhagens dependentes de estrogênio como as de câncer de mama MCF-7 ou T47-D44. A medida da proliferação celular na presença ou ausência da droga em estudo pode ser realizada através da atividade metabólica das células viáveis, através, por exemplo, do ensaio do MTT (MACIEL et al. 2002).

O ensaio com MTT baseia-se na medida do dano induzido pelo composto teste no metabolismo celular de glicídeos usualmente através da atividade de desidrogenases. A atividade celular é quantificada pela redução do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (MTT). As reações com o MTT são usadas para localizar a atividade de desidrogenases presentes em células viáveis. O sal de tetrazólio não reage diretamente com as desidrogenases, mas com os produtos da reação NADH ou NADPH que

GARCIA, Luane Ferreira; GOLVEIA, Jhébica Cavalcante de Souza; SANTIAGO, Mariângela Fontes. Avaliação do potencial toxicológico de hormônios sexuais sintéticos utilizando bioensaios. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 58-75, jun. 2014.

reduzem o MTT para cristais de formazano, os quais são insolúveis em solução aquosa. Os cristais então são dissolvidos em DMSO, resultando em uma solução púrpura que é espectrofotometricamente medida. Um aumento ou diminuição no número de células resulta em uma mudança concomitante na quantidade do formazano formado, indicando o grau de citotoxicidade causado pelo material teste (MACIEL et al. 2002; DIAS 2012).

Em virtude da presença de hormônios sintéticos nos recursos hídricos como comprovado por estudos anteriores, e pela aplicabilidade dos testes de toxicidade, o objetivo do presente trabalho constituiu-se na avaliação de danos causados por hormônios em uma espécie animal (*Artemia salina*), uma espécie vegetal (*Allium cepa*) e células de mamífero (MCF-7).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o presente trabalho foram utilizados os hormônios sintéticos Gestodeno, com pureza de 99,93%, Etinilestradiol, com pureza de 98,90%, Acetato de Ciproterona, com 100,28%, Levonorgestrel, com 98,59%. Fornecidos gentilmente pela Cifarma Indústria Farmacêutica – Goiânia, Goiás.

Preparo das soluções

Foram pesados 10 mg de cada hormônios, dissolvidos em 50 mL de Álcool Etílico P.A., e completado o volume com Água Destilada para 1 L de solução. As soluções então possuíam a concentração final de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada hormônio. O pH das soluções preparadas estavam na faixa de 8,0 a 9,5. Estas soluções foram preparadas para o teste com *Artemia salina*.

Para o teste com *Allium cepa* e células MCF-7, foram preparadas uma solução com a mistura dos quatro hormônios juntos, com concentração final de 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para cada hormônio. Com pH final de 8,7.

Todas as soluções testes foram armazenada em frasco âmbar de 1 L, na geladeira a 4°C.

Teste com *Artemia salina*

Foram adquiridos em loja especializada em artigos para aquários e piscicultura, uma bomba de aeração para aquários, sal marinho e ovos de *Artemia salina*.

O experimento foi baseado na técnica descrita por Meyer et al. apud Moraes (2012), com adaptações. Cerca de 40 mg de ovos de *Artemia salina* foram eclodidos, durante 48 horas em uma erlenmeyer de 500 mL, com aeração artificial e volume total de 200 mL de solução salina (pH = 9,0), preparada com água destilada e 7,8 g de sal marinho, tudo em exposição a iluminação artificial. Foram pipetados para tubos de ensaio 10 *Artemia salina* eclodidas.

O experimento foi planejado com quatro diluições de cada hormônio. Pipetou-se 400 µL da solução teste (10 µg.mL⁻¹) para um ependorfe (E1) que continha 1600 µL de solução salina (pH 9,0), cuja concentração final foi para 2 µg.mL⁻¹. Partindo desta diluição, pipetou-se 1000 µL para outro ependorfe (E2), que já continha 1000 µL de solução salina, cuja concentração final foi 1 µg.mL⁻¹. O mesmo procedimento ocorreu para os ependorfes E3 e E4, com concentrações finais de 0,5 µg.mL⁻¹ e 0,25 µg.mL⁻¹, respectivamente. As diluições foram realizadas primeiramente em ependorfes com solução salina, para que as concentrações de todos os hormônios chegassem as mais próximas da realidade encontrada nos recursos hídricos, e para que o pH fosse o ideal para o microcrustáceo (pH = 9,0). O procedimento foi realizado para cada hormônio separado.

Dos ependorfes foram pipetados 200 µL para todos os tudo de ensaio que já continha 800 µL de solução salina e 10 exemplares de *Artemia salina*.

GARCIA, Luane Ferreira; GOLVEIA, Jhéssica Cavalcante de Souza; SANTIAGO, Mariângela Fontes. Avaliação do potencial toxicológico de hormônios sexuais sintéticos utilizando bioensaios. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 58-75, jun. 2014.

Então as diluições (D) finais ficaram: D1 = 0,4 µg.mL⁻¹; D2 = 0,2 µg.mL⁻¹; D3 = 0,1 µg.mL⁻¹; e D4 = 0,05 µg.mL⁻¹.

Cada diluição foi testada em triplicata. O teste controle que não havia a presença de hormônios também foi realizado em triplicata.

Os tubos com o ensaio foram submetidos à iluminação artificial por 24 horas e após este período foram contabilizados os microcrustáceos. Aos que após cinco minutos de observação, não apresentavam qualquer tipo de movimento eram contabilizados como mortos.

Teste com *Allium cepa*

Para realização do teste de toxicidade com *Allium cepa* (cebola), foram adquiridos comercialmente vários bulbos de cebola, que variavam de 65 a 90 g. Seguindo a metodologia de Diéz et al. apud Souza (2006), retirou-se as raízes velhas, e desinfestou-se superficialmente com álcool etílico a 70% todos os bulbos. Foram colocados para germinar em água destilada, no escuro, à temperatura ambiente. Somente as bases dos bulbos permaneceram imersas na água, a qual foi renovada a cada 24h. Depois de 2 dias, as raízes germinadas alcançaram o comprimento de 15 a 20 mm, quando a proliferação celular atinge uma cinética de equilíbrio dinâmico.

Os bulbos foram então transferidos para béquers de 100 mL de volume, onde receberem a solução teste dos quatro hormônios juntos, em três diluições, com concentração final de 0,01 µg.mL⁻¹; 0,025 µg.mL⁻¹; e 0,000625 µg.mL⁻¹ (0,625 ng.mL⁻¹). As diluições foram preparadas com água destilada e realizadas em duplicata.

Convém ressaltar a importância do cultivo inicial do sistema-teste em água destilada como forma de evitar uma atribuição indevida das causas de possíveis inibições de crescimento das raízes às substâncias-teste utilizadas, podendo estas causas serem devido a características dos próprios bulbos (SOUZA, 2006).

GARCIA, Luane Ferreira; GOLVEIA, Jhébica Cavalcante de Souza; SANTIAGO, Mariângela Fontes. Avaliação do potencial toxicológico de hormônios sexuais sintéticos utilizando bioensaios. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 58-75, jun. 2014.

Após 24 horas de tratamento (tratamento agudo), 3 raízes por bulbo foram selecionadas aleatoriamente e coletadas. O sistema-teste retornou às mesmas condições anteriores, onde permaneceu até que completasse 72h de tratamento (tratamento sub-crônico) e mais 3 raízes foram coletadas. No período de estudo, efetuou-se a renovação da solução teste a cada 24 horas. Após a coleta, os bulbos foram colocados novamente em água destilada e após 48h (período de recuperação), para avaliar se ainda tinham o potencial de crescimento.

As raízes coletadas foram fixadas em Carnoy I (álcool etílico-ácido acético, 3:1), a 4°C, por 24 horas.

Preparo das lâminas para análise microscópica

Foram retiradas 3 raízes do total de raízes fixadas por bulbo e colocadas para lavagem e recuperação da hidratação normal. Posteriormente, as raízes foram submetidas à hidrólise ácida (HCl 1N a 60°C, em estufa) por aproximadamente 10 minutos.

Realizada a hidrólise ácida, as raízes foram lavadas novamente para a primeira etapa da coloração, onde foram imersas em Reativo de Schiff e mantidas no escuro por 2 horas.

Após a coloração, as raízes foram lavadas e separadas as regiões meristemáticas, as quais foram individualmente apoiadas sobre a lâmina, coberta com uma gota de Orceína acética 1% e esmagadas entre lâmina e lamínula. Levou-se ao microscópio.

Análise das lâminas

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum, com objetiva de 40x. Foram observadas as 3 raízes por bulbo, tanto após as primeiras 24h como após as 72h de tratamento com a solução teste.

Pelo menos 500 células foram analisadas por raiz, em cada caso, totalizando 1500 células. Os parâmetros microscópicos analisados foram os índices de divisão e de fases, para avaliação dos potenciais citotóxicos e alterações morfológicas (aberrações mitóticas), como indicador de potencial genotóxico também. Eles foram definidos da seguinte forma: (a) Índice de Divisão (ID - %) – número de células em divisão/número de células observadas X 100; (b) Índice de Fases (IF - %) – número de células em uma determinada fase mitótica/número de células em mitose X 100.

Teste com células MCF-7

Os ensaios com as células MCF-7 foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular (LFTC), da Farmatec, Goiânia, Goiás. A linhagem celular assim como as soluções e meios de cultivo e manutenção utilizados foram fornecidos pelo laboratório.

Foram preparadas oito diluições a partir da solução dos quarto hormônios juntos ($2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), todas testadas em triplicata.

As diluições foram realizadas em ependorfes que já continham um volume de meio RPMI, específico para linhagem celular utilizada. As concentrações obtidas foram: 500 ng.mL^{-1} , 250 ng.mL^{-1} , 125 ng.mL^{-1} , $62,50 \text{ ng.mL}^{-1}$, $31,25 \text{ ng.mL}^{-1}$, $15,62 \text{ ng.mL}^{-1}$, $7,81 \text{ ng.mL}^{-1}$, e $3,91 \text{ ng.mL}^{-1}$.

Para a viabilidade celular utilizou-se o método do Corante Azul de Tripán (MACIEL et al. 2002; DIAS 2012). O teste prosseguiu quando se obteve viabilidade celular acima de 95%.

Foram utilizadas placas de 96 poços com fundo chato para realização do ensaio. As células foram distribuídas na placa com uma concentração final de 1×10^4 células/mL. Em todos os poços da coluna 1 e 12, e em todos os poços da linha A e H, adicionou-se $100 \mu\text{L}$ de meio RPMI, a fim de que eles forneçam umidade para os poços interiores e sejam o branco do experimento.

Na coluna 2, poços B2 ao G2, e na coluna 11, poços B11 e G11, adicionou-se

GARCIA, Luane Ferreira; GOLVEIA, Jhêssica Cavalcante de Souza; SANTIAGO, Mariângela Fontes. Avaliação do potencial toxicológico de hormônios sexuais sintéticos utilizando bioensaios. *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v. 7, n. 2, p. 58-75, jun. 2014.

50 µL de meio RPMI e 50 µL de células, esses poços são os controles do experimento. Adicionou-se nos poços restantes 50 µL de células. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 5% de CO₂ e 37°C. Esta pré-incubação, sem as amostras testes é necessária para que as células se adaptem ao novo meio e se fixem na placa. Após esse período foram adicionados nos poços que havia apenas 50 µL de células, mais 50 µL das amostras testes, sendo que a coluna 3 estava com a maior concentração e a coluna 10 com a menor. As concentrações obtidas nos endorfees quando colocadas nas placas reduziu-se pela metade.

Após o plaqueamento com as amostras, incubou-se as placas em estufa a 5% de CO₂ e 37°C, deixando por mais 24 e 48 horas.

Após os períodos de incubação, adicionou-se em cada poço 10 µL de MTT. As placas foram incubadas por 4 horas no escuro, em estufa a 5% de CO₂ e 37°C. Após esse período, as placas foram centrifugadas por 5 min à 800 rpm. Descartou-se o sobrenadante amarelo e no fundo restaram apenas os cristais de formazano de coloração roxa, que foram solubilizados com 100 µL DMSO, e levados ao shaker por alguns minutos até ocorrer solubilização. A absorbância então foi realizada em leitora de Elisa, com o comprimento de onda de 560 nm.

A fórmula a seguir foi utilizada para o cálculo de Células Viáveis (CV).

$$CV(\%) = \left(\frac{\text{Abs grupo com amostra teste}}{\text{Abs grupo controle}} \right) \times 100$$

Análise estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas pelo programa ASSISTAT®, versão 7.6 beta. As diferenças estatísticas entre grupos foram determinadas pelo ANOVA e Teste Tukey, sendo considerado estatisticamente significativo p <0,05. Para a construção dos gráficos foi utilizado o programa Excel®, versão 2010.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A *Artemia salina* é uma espécie adaptada a grandes mudanças ambientais, como variações na salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido (MORAIS 2012). Como o teste de toxicidade com o microcrustáceo não é a nível celular, optou-se por fazê-lo com cada hormônio separado, para obter a real condição de cada hormônio.

A Tabela 1 apresenta a média da contagem de microcrustáceos vivos para cada hormônio. A quantidade de mortas são as que faltaram para o total de 10 *Artemia salina*. Pela análise estatística não há diferença entre os grupos com hormônios e o controle, e nem nas diferentes diluições.

Diluições ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Média da triplicata dos tubos contendo <i>Artemia salina</i> viva				
	Gestodeno	Etinilestradiol	Acetato de Ciproterona	Levonorgestrel	Controle
0,4	9,33 a	9,33 a	9,67 a	10,00 a	9,80 a
0,2	9,67 a	9,67 a	9,00 a	9,33 a	9,80 a
0,1	10,00 a	9,67 a	9,33 a	10 a	9,80 a
0,05	9,67 a	9,67 a	9,33 a	9,00 a	9,80 a

Tabela 1: Média da triplicata das *Artemia salina*, de acordo com as diluições correspondentes, para cada hormônio. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5%, pelo teste ANOVA.

Pode-se observar que o teste com o microcrustáceo revelou que não há toxicidade de cada hormônio, mesmo quando havia uma alta concentração, todos os resultados ficaram superior a 9 *Artemia salina* vivas. Esse bioensaio então não é eficiente para avaliar a interferência fisiológica ou celular que hormônios causam em animais.

A partir do ensaio com *Artemia salina* em que não houve diferenças na toxicidade de cada hormônio separado, optou-se por colocá-los na mesma solução para realização deste ensaio e com o de células MCF-7, uma vez que no meio ambiente os hormônios podem estar todos juntos.

A Imagem 1 é de como o teste com *Allium cepa* prosseguiu.



Imagem 1: Bulbos de cebola mergulhados em água destilada, mostrando o enraizamento. Fonte: Autores.

Observou-se que a Diluição 3 ($0,625 \text{ ng.mL}^{-1}$) no tempo de 24 horas, não houve crescimento da raiz, mas após 72 horas, os bulbos voltaram a apresentar crescimento. Todos os outros bulbos desenvolveram as raízes, que foram coletas e montadas as lâminas (Imagem 2).

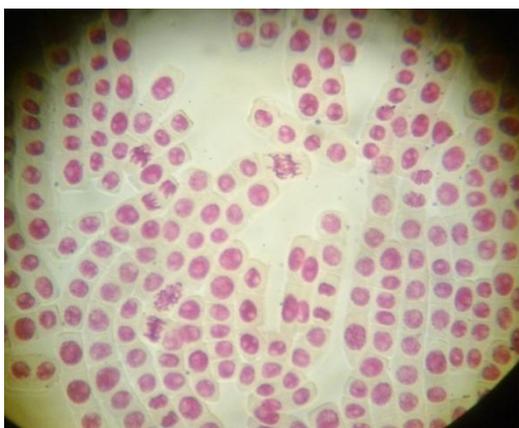


Imagem 2: Microscopia obtida no teste com *Allium cepa*, evidenciando a presença das fases mitóticas. Aumento de 400x. Fonte: Autores.

Os resultados obtidos calculando o Índice de Divisão (%) e Índice de fases (%) seguem na Tabela 2. Fez-se a opção por contar a interfase e a prófase como uma única fase, devido a dificuldade de diferenciação das células nas duas fases.

	Total de céls. em divisão	Interfase e Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
Controle 24 horas	69,62% ab	91,70%	3,09%	2,90%	2,32%
D1 24 h	44,33% b	81,95%	7,52%	4,51%	6,02%
D2 24 h	54,16% b	96,68%	1,66%	0,41%	1,24%
Controle 72 horas	71,32% ab	96,62%	1,35%	2,03%	0,00%
D1 72 h	84,56% a	95,02%	2,59%	1,97%	0,41%
D2 72 h	77,19% a	95,14%	2,56%	2,16%	0,14%
D3 72 h	93,86% a	95,89%	2,44%	1,52%	0,15%

Legenda: D = diluição; D1 = $0,01 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$; D2 = $0,025 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$; D3 = $0,000625 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$

Tabela 2: Resultados obtidos com o teste de *Allium cepa* na avaliação das soluções de hormônio comparadas com o controle. Porcentagens seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5%, pelo teste ANOVA.

De acordo com a análise estatística, observa-se que os grupos controles não apresentaram diferenças significativas no número total de células em divisão e nem entre as diluições do mesmo tempo de exposição, mas quando se compara células na presença de hormônios em 24 horas de exposição, e com 72 horas de exposição, há diferença significativa entre os dois grupos.

Os resultados da divisão celular para a presença de hormônios foram menores em 24 horas e maiores em 72 horas, quando comparado ao controle com água destilada. Observou-se um estímulo dos hormônios para o crescimento das raízes, mas isso ocorreu apenas em 72 horas, ou seja, o efeito dos hormônios pode apresentar característica acumulativa.

Segundo Fachinetto e Tedesco (2009), o sistema teste de *Allium cepa* é um excelente parâmetro de análise citotóxica, além de que a observação da ocorrência de alterações cromossômicas no ciclo celular de *A. cepa* tem sido usada como indicativo para prevenir a população humana.

Neste estudo não se observou alterações na divisão celular relatada por outros autores (SOUZA 2006; ANDRADE 2012; VICENTE 2012), sendo assim os hormônios apresentam um baixo ou inexistente poder de genotoxicidade.

No período de recuperação, 48 horas somente na presença de água destilada, provou-se que os bulbos ainda tinham o poder de enraizamento, a presença dos hormônios não causou danos no crescimento.

Escolheu-se uma concentração menor de hormônios para o teste com *Allium cepa*, comparado com o teste da *Artemia salina*, por ser um sistema mais sensível, uma vez que se verificaram a nível celular os resultados.

Os resultados para as células MCF-7 estão na Tabela 3.

Diluição (%)	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
24 horas	92a	95,64a	97,45a	96,36a	100,18a	98a	97,64a	99,64a
48 horas	95,42a	102,32a	94,66a	97,61a	100,5a	97,99a	98,81a	104,02a

Legenda: D = diluição, D1 = 250,00 ng.mL⁻¹, D2 = 125,00 ng.mL⁻¹, D3 = 62,50 ng.mL⁻¹, D4 = 31,25 ng.mL⁻¹, D5 = 15,62 ng.mL⁻¹, D6 = 7,81 ng.mL⁻¹, D7 = 3,91 ng.mL⁻¹, D8 = 1,955 ng.mL⁻¹.

Tabela 3: Resultados apresentados em porcentagem de células viáveis obtidos com o ensaio das células MCF-7. Porcentagens seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5%, pelo teste ANOVA.

Analisando estatisticamente, não houve diferenças entre os períodos de exposição aos hormônios e nem entre as diluições de hormônios. Com cálculo da porcentagem de Células Viáveis (citado na metodologia) não se faz necessário comparar com o controle.

Segundo Dias (2012), as células MCF-7 respondem positivamente à presença de estrógeno, mas isso não ocorreu, não foi observada proliferação celular, apesar de conter estrógenos no meio de cultivo, mesmo em altas concentrações. A menor viabilidade observada foi de 92%, revelando também que os hormônios não causaram morte celular.

Vicente (2012) utilizou a mesma linhagem celular, MCF-7, que foi exposta durante um período de 5 dias a várias concentrações de 17 β -estradiol, um hormônio natural, de modo a se medir a proliferação celular e determinar um padrão proliferativo para comparações futuras de efluentes com possíveis contaminações por estrógenos, porém assim como neste trabalho não se conseguiu obter os resultados esperados.

As metodologias com as células MCF-7 se mostram eficientes quando a exposição aos hormônios são mais duradouras, como Gutendorf & Westendorf (2001) que trabalhou com 8 dias de exposição e Helferich (1998) apud Piovesan et al. (2005), que manipularam as células em camundongos, tornando as células viáveis por um período de tempo maior. Sendo assim se faz necessário uma adaptação da técnica para que o estudo possa prosseguir

por mais que dois dias, e assim se consiga estabelecer um teste para monitoramento de presença de hormônios sexuais sintéticos.

CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos com os três bioensaios, conclui-se que não se obteve toxicidade e/ou morte, das células MCF-7 e dos organismos teste, com a exposição aguda aos hormônios. O que indica que os bioensaios não são seguros para serem utilizados como monitoramento de hormônios sexuais sintéticos em recursos hídricos.

Pode-se concluir também que eles não foram muito eficazes porque são realizados em curto prazo, no máximo três dias. Métodos simples e facilmente aplicáveis que determinem a presença de hormônios sexuais sintéticos devem ser estudados.

AGRADECIMENTOS

A Cifarma, pela doação dos padrões dos hormônios. Ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular, pelo apoio ao ensaio com as células MCF-7. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, B. R. G. **Estudo do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico em células de *Allium cepa* da parationa metilica antes e após aplicação dos processos UV e UV/H₂O₂**. Tese, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2012.

BILA, D.M; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, p. 523-530, 2003.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

DIAS, D. J. S. **Síntese, caracterização físico-química, morfológica e avaliação de viabilidade de células tumorais de mama (MCF-7) submetidas à nanoesferas de**

GARCIA, Luane Ferreira; GOLVEIA, Jhéssica Cavalcante de Souza; SANTIAGO, Mariângela Fontes. Avaliação do potencial toxicológico de hormônios sexuais sintéticos utilizando bioensaios. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 58-75, jun. 2014.

PLGA contendo clorambucil. Dissertação Mestrado em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, 2012.

FACHINETTO, J. M; TEDESCO, S. B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.11, n.4, p.360-367, 2009.

FONSECA, Y. V. P.; XAVIER, I. O.; ZANG, J. W.; SANTIAGO, M. F. **Análise de hormônios sexuais sintéticos no rio meia ponte em Goiânia, Goiás.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, Goiás, 2012.

GUIMARÃES, T.; DUARTE R. **Deteção e quantificação dos hormônios sexuais 17 β estradiol(E2), Estriol(E3), Estrona(E1) e 17- α -etinilestradiol(EE2) em água de abastecimento: estudo de caso da cidade de São Carlos, com vistas aos saneamento ambiental.** Dissertação, Universidade de São Paulo-USP, São Carlos, 2008.

GUTENDORF, B; WESTENDORF, J. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. **Toxicology** 166: 79–89, 2001.

MACIEL, M. A. M; ANGELO, C. P; VEIGA, J. R. V. F; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, vol. 25, Nº. 3, 429-438, 2002.

MONTANHER, A. B. P; PIZZOLATTI, M. G; BRIGHENTE, I. M. C. Monitoramento dos extratos brutos de espécies de Polygala (Polygalaceae) utilizando *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl., p. 66-68, 2003.

MORAIS, R. L. **Remoção de hormônios sexuais sintéticos por carbonização hidrotermal e por fungos de decomposição branca.** Dissertação. Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, Goiás, 2012.

PIOVESAN, A. C.; SOARES, J. R. J. M.; MOSQUETTE, R.; SIMÕES, M. J.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, E. C. Estudo morfológico e molecular da mama de ratas castradas tratadas com isoflavona ou estrogênios. **Rev Bras Ginecol Obstet** 27 (4): 204-9, 2005.

SOUZA, P. L. M. **Estudo fitoquímico e citotóxico das folhas e flores da *Caesalpinia pulcherrima* (variação de cor amarela) Swatz (Fabaceae).** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual de Goiás - UEG, Anápolis, 2011.

SOUZA, V. H. E. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo de efluentes de uma indústria de papel e celulose de Santa Catarina em *Allium cepa*.** Dissertação. Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

VICENTE, A. M. M. **Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina.** Dissertação de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Universidade de Lisboa, 2012.

GARCIA, Luane Ferreira; GOLVEIA, Jhêssica Cavalcante de Souza; SANTIAGO, Mariângela Fontes. Avaliação do potencial toxicológico de hormônios sexuais sintéticos utilizando bioensaios. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 58-75, jun. 2014.