



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL  
DOUTORADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**



**CLORAÇÃO DE AGROTÓXICOS: REMOÇÃO,  
IDENTIFICAÇÃO DE “NOVOS” SUBPRODUTOS DE  
DESINFECÇÃO E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE**

**ANDRÉ LUIS CORRÊA DE BARROS**

**Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil**

**Fevereiro de 2021**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL  
DOUTORADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL



**ANDRÉ LUIS CORRÊA DE BARROS**

**CLORAÇÃO DE AGROTÓXICOS: REMOÇÃO,  
IDENTIFICAÇÃO DE “NOVOS” SUBPRODUTOS DE  
DESINFECÇÃO E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental.

Área de Concentração: Meio Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso

Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil

Fevereiro de 2021

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

B277c Barros, Andre Luis Correa de .  
Cloração de agrotóxicos [manuscrito]: Remoção, identificação de  
"novos" subprodutos de desinfecção e avaliação de toxicidade . / Andre  
Luis Correa de Barros. - 2021.  
191 f.

Orientador: Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso .  
Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Programa de  
Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Programa de Pós-Graduação  
em Engenharia Ambiental.  
Área de Concentração: Meio Ambiente.

1. Agrotóxicos . 2. Cloração . 3. Desinfecção e desinfetantes. 4.  
Espectrometria de massa . 5. Testes de toxicidade . 6. Produtos químicos  
agrícolas. I. Afonso , Robson José de Cássia Franco . II. Universidade  
Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 502

Bibliotecário(a) Responsável: Angela Maria Raimundo - SIAPE: 1.644.803



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**André Luis Corrêa de Barros**

### **Cloração de agrotóxicos: remoção, identificação de “novos” subprodutos de desinfecção e avaliação de toxicidade**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2021.

#### Membros da banca

Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso - Orientador(a) / Universidade Federal de Ouro Preto  
Dr. Renato Zanella - Universidade Federal de Santa Maria  
Dra. Renata Pereira Lopes Moreira - Universidade Federal de Viçosa  
Dra. Karina Taciana Santos Rubio - Universidade Federal de Ouro Preto  
Dr. Jason Guy Taylor - Universidade Federal de Ouro Preto

Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 22/03/2021.



Documento assinado eletronicamente por **Robson Jose de Cassia Franco Afonso, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 25/03/2021, às 17:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0150183** e o código CRC **6112E65D**.

*“A educação e a ciência são o caminho mais curto para se conquistar um mundo mais pacífico, igualitário e livre de anseios mesquinhos... Que a luta seja pela universalização do conhecimento!”*

(Autor desconhecido)

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus e aos meus protetores espirituais por me guiarem e me darem força nos momentos em que enfrentei meus maiores medos e dificuldades.

Aos meus pais, Roberto e Aracélis, exemplos de trabalho duro, amor, simplicidade e perseverança. Eu certamente não chegaria até aqui se não fosse minha incessante busca por orgulhá-los. À minha irmã, Ana Paula, minha maior fonte de inspiração e a quem eu devoto todo o meu amor. Ao meu irmão Luis Henrique, meu grande parceiro e amigo de todos os momentos. Ao meu querido Michael pelas conversas e pela força que sempre me deu. À minha vizinha Efigênia pelas orações e amor que transborda, e aos queridos primos e tios.

A todos os integrantes, recentes ou não, do Laboratório de Caracterização Molecular e Espectrometria de Massas. Vocês me tornaram um profissional, mas sobretudo, uma pessoa muito melhor.

A todos os professores e alunos do Laboratório de Morfopatologia pela paciência e compreensão. Em especial, aos prof. Wanderson e Paula pelo apoio incondicional. Serei sempre muito grato. Ao DECBI pelo acolhimento e estímulo para que eu pudesse concluir essa etapa.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos, em especial à prof<sup>a</sup>. Dr. Silvana, pela infraestrutura e conhecimento compartilhados.

Aos ex-alunos, moradores e bichos da gloriosa República Tcheca, vocês foram responsáveis por todos os meus melhores momentos em Ouro Preto. Em especial ao Marmita, a quem devo muito por ter conseguido chegar até aqui. Aos velhos amigos de Aiuruoca e aos que conquistei nas noites republicanas de Ouro Preto por estarem sempre na torcida.

A todos os professores que contribuíram para minha formação nesses muitos anos de UFOP. Em especial, ao meu orientador, Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso, o responsável por me tornar um homem melhor. O senhor foi minha grande inspiração pelo seu lado profissional invejável e pelo seu coração que transborda humanidade. Posso dizer que tive o privilégio de não só ter um grande orientador no doutorado, mas também um amigo nas horas descontraídas e um pai nos momentos que eu necessitava de serenidade. Serei eternamente grato por cada ensinamento recebido.

Por fim, à FAPEMIG, CAPES, CNPq, ProAmb e Universidade Federal de Ouro Preto pelo suporte financeiro e técnico que permitiram a conclusão dessa etapa.

## RESUMO

A presença de agrotóxicos em águas superficiais e subterrâneas tem sido alvo de preocupação entre a comunidade científica nas últimas décadas. Além da possibilidade de causar desequilíbrios graves na biota, essas substâncias podem chegar aos sistemas de abastecimento público e contribuir para o aumento do risco à saúde humana pelo consumo da água potável. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a degradação dos agrotóxicos fipronil, metribuzin e bentazone em sistemas de cloração, identificar os possíveis subprodutos formados, propondo uma possível rota de degradação e, por fim, mensurar os possíveis efeitos tóxicos por meio de ensaios biológicos *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. A primeira etapa do trabalho consistiu em avaliar a degradação dos agrotóxicos em soluções aquosas de 20 µg/L frente às reações de cloração com concentração de cloro livre de 2,0 mg/L, tipicamente empregada em estações de tratamento de água (ETAs). Por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC-MS/MS) foi possível quantificar a concentração dos agrotóxicos em diferentes tempos de contato com o cloro (0 a 240 min). O fipronil e o metribuzim foram muito reativos, com tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) de 2,08 e 29,5 minutos, respectivamente. Por outro lado, o bentazone mostrou-se mais recalcitrante, sendo degradado apenas 20% desse herbicida, mesmo após 4 horas de contato com o cloro livre. Em uma segunda etapa do trabalho, soluções de fipronil, metribuzin e bentazone foram preparadas em concentrações mais elevadas, 2,0, 10,0, e 10,0 mg/L, respectivamente. As soluções foram submetidas à cloração com a adição de 3 mg de cloro livre para cada 1 mg de carbono presente na solução de cada agrotóxico. As soluções resultantes foram utilizadas para avaliar a mineralização dos agrotóxicos, a formação dos subprodutos de desinfecção (DBPs) e para mensurar os possíveis efeitos tóxicos das soluções por ensaios biológicos. Para todos os agrotóxicos, a mineralização, mesmo após 24 horas de exposição ao cloro, foi negligenciável, indicando, portanto, que a degradação gerou outros compostos orgânicos como subprodutos. Identificou-se, por meio de cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS), a formação de 6, 17 e 4 DBPs nos processos de cloração dos agrotóxicos fipronil, metribuzin e bentazone, respectivamente. As soluções foram analisadas por meio testes de toxicidade aguda por *Artemia salina*, estrogenicidade por leveduras em ensaios do tipo gene-reporter e viabilidade celular por ensaio de MTT. Além disso, ferramentas computacionais de predição de toxicidade (métodos *in*

*silico*) foram empregadas para mensurar, por meio de modelos matemáticos, a mutagênicidade e toxicidade de desenvolvimento para animais e humanos dos subprodutos identificados. O fipronil mostrou-se tóxico para os ensaios de *Artemia salina* com aumento da mortalidade dos microcrustáceos após 24 horas de contato com o cloro. Em ensaios *in silico*, os DBPs formados demonstraram ser potencialmente mais mutagênicos e tóxicos ao desenvolvimento que o composto original. Já o metribuzin, apresentou um leve acréscimo na toxicidade para *Artemia salina* após 24 horas de contato com o cloro. Em ensaios de estrogênicidade, o metribuzin demonstrou atividade estrogênica após ser clorado em qualquer tempo de contato avaliado, com equivalente estradiol variando de 0,061 a 6,71 µg/L. Os ensaios *in silico* também demonstraram a formação de DBPs potencialmente mais mutagênicos e tóxicos ao desenvolvimento que o composto precursor. Por fim, o bentazone e seus DPBs mostraram efeitos tóxicos similares em ensaios *in vitro* envolvendo células de hepatocarcinoma humano e nas predições de toxicidade de desenvolvimento por método *in silico*.

**Palavras-chave:** Agrotóxicos, cloração, subprodutos de desinfecção, espectrometria de massas, toxicidade, tratamento de água.



## ABSTRACT

Surface and groundwater contamination by pesticides has been a concern of the scientific community in recent decades. In addition to adverse effects to aquatic biota equilibrium, these compounds can reach water supply systems and increase the risk to human health through drinking water consumption. Thus, the purpose of this study was to evaluate the fipronil, metribuzin and bentazon degradation in chlorination systems, to identify the possible by-products formed, proposing a supposed degradation pathway and, finally, to measure the possible toxic effects through *in vitro*, *in vivo* and *in silico* biological assays. The first step of this research was to evaluate the pesticides degradation at low concentration level (20 µg/L) when submitted to chlorination at typical concentration of free chlorine (2.0 mg/L) in water treatment plants (WTPs). It was possible to quantify the pesticide concentration at different contact to free chlorine (0 to 240 min) using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Fipronil and metribuzin were highly reactive, with half-time life ( $t_{1/2}$ ) of 2.08 and 29.5 min, respectively. On the other hand, bentazon was more recalcitrant, with only 20% of degradation even after 4 hours of contact with free chlorine. In a second step of this research, fipronil, metribuzin and bentazon solutions were prepared at higher concentration: 2.0, 10.0 and 10.0 mg/L, respectively. These solutions were submitted to chlorination adding 3 mg of free chlorine for each 1 mg of organic carbon present in the pesticide solutions. The resulting solutions were used to evaluate the pesticides mineralization, the disinfection by-products formation and the possible toxic effects of these solutions by biological assays. Mineralization was negligible for all pesticides even after 24 hours of chlorine exposure, indicating that the pesticide degradation generated other organic compounds as by-products. Six, seventeen and four DBPs were identified in the fipronil, metribuzin and bentazon chlorination, respectively, using ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS). The solutions were evaluated by acute ecotoxicity using *Artemia salina* assay, estrogenicity using a gene-reporter yeast assay and cell viability via MTT assay. In addition, computational toxicity prediction tools (*in silico* methods) were applied to measure, by mathematical calculations, the mutagenicity and developmental toxicity to animal and humans of the identified DBPs. Fipronil proved to be toxic to *Artemia salina* with an increase on microcrustaceans mortality after 24 hours

of contact with chlorine. For *in silico* assays, the identified DBPs proved to be potentially more mutagenic and developmental toxicant than the precursor compound. Metribuzin, on the other hand, did not show toxicity to *Artemia salina*, but a slight increase in toxicity was observed in solutions chlorinated for 24 hours. Metribuzin solution was not estrogenic in yeast gene-reporter assays, however all chlorinated solutions proved to be estrogenic using the same assay, with estradiol equivalent ranging from 0.061 to 6.71 µg/L. The *in silico* assays also demonstrated the formation of DBPs potentially more mutagenic and developmental toxicant than the precursor compound. Lastly, bentazon and its DBPs showed similar toxic effects *in vitro* assays involving human hepatocarcinoma cells and in developmental toxicity predictions via *in silico* method.

**Keywords:** Pesticides, chlorination, disinfection by-products, mass spectrometry, toxicity, water treatment.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> Fluxograma típico de um sistema convencional de tratamento de água. ....	12
<b>Figura 3.2.</b> Distribuição do ácido hipocloroso e íon hipoclorito em água em diferentes valores de pH e temperatura. ....	15
<b>Figura 3.3.</b> Dinâmica da contaminação de recursos hídricos por agrotóxicos. ....	22
<b>Figura 3.4.</b> Total de amostras analisadas (□) e amostras com agrotóxicos em concentrações acima do limite de quantificação do método analítico empregado (■). ....	23
<b>Figura 3.5.</b> Fórmula estrutural do inseticida fipronil. ....	30
<b>Figura 3.6.</b> Fórmula estrutural do herbicida metribuzin. ....	32
<b>Figura 3.7.</b> Fórmula estrutural do herbicida bentazone. ....	34
<b>Figura 3.8.</b> Estrutura do sal de MTT e seu respectivo metabólito formazan, o qual é formado pela redução do MTT via reações envolvendo atividade mitocondrial de células viáveis.....	47
<b>Figura 3.9.</b> Representação esquemática da linhagem <i>S. cerevisiae</i> BLYE, contendo receptor de estrógeno humano (hER), elementos de resposta a estrogênio (ERE), genes luxa, -B, -C, -D e E e gene frp. ....	49
<b>Figura 4.1.</b> Aquário adaptado para a eclosão e seleção das Artemias utilizadas nos ensaios de toxicidade aguda. ....	76
<b>Figura 4.2.</b> Designer de uma célula de Neubauer vista em microscópio. Os quadrantes destacados em vermelho são aqueles utilizados para a contagens das células.....	79
<b>Figura 4.3.</b> Configuração da placa de 96 poços para os ensaios de citotoxicidade das soluções dos agrotóxicos pré e pós-cloração.....	81
<b>Figura 4.4.</b> Esquema sintetizando o procedimento de avaliação da viabilidade celular de células de hepatoma humano (HepG2) pela a exposição à solução de agrotóxico pré e pós tratamento de cloração. ....	82
<b>Figura 4.5.</b> Esquema de diluição seriada utilizada para o preparo de 18 concentrações de estradiol em solução de DMSO 4%, as quais foram aplicadas como controle positivo dos ensaios de estrogênicidade. ....	84
<b>Figura 4.6.</b> Esquema sintetizando as etapas de cultivo, manutenção e aplicação das leveduras BLYES e BLYR nos ensaios de estrogênicidade. ....	87

<b>Figura 4.7.</b> Microplaca ilustrando a distribuição dos padrões de estradiol, do branco e controle negativo do ensaio biológico, do branco do ensaio químico e das soluções dos agrotóxicos em diferentes tempos de contato com cloro livre. ....	88
<b>Figura 5.1.</b> Degradação do fipronil (20 µg/L) por cloração (2,00 mg/L de cloro livre) a pH 7,5 ± 0,2 e temperatura de 25 ± 1 °C.....	94
<b>Figura 5.2.</b> Fórmula estrutural e rota de degradação proposta para a formação dos subprodutos de degradação do fipronil por processos de cloração. ....	96
<b>Figura 5.3.</b> Taxa de formação/consumo dos DBPs em diferentes tempos de cloração do fipronil (0, 15, 30 e 60 min; 12 e 24 h). Os DBP F1, DBP F2 e DBP F4 tiveram as suas áreas cromatográficas divididas para melhor visualização do gráfico. O fator de correção está representado na legenda.....	97
<b>Figura 5.4.</b> Formação do DBP-F2 pela fotólise do fipronil. Em (A) tem-se a rota para a formação do DBP-F2 passando pela reação de formação do fipronil dessulfínil; (B) interação entre os grupos amino e sulfonilo favorecendo a quebra homolítica das ligações.....	98
<b>Figura 5.5.</b> Porcentagem de mortalidade dos náuplios de <i>A. salina</i> pela exposição por 48 horas às soluções de fipronil pré e pós cloração. Foram avaliados o controle negativo (C.N.), o branco (B) e os tempos de reação 0, 30 min, 12 h e 24 h. ....	101
<b>Figura 5.6.</b> Avaliação da viabilidade de células HepG2 submetidas à exposição de 48 horas ao fipronil em diferentes tempos de cloração. ....	103
<b>Figura 5.7.</b> Curva do padrão E2 para ensaios de estrogenicidade por leveduras BLYES em diferentes tempos de leitura. ....	104
<b>Figura 5.8.</b> Quadruplicata da curva do padrão E2 para o ensaio BLYES em 4 horas de exposição. ....	105
<b>Figura 5.9.</b> Porção linear da curva sigmoide utilizada para a determinação do EC50 do E2 após 4 horas de incubação da levedura. ....	106
<b>Figura 5.10.</b> Curvas do padrão de E2 em DMSO 1% e com adição da matriz utilizada nos ensaios de cloração (DMSO 1% + Cloro Livre (CL) + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + tampão fosfato) para avaliação de interferência. ....	107
<b>Figura 5.11.</b> Dados dos ensaios BLYES e BLYR para controle positivo, branco, soluções não reagidas (T = 0) e cloradas em diferentes tempos de reação (30 min; 12 e 24 h). A Fig. 3 (A) mostra a curva dose-resposta obtida para os resultados da atividade estrogênica (ensaio BLYES). As Fig.	

3 (B) e Fig. 3 (C) apresentam as diluições necessárias para que as amostras não fossem tóxicas para as cepas de leveduras. ....	109
<b>Figura 6.1.</b> (A) Degradação do herbicida metribuzin na concentração de 20 µg/L em reação de cloração a 2,0 mg/L de cloro livre. (B) Mineralização do herbicida metribuzin a concentração de 10 mg/L e excesso de cloro livre (3 mg cloro livre/1 mg de C na solução). Valor teórico foi calculado por estequiometria. ....	119
<b>Figura 6.2.</b> Estruturas químicas dos DBPs formados e suposta rota de degradação do metribuzin em reações de cloração. As setas representam reações envolvendo HOCl e OCl <sup>-</sup> em meio aquoso (presença de H <sup>+</sup> , OH <sup>-</sup> e H <sub>2</sub> O). ....	122
<b>Figura 6.3.</b> Proposta de mecanismo para a desaminação do metribuzin por cloração. Ressalta-se que em meio aquoso as estruturas tautoméricas trocam prótons entre o oxigênio e o nitrogênio vizinhos. ....	123
<b>Figura 6.4.</b> (A) Formação/consumo dos DBPs formados a partir da cloração do metribuzin em diferentes tempos de exposição ao cloro. Figura (B) é a ampliação de uma porção da Figura (A) para examinar, em detalhes, os DBPs detectados em baixa intensidade (área relativa < 10%).	126
<b>Figura 6.5.</b> Mortalidade (%) dos náuplios de <i>Artemia salina</i> após 48 h de exposição às soluções de metribuzin antes (0) e após (15, 30 e 60 min, 12 e 24 h) a etapa de cloração. N.C. foram os experimentos de controle negativo e B o branco do ensaio químico. ....	128
<b>Figura 6.6.</b> Viabilidade celular de células HepG2 após 48 h de exposição às soluções de metribuzin pré e pós etapa de cloração. ....	129
<b>Figura 6.7.</b> Dados do ensaio BLYES (A) e BLYR (B) para o controle positivo E2, branco, soluções de metribuzin antes e após a cloração. ....	131
<b>Figura 6.8.</b> Gráfico de loadings para a análise de dispersão das variáveis em relação às componentes principais. ....	133
<b>Figura 7.1.</b> (A) Degradação do herbicida bentazone na concentração de 20 µg/L em reação de cloração a 2,0 mg/L de cloro livre. (B) Mineralização do herbicida bentazone na concentração de 10 mg/L e excesso de cloro livre (3 mg cloro livre/1 mg de C na solução). Valor teórico foi calculado por estequiometria. ....	142
<b>Figura 7.2.</b> Estruturas de ressonância para a molécula do bentazone. ....	142

<b>Figura 7.3.</b> Formação de DBPs e a suposta rota de degradação do herbicida bentazone submetido às reações de cloração. As setas representam reações envolvendo cloro livre (HOCl/OCl-) em meio aquoso (H <sup>+</sup> , OH <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O). .....	145
<b>Figura 7.4.</b> Taxa de formação/consumo dos DBPs em diferentes tempos de cloração do bentazone (0, 15, 30 e 60 min; 12 e 24 h). O bentazone e os DBPs B1 e B3 tiveram as suas áreas cromatográficas divididas para melhor visualização do gráfico. O fator de correção está representado na legenda. ....	146
<b>Figura 7.5.</b> Mortalidade dos náuplios de Artemia salina após 48 h de exposição às soluções de bentazone pré e pós reação de cloração. Os dados foram comparados com o controle negativo (C.N.) e o branco do ensaio químico (B). ....	147
<b>Figura 7.6.</b> Viabilidade celular de células HepG2 após 48 h de exposição às soluções de bentazone pré e pós etapa de cloração. ....	149
<b>Figura 7.7.</b> Dados do ensaio BLYES (A) e BLYR (B) para o controle positivo E2, branco e soluções de bentazone antes e após a cloração. ....	151

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1.</b> Principais DBPs clorados.....	17
<b>Tabela 3.2.</b> Limites ( $\mu\text{g/L}$ ) para DBPs em água potável estabelecidos pela WHO (2011), U.S. EPA (2009), EU (1998) e Portaria de Consolidação nº 5/2017. ....	19
<b>Tabela 3.3.</b> Revisão da literatura sobre formação de subprodutos de desinfecção de agrotóxicos submetidos à processos de desinfecção por compostos de cloro e os respectivos ensaios biológicos utilizados para avaliação de toxicidade. ( <b>início</b> ).....	25
<b>Tabela 3.4.</b> Revisão da literatura para metodologias analíticas aplicadas para a determinação de DBPs formados pela cloração de agrotóxicos .....	38
<b>Tabela 5.1.</b> Dados obtidos pela análise por UHPLC-HESI-HRMS para fipronil e seus subprodutos. Fórmulas moleculares propostas, massa monoisotópica exata, tempo de retenção, relações m/z teórica e experimental, e o erro calculado (ppm).....	95
<b>Tabela 5.2.</b> Dados experimentais de toxicidade aguda do fipronil para organismos aquáticos em diferentes níveis tróficos. ....	102
<b>Tabela 5.3.</b> Cálculo do valor de EC50 para o padrão de E2 com 4 horas de incubação.....	106
<b>Tabela 5.4.</b> Valores de EC50 e limite de detecção (LD) para as curvas em DMSO 1% e na matriz utilizada nos ensaios de cloração. ....	107
<b>Tabela 5.5.</b> Predição da toxicidade dos subprodutos de cloração do fipronil via metodologia in silico pelo software T.E.S.T. da U.S.EPA. ....	111
<b>Tabela 6.1.</b> Dados obtidos pela análise por UHPLC-HESI-HRMS para o metribuzin e seus subprodutos. Fórmulas moleculares propostas, massa monoisotópica exata, tempo de retenção, relações m/z teórica e experimental, e o erro calculado (ppm).....	121
<b>Tabela 6.2.</b> Resultados de atividade estrogênica, expressa em equivalente de 17- $\beta$ -estradiol, para todas as amostras submetidas ao ensaio BLYES.....	132
<b>Tabela 6.3.</b> Predição da toxicidade dos subprodutos de cloração do metribuzin via metodologia in silico pelo software T.E.S.T. da U.S.EPA. ....	135
<b>Tabela 7.1.</b> Dados obtidos pela análise por UHPLC-HESI-HRMS para o bentazone e seus subprodutos. Fórmulas moleculares propostas, massa monoisotópica exata, tempo de retenção, relações m/z teórica e experimental, e o erro calculado (ppm).....	144

<b>Tabela 7.2.</b> Predição da toxicidade dos subprodutos de cloração do bentazone via metodologia in silico pelo software T.E.S.T. da U.S.EPA. ....	152
--	-----



## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
BLYES	Levedura bioluminescente para triagem de estrogênio
BLYR	Levedura constitutivamente bioluminescente
CID	Dissociao induzida por colisão
CPS	Contagens por minuto
DA-metribuzim	Desamino-metribuzim
DADK-metribuzim	Desaminodiceto-metribuzim
DBE	Equivalência de duplas ligaoes
DBPs	Subprodutos de desinfeco
DK-metribuzim	Diceto-metribuzim
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco para cultura de células
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO <sub>600</sub>	Densidade tica a 600 nm
E2	17- $\beta$ -estradiol
EC <sub>50</sub>	Concentrao efetiva que causa 50% do efeito máximo investigado
ESI	Ionizao por electrospray
ETAs	Estaoes de tratamento de gua
GC-ECD	Cromatografia gasosa acoplada ao detector de captura de elétrons
HAAs	cidos haloacéticos
HANs	Haloacetoneitilas
HepG2	Linhagem de célula de hepatocarcinoma humano
HESI	Ionizao por electrospray aquecida
HPLC-MS/MS	Cromatografia liquida de alta eficiência acoplada  espectrometria de massas sequencial

HPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência-ionização por electrospray-espectrometria de massas sequencial
Ibama	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDA	Ingestão diária aceitável
IC <sub>20</sub>	Concentração que causa 20% de redução na resposta de bioluminescência das leveduras BLYR
LAS	Lauril sulfato de sódio
LC <sub>50</sub>	Concentração letal para 50% da população exposta
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LD	Limite de detecção
LLE	Extração líquido-líquido
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRM	Monitoramento de múltiplas reações
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difenil tetrazolium
MTBE	Éter metil terc-butílico
NDMA	<i>N</i> -nitrosodimetilamina
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
Q(SAR)	Relação Quantitativa Estrutura-Atividade
RMN	Ressonância magnética nuclear
SFB	Soro fetal bovino
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
T.E.S.T.	Ferramenta de software para estimativa de toxicidade
THMs	Trihalometanos
TOC	Carbono orgânico total

UHPLC-HESI-HRMS

Cromatografia de ultra alta eficiência – ionização por electrospray aquecido – espectrometria de massas de alta resolução

UHPLC-HRMS

Cromatografia de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução

U.S.EPA

Agencia de Proteção Ambiental do Estado Unidos

UV

Ultravioleta

WHO

Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO AO TEMA AGROTÓXICOS E ASPECTOS DA CONTAMINAÇÃO DE ÁGUAS POTÁVEIS .....</b>	<b>1</b>
1.1. BIBLIOGRAFIA .....	5
<b>CAPÍTULO 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....</b>	<b>8</b>
<b>CAPÍTULO 3. ASPECTOS GERAIS .....</b>	<b>11</b>
3.1. POTABILIZAÇÃO DAS ÁGUAS: UMA BREVE CONTEXTUALIZAÇÃO .....	12
3.2. DESINFECÇÃO POR COMPOSTOS DE CLORO .....	14
3.3. SUBPRODUTOS DE DESINFECÇÃO POR CLORAÇÃO: FORMAÇÃO, RISCO E REGULAMENTAÇÃO.....	16
3.4. AGROTÓXICOS.....	20
3.4.1. Contaminação de águas por agrotóxicos .....	20
3.4.2. Contribuição dos agrotóxicos na produção de DBPs e no risco associado ao consumo de água potável.....	23
3.4.3. Agrotóxicos selecionados.....	30
3.4.4. Métodos analíticos para a determinação dos DBPs de agrotóxicos .....	36
3.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS .....	42
3.5.1. Teste de toxicidade aguda por <i>Artemia salina</i> .....	44
3.5.2. Viabilidade celular por ensaios colorimétricos .....	45
3.5.3. Ensaio de estrogênicidade com levedura recombinante BLYES .....	47
3.5.4. Ensaio de toxicidade <i>in silico</i> por metodologia (Q)SAR .....	50
3.6. BIBLIOGRAFIA .....	53
<b>CAPÍTULO 4. PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DOS SUBPRODUTOS FORMADOS .....</b>	<b>66</b>
4.1. LIMPEZA DAS VIDRARIAS .....	67
4.2. ENSAIOS DE CLORAÇÃO E TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	67
4.2.1. Reagentes, solventes, equipamentos e vidrarias.....	67

4.2.2. Preparo das soluções .....	68
4.2.3. Produção das soluções cloradas para as análises químicas e biológicas .....	69
4.2.4. Determinações Analíticas.....	71
4.3. ENSAIOS DE TOXICIDADE.....	73
4.3.1. Reagentes, solventes, equipamentos e vidrarias.....	73
4.3.2. Toxicidade aguda por <i>Artemia salina</i> .....	75
4.3.3. Viabilidade celular por ensaio de MTT.....	77
4.3.4. Ensaio de atividade estrogênica BLYES.....	83
4.3.5. Toxicidade <i>in silico</i> .....	89
4.4. BIBLIOGRAFIA .....	91
<b>CAPÍTULO 5. CLORAÇÃO DO FIPRONIL: DEGRADAÇÃO, FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE.....</b>	<b>92</b>
5.1. ANÁLISES QUÍMICAS DAS SOLUÇÕES CLORADAS DE FIPRONIL .....	93
5.1.1. Degradação e mineralização do fipronil.....	93
5.1.2. Identificação e elucidação dos DBPs formados pela cloração do fipronil .....	94
5.2. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO FIPRONIL PRÉ E PÓS-CLORAÇÃO.....	100
5.2.1. Toxicidade aguda por <i>Artemia salina</i> .....	100
5.2.2. Viabilidade celular por ensaio de MTT utilizando célula HepG2.....	102
5.2.3. Ensaios de estrogênicidade por levedura BLYES .....	104
5.2.4. Predição de toxicidade por método Q(SAR).....	110
5.3. CONCLUSÃO.....	113
5.4. BIBLIOGRAFIA .....	115
<b>CAPÍTULO 6. CLORAÇÃO DO METRIBUZIN: DEGRADAÇÃO, FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE.....</b>	<b>117</b>
6.1. ANÁLISES QUÍMICAS DAS SOLUÇÕES CLORADAS DE METRIBUZIN .....	118
6.1.1. Degradação e mineralização do metribuzin .....	118
6.1.2. Identificação e elucidação dos DBPs formados pela cloração do metribuzin .....	120

6.2. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO Metribuzin PRÉ E PÓS-CLORAÇÃO .....	126
6.2.1. Toxicidade aguda por <i>Artemia salina</i> .....	127
6.2.2. Viabilidade celular por ensaio de MTT utilizando células HepG2 .....	129
6.2.3. Ensaio de estrogenicidade utilizando leveduras BLYES .....	130
6.2.4. Predição de toxicidade via método Q(SAR) .....	135
6.3. CONCLUSÃO .....	136
6.4. BIBLIOGRAFIA .....	138
<b>CAPÍTULO 7. CLORAÇÃO DO BENTAZONE: DEGRADAÇÃO, FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE.....</b>	<b>140</b>
7.1. ANÁLISE QUÍMICA DAS SOLUÇÕES CLORADAS DE BENTAZONE .....	141
7.1.1. Degradação e mineralização do bentazone.....	141
7.1.2. Identificação e elucidação dos DBPs formados pela cloração do bentazone .....	143
7.2. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO bentazone PRÉ E PÓS-CLORAÇÃO .....	147
7.2.1. Toxicidade aguda para <i>Artemia salina</i> .....	147
7.2.2. Viabilidade celular por ensaio de MTT utilizando células HepG2 .....	148
7.2.3. Avaliação de estrogenicidade por leveduras BLYES.....	150
7.2.4. Predição de toxicidade utilizando método Q(SAR) .....	151
7.3. CONCLUSÃO .....	153
7.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	155
<b>CAPÍTULO 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>156</b>
<b>MATERIAIS SUPLEMENTARES.....</b>	<b>159</b>
<b>ARTIGOS PUBLICADOS.....</b>	<b>190</b>

***CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO AO TEMA  
AGROTÓXICOS E ASPECTOS DA  
CONTAMINAÇÃO DE ÁGUAS POTÁVEIS***

Em meio a tantas crises enfrentadas pela sociedade nas últimas décadas, a questão da disponibilidade hídrica, principalmente para fins potáveis, têm sido um dos principais alvos de atenção e discussão entre as comunidades científicas e órgãos internacionais. Muito embora tenhamos 75% da superfície da Terra constituída de água, 97% desse montante concentra-se em mares, oceanos e lagos de água salgada. Apenas 3% do volume total são de água doce, dos quais 68,9% concentram-se em calotas polares e geleiras e os outros 31,1% estão disponíveis em rios e lagos (0,3%), fontes subterrâneas (29,9%) e outros reservatórios (0,9) (Libânio, 2010).

Associada à reduzida quantidade e, principalmente, à desigual distribuição geográfica de recursos hídricos disponíveis para fins potáveis, considerando o atual panorama tecnológico e de custo e acesso à água tratada, temos ainda um acelerado processo de degradação dos recursos naturais que nos leva a uma segunda grande preocupação: a qualidade da água. Paradoxalmente, em alguns casos as fontes de abastecimento público são utilizadas à montante como fontes receptoras de esgotos domésticos, efluentes industriais e hospitalares, resíduos da agricultura, entre outros (Libânio, 2010).

Dentro do contexto apresentado, o crescimento demográfico acelerado, a intensificação das atividades industriais e do agronegócio e a falta de políticas públicas para a mitigação dos impactos causados pela ação antropogênica, têm causado um crescente aumento dos níveis de contaminação dos mananciais por substâncias químicas danosas e/ou potencialmente perigosas à saúde humana e ao meio ambiente (Symons, 2006). Dentre esses contaminantes, destacam-se os compostos farmacêuticos ativos, produtos de higiene pessoal, hormônios esteroides, plastificantes, aditivos industriais, surfactantes, agrotóxicos, entre outros (Silva e Collins, 2011).

Uma vez presentes em corpos d'água, essas substâncias podem chegar em mananciais utilizados para abastecimento público e, por conseguinte, aos consumidores, haja vista que muitos desses compostos podem passar inalterados pelo tratamento de água. É sabido que as etapas envolvendo sistemas convencionais de tratamento de água, tais como pré-filtração, coagulação, floculação, decantação e desinfecção, dificilmente garantem a remoção completa desses contaminantes orgânicos (Li *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2014).

Além disso, os processos de desinfecção por cloração, amplamente empregados em sistemas de tratamento em todo o mundo, podem levar a formação de subprodutos de desinfecção (DPBs – em inglês: disinfection by-products), os quais podem ser potencialmente mais tóxicos e mais persistentes no meio ambiente que o composto original. Essa preocupação veio à tona a partir



dos anos 70, quando Rook (1974) e Bellar (1974) relataram a presença de trihalometanos (THMs) e ácidos haloacéticos (HHAs) formados a partir da matéria orgânica presente em águas submetidas ao tratamento de cloração. Ademais, os primeiros relatos do final dos anos 70 evidenciaram o potencial mutagênico de extratos orgânicos de amostras de água potável em ensaios biológicos envolvendo *Salmonella* (Loper, 1980).

A formação dos DBPs, via reação de cloração, dá-se pelo fato de que o cloro, além de potente agente químico de desinfecção de águas, também é um poderoso oxidante químico de matéria orgânica dissolvida, contaminantes antropogênicos e brometo/iodeto presentes em águas naturais. Quando o cloro é aplicado em água, ocorre a reação de formação de ácido hipocloroso (HOCl) que se dissocia em íon hipoclorito ( $\text{OCl}^{-1}$ ), sendo ambas as espécies atuantes no processo de oxidação da matéria orgânica. Aquela exerce, comprovadamente, maior potencial de oxidação do que esta espécie e os fatores-chave que determinam o equilíbrio entre elas são o pH e a temperatura do meio (Acero *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009, 2011a).

Tendo em vista a crescente preocupação com a formação de produtos potencialmente tóxicos na potabilização da água, muitos estudos têm sido desenvolvidos para ampliar o conhecimento na área e, conseqüentemente, reforçar a necessidade de novas políticas de proteção e monitoramento da qualidade do manancial e da água tratada. Nas últimas décadas, mais de 600 DPBs têm sido identificados, muito embora poucos deles tenham sido profundamente avaliados quanto ao potencial tóxico (Richardson *et al.*, 2007; Sharma, Zboril e McDonald, 2014). Neste contexto, os microcontaminantes de preocupação emergente, incluindo os agrotóxicos, ganham notoriedade, uma vez que estão cada vez mais presentes em sistemas hídricos, são potenciais formadores de DPBs ainda desconhecidos e, além disso, contribuem para a formação dos tradicionais subprodutos clorados tais como os trihalometanos, ácidos haloacéticos, nitrosaminas, e outros derivados da cloração da matéria orgânica presente (Zhang *et al.*, 2013)

Principalmente no Brasil, os agrotóxicos merecem atenção especial com relação a presença dos mesmos em corpos d'água. A produção de alimentos no país tem se tornado cada vez mais importante para o balanço comercial e, por isso, a produtividade elevada a qualquer custo tem nos colocado como o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (20% do total comercializado no planeta), mesmo não possuindo a maior área cultivada (Albuquerque *et al.*, 2016). Se não bastasse isso, o Brasil continua permitindo a utilização de princípios ativos comprovadamente perigosos e já proibidos em países desenvolvidos (IBAMA, 2014, 2016).

Muito embora a concentração individual de agrotóxicos em águas superficiais ocorra a níveis de ng/L a µg/L, a contribuição coletiva desses compostos para a formação total de DPBs não pode ser negligenciada. Dessa forma, estudos sobre as cinéticas de degradação, a identificação de intermediários e subprodutos e o estabelecimento das rotas de degradação de alguns agrotóxicos frente à cloração têm sido desenvolvidos (Acero *et al.*, 2007, 2008; Brosillon *et al.*, 2006; Chamberlain *et al.*, 2012; Hu, Cheng e Lin, 2015). Além disso, estudos envolvendo bioensaios para a avaliação dos DPBs gerados na cloração de agrotóxicos vem sendo aplicados para mensurar a toxicidade dos mesmos (Kamoshita *et al.*, 2010; Kishida *et al.*, 2010; Takanashi *et al.*, 2012; Tawk *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2014)

No entanto, ainda existe uma lacuna de conhecimento quanto à formação de subprodutos de agrotóxicos submetidos a cloração, principalmente quando se trata da realidade brasileira. Muitos princípios ativos amplamente utilizados no Brasil sequer foram estudados e, ainda que estudados, muitos aspectos ainda precisam ser discutidos. Essa realidade torna-se mais preocupante quando voltamos as atenções para as avaliações de toxicidade, uma vez que estudos de efeitos adversos envolvendo DBPs formados pela cloração de agrotóxicos são ainda mais escassos (Tawk *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2014; Kamoshita *et al.*, 2010; Kishida *et al.*, 2010; Takanashi *et al.*, 2012).

Dessa forma, o presente projeto visa: avaliar a degradação e mineralização dos agrotóxicos fipronil, metribuzim e bentazone utilizando hipoclorito de sódio como agente de desinfecção de águas; identificar e elucidar, por meio de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS), os subprodutos de desinfecção formados a partir desses agrotóxicos que são amplamente utilizados no Brasil e frequentemente detectados em nossas águas superficiais; propor, como base nos resultados obtidos, a possível rota de degradação dos mesmos; e, por fim, mas não menos importante, avaliar a toxicidade das soluções nos diferentes tempos de reação utilizando diversos ensaios biológicos, tais como: toxicidade aguda por *Artêmia salina*, citotoxicidade por MTT, estrogenicidade por meio de leveduras BLYES e predições de toxicidade utilizando modelos *in silico* (computacional) disponibilizados por importantes órgão reguladores internacionais.

## **1.1. BIBLIOGRAFIA**

ACERO, J. L. *et al.* Kinetics of reactions between chlorine or bromine and the herbicides diuron and isoproturon. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 2, p. 214–222, fev. 2007.

ACERO, J. L. *et al.* Chlorination of organophosphorus pesticides in natural waters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, n. 1–2, p. 320–328, 2008.

ALBUQUERQUE, A. F. *et al.* Pesticides in Brazilian freshwaters: A critical review. **Environmental Science: Processes and Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779–787, 2016.

BROSILLON, S. *et al.* Chlorination kinetics of glyphosate and its by-products: Modeling approach. **Water Research**, v. 40, n. 11, p. 2113–2124, 2006.

CHAMBERLAIN, E. *et al.* Comprehensive screening study of pesticide degradation via oxidation and hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 354–363, 2012.

HU, C.; CHENG, M.; LIN, Y. Chlorination of bensulfuron-methyl: Kinetics, reaction factors and disinfection by-product formation. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 53, p. 46–51, 2015.

IBAMA. **Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins**. Disponível em: <[https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/IBAMA\\_boletim\\_de\\_comercializacao\\_2000\\_2012.pdf](https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/IBAMA_boletim_de_comercializacao_2000_2012.pdf)>. Acesso em: 25 fev. 2014.

\_\_\_\_. **Relatório de comercialização de agrotóxicos: Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/relatorios/substancias-quimicas/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>. Acesso em: 4 jul. 2017.

KAMOSHITA, M. *et al.* Mutagenic activities of a chlorination by-product of butamifos, its structural isomer, and their related compounds. **Chemosphere**, v. 78, n. 4, p. 482–487, 2010.

KISHIDA, M. *et al.* Chlorination by-products of fenitrothion. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 85–91, 2010.

LI, W. *et al.* UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of diazinon and its influence on disinfection byproduct formation following chlorination. **Chemical Engineering Journal**, v. 274, p. 39–49, 2015.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de Qualidade e Tratamento de Água**. 3<sup>a</sup> ed. Campinas, SP: 2010, 2010.

LOPER, J. C. Mutagenic effects of organic compounds in drinking water. **Mutation research**, v. 76, p. 241–268, 1980.

LUO, Y. *et al.* A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 473–474, p. 619–641, 2014.

RICHARDSON, S. *et al.* Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 636, n. 1–3, p. 178–242, 2007.

SHARMA, V. K.; ZBORIL, R.; MCDONALD, T. J. Formation and toxicity of brominated disinfection byproducts during chlorination and chloramination of water: A review. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 49, n. 3, p. 212–228, 2014.

SILVA, C. G. A. DA; COLLINS, C. H. Aplicação de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de contaminantes orgânicos emergentes. **Química Nova**, 2011.

SYMONS, G. E. Water treatment through the ages. **Journal / American Water Works Association**, v. 98, n. 3, p. 87–97, 2006.

TAKANASHI, H. *et al.* Production of Chloro-5-hydroxy-2-nitrobenzoic Acid through Chlorination of 3-Methyl-4-nitrophenol, a Typical Hydrolysate of Fenitrothion. **Journal of Water and Environment Technology**, v. 10, n. 4, p. 437–447, 2012.

TAWK, A. *et al.* Chlorination of the beta-triketone herbicides tembotrione and sulcotrione: Kinetic and mechanistic study, transformation products identification and toxicity. **Water research**, v. 76, p. 132–142, 2015.

TIAN, F. *et al.* Methiocarb degradation by free chlorine in water treatment: Kinetics and pathways. **Chemical Engineering Journal**, v. 232, p. 10–16, out. 2013.

\_\_\_\_\_. Kinetics and mechanism of dimethoate chlorination during drinking water treatment. **Chemosphere**, v. 103, p. 181–187, 2014.

XU, B. *et al.* Ametryn degradation by aqueous chlorine: Kinetics and reaction influences. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1–3, p. 586–592, set. 2009.

\_\_\_\_\_. Chlorination of chlortoluron: Kinetics, pathways and chloroform formation.

**Chemosphere**, v. 83, n. 7, p. 909–916, 2011.

ZHANG, T. Y. *et al.* Degradation kinetics and chloropicrin formation during aqueous chlorination of dinoseb. **Chemosphere**, v. 93, n. 11, p. 2662–2668, 2013.

## ***CAPÍTULO 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS***

Nas últimas décadas observou-se uma crescente preocupação das comunidades científicas com os chamados microcontaminantes orgânicos de preocupação emergente. De forma geral, são compostos de origem natural ou de atividades antropogênicas presentes em concentrações a níveis traço (pbb e ppt) e que podem representar algum grau de risco ao meio ambiente e/ou à saúde humana. Dentre essas substâncias, destacam-se os agrotóxicos, insumos amplamente utilizados nas produções agrícolas e, em menor grau, no controle de pragas em áreas urbanas.

A crescente demanda por alimentos e a “comoditização” da produção agrícola, principalmente em países exportadores como o Brasil, fez com que o crescimento da utilização dos agrotóxicos ocorresse de forma descontrolada. O Brasil, tornou-se o país que mais consome agrotóxicos no mundo, crescendo a quantidade aplicada desses insumos em 200% em apenas uma década. Além disso, a utilização dos agrotóxicos no Brasil é caracterizada por um controle bastante questionável em relação à toxicidade desses compostos. Estima-se que mais de 30% dos princípios ativos comercializados no Brasil são proibidos nos países da União Europeia.

Uma vez utilizados indiscriminadamente, esses agrotóxicos tornam-se cada vez mais presentes em compartimentos ambientais, inclusive águas superficiais e subterrâneas. Os efeitos desses contaminantes no desequilíbrio ambiental vêm sendo constantemente discutidos e, se não comprovadamente tóxicos, eles são pelo menos suspeitos de causar efeitos adversos em organismos vivos. Ademais, os agrotóxicos podem chegar às fontes de abastecimento público e representar certo risco à saúde pública. Embora em baixas concentrações, não é razoável que se negligencie a presença desses contaminantes em águas de abastecimento, visto que sabe-se muito pouco a respeito da exposição a esses compostos por longos períodos de tempo e das suas contribuições, por efeito sinérgico com outros contaminantes, na toxicidade da água.

As estações de tratamento não são projetadas para a remoção deste tipo de contaminantes, embora isso possa ocorrer. Portanto, muitos desses agrotóxicos podem passar inalterados pelo sistema de tratamento ou reagir na etapa de cloração para gerar compostos que podem ser ainda mais tóxicos. É nesse aspecto em que o conhecimento ainda é bastante limitado. As legislações que tratam dos parâmetros de potabilidade de água não levam em consideração a formação dos subprodutos de desinfecção dos agrotóxicos e suas toxicidades. No Brasil a situação é ainda mais preocupante, uma vez que os limites estabelecidos são muito mais permissivos para os agrotóxicos quando comparado com países desenvolvidos e poucos são os princípios ativos contemplado na Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017.

Isto posto, é fundamental que se amplie o conhecimento a respeito dos DBPs formados pela cloração dos agrotóxicos, principalmente na identificação/elucidação de “novos” DBPs e na avaliação de toxicidade dos mesmos. Dessa forma, o objetivo principal do presente estudo foi avaliar degradação e a formação de DBPs a partir da cloração dos agrotóxicos fipronil, metribuzin e bentazone, amplamente utilizados no Brasil e no mundo, mas com pouco ou nenhum estudo relacionado a reatividade dos mesmos em sistemas de desinfecção por compostos de cloro ( $\text{NaOCl}$ ,  $\text{Ca(OCl)}_2$  e  $\text{Cl}_2$ ). Portanto, buscou-se o entendimento das estruturas formadas e das possíveis rotas de degradação, atrelado à avaliação do potencial tóxico das soluções resultantes da cloração desses compostos. Especificamente, os objetivos podem ser delineados da seguinte forma:

- Levantar informações sobre os agrotóxicos amplamente empregados no Brasil e no mundo e frequentemente detectados em amostras de água superficial e/ou subterrâneas.
- Definir, baseado, principalmente, na limitação de estudos na literatura, aqueles que serão alvo de avaliação quanto à degradação, formação de subprodutos de cloração e o potencial tóxico dos subprodutos de desinfecção;
- Realizar os ensaios de cloração dos compostos selecionados utilizando hipoclorito de sódio como agente químico de desinfecção.
- Identificar e elucidar os subprodutos formados pela cloração e propor as possíveis rotas de degradação dos agrotóxicos.
- Submeter as soluções pré e pós-cloração aos ensaios de toxicidade *in vitro*, *in vivo* e *in silico* para mensurar o potencial tóxico dos DBPs formados e comparar com o composto original.
- Tornar público, por meio de publicações em periódicos de impacto na área, os resultados obtidos nos ensaios dos agrotóxicos em questão, discutindo-se de forma abrangente a questão do controle da qualidade da água potável no Brasil e no mundo.



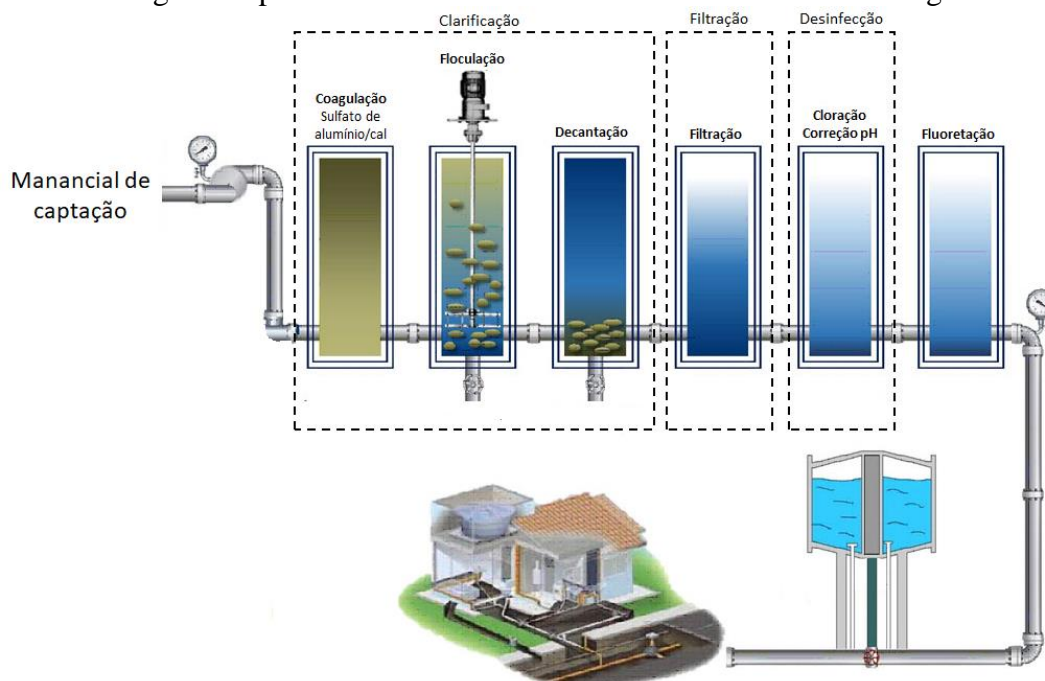
## ***CAPÍTULO 3. ASPECTOS GERAIS***

### 3.1. POTABILIZAÇÃO DAS ÁGUAS: UMA BREVE CONTEXTUALIZAÇÃO

A potabilização das águas naturais para o consumo humano tem como objetivo adequar os parâmetros físicos, químicos, biológicos e radiológicos da água bruta de acordo com a Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017, a qual, em seu capítulo V, seção II e anexo XX, discorre sobre a quantidade mínima e a frequência em que as amostras de água devem ser coletadas, bem como os parâmetros e limites permitidos para que o efluente da estação de tratamento seja seguro para a população abastecida (Brasil, 2017).

A tecnologia empregada na potabilização é dependente, dentre outros fatores, da qualidade do manancial utilizado para o abastecimento público. Dessa forma, o tipo de manancial, as características naturais da bacia, os parâmetros de qualidade da água bruta e o sistema de captação acabam definindo os níveis de tratamento necessários para a garantir a produção de água própria para consumo humano (Libânio, 2010). Apesar de existirem configurações mais simplificadas, atualmente a tecnologia mais difundida no Brasil e no mundo é denominada como tratamento convencional, a qual se baseia, a grosso modo, em 3 etapas: clarificação, filtração e desinfecção (Figura 3.1).

**Figura 3.1.** Fluxograma típico de um sistema convencional de tratamento de água.



Fonte: Adaptado da página do SAAE de São Carlos.  
Disponível em: <http://www.saaesaocarlos.com.br/joomla4/index.php/aguamenutop/etasmenu>.

Conforme observado na Figura 3.1, a etapa de clarificação engloba os processos de coagulação química, floculação e decantação/flotação. O uso de compostos como sulfato de alumínio ou de ferro associado a correção de pH com a utilização de cal, tem como finalidade a desestabilização de partículas coloidais e suspensas realizada por um conjunto de ações físicas e químicas. Em seguida, com a colisão das partículas desestabilizadas, garantida por agitação hidráulica ou mecânica, há a formação de aglomerados (flocos), os quais são removidos por decantação da água. Dessa forma, a etapa de clarificação presta-se, principalmente, para a remoção de sólidos suspensos e de uma parcela dos sólidos dissolvidos (matéria orgânica, por exemplo), de substâncias tóxicas de origem orgânica e inorgânica, e de microorganismos em geral (Libânio, 2010).

Na etapa de filtração ocorre a remoção de cor e partículas suspensas ainda dispersas no efluente da etapa de clarificação. Essa função é garantida por uma série de mecanismos tais como: coagem, sedimentação, interceptação, difusão, forças hidrodinâmicas, impacto inercial e interações químicas. O aumento na eficiência de remoção desses parâmetros garante melhor performance na inativação de microorganismos patogênicos na etapa de desinfecção e, ainda, reduz a presença de compostos precursores de subprodutos de desinfecção da matéria orgânica.

Por fim, e mais relevante dentro do contexto do presente estudo, tem-se o processo de desinfecção do efluente das etapas de clarificação e filtração. Os processos de desinfecção têm como principal objetivo a destruição ou inativação de organismos patogênicos ou indesejáveis. No entanto, os agentes oxidantes também objetivam a remoção de ferro e manganês, o controle de sabor, odor e cor na água pela oxidação de matéria orgânica presente, a oxidação de compostos orgânicos sintéticos específicos, controle de biofilmes nas unidades do sistema de distribuição, entre outros (Ferreira Filho e Sakaguti, 2006; Meyer, 1994). No processo de tratamento da água, a desinfecção pode ser realizada basicamente por dois grupos de desinfetantes: agentes químicos e físicos. Dentre os mais utilizados, podemos destacar os compostos de cloro (cloro, hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio), dióxido de cloro, permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio, ozônio, radiação ultravioleta (UV), entre outros (Ferreira Filho e Sakaguti, 2006).

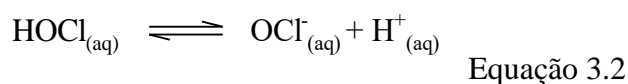
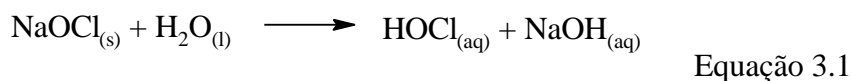
Historicamente, os compostos de cloro são, por uma série de critérios, os agentes desinfetantes mais empregados em ETAs em todo o planeta. Dentre as características que culminaram para a disseminação do cloro, pode-se destacar: alta solubilidade em água; eficiência elevada de inativação de microorganismos; ausência de toxicidade para seres humanos; em

dosagens usualmente aplicadas, não conferem cor, odor ou sabor à água; facilidade de transporte, manuseio, armazenamento e aplicação; custo consideravelmente baixo; e produz residuais estáveis que mantêm a água segura durante todo o processo de distribuição para os consumidores (Libânio, 2010). Em contrapartida, o uso da cloração nos processos de desinfecção leva a formação indesejável de DBPs pela reação do cloro livre com a matéria orgânica natural e com substâncias sintéticas oriundas de atividades antropogênicas. Essas questões serão abordadas em pormenores a posteriori, a fim de estabelecer uma base conceitual que sustente a necessidade de constantes estudos com relação a formação de subprodutos de agrotóxicos frente aos processos de cloração.

### **3.2. DESINFECÇÃO POR COMPOSTOS DE CLORO**

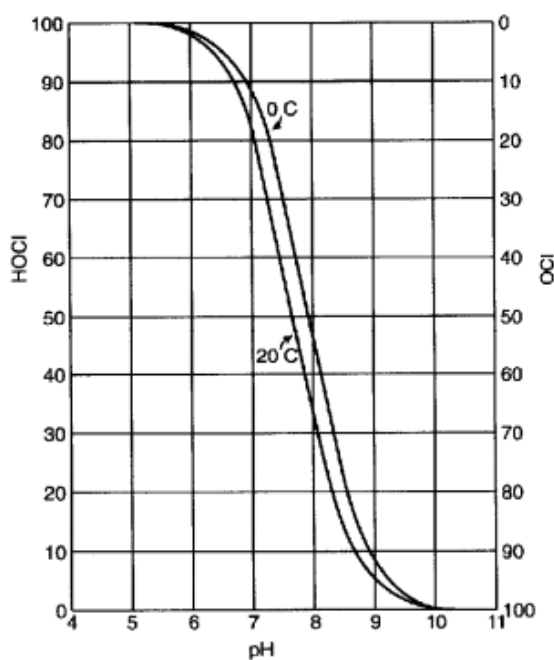
A desinfecção das águas foi um dos processos mais importantes para a melhoria da saúde pública em todo o mundo. A introdução do cloro como agente padrão para a potabilização de águas, inicialmente aplicado na forma de hipoclorito de sódio, garantiu uma grande queda na mortalidade por doenças infecciosas de veiculação hídrica, tais como disenteria, amebíase, giardíase, hepatite A, febre tifoide, entre outras (Latifoglu, 2003; McGuire, 2016; Meyer, 1994). Embora não completamente compreendido, o mecanismo do cloro na inativação e/ou destruição dos microrganismos é explicado pela quebra de estruturas proteicas, a inibição de atividades enzimáticas e a oxidação da parede celular (Latifoglu, 2003).

Os principais produtos comerciais para a desinfecção por compostos de cloro, são o cloro elementar ( $\text{Cl}_2$ ), hipoclorito de sódio ( $\text{NaOCl}$ ) e o hipoclorito de cálcio ( $\text{Ca(OCl)}_2$ ), todos amplamente empregados em sistemas de potabilização de água. Quando adicionado em meio aquoso, o cloro elementar ou os sais de cloro ( $\text{NaOCl}$  ou  $\text{CaOCl}$ ) formam ácido hipocloroso, o qual se dissocia em íon hipoclorito, conforme as Equações 3.1 e 3.2:



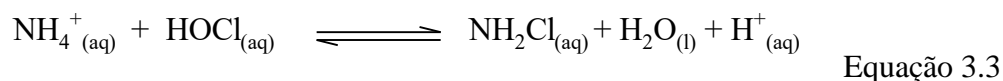
O somatório das concentrações de HOCl e OCl<sup>-</sup> denomina-se cloro residual livre e a prevalência de uma ou outra espécie depende do pH e da temperatura do meio (Figura 3.2). O HOCl é um ácido fraco com um pKa de aproximadamente 7,5, e, portanto, predominante em pH mais baixos. Isso é importante porque o HOCl é um desinfetante muito mais eficaz quando comparado com sua forma dissociada (Deborde e von Gunten, 2008; WHO, 2000).

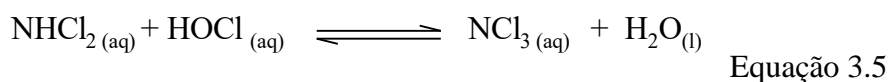
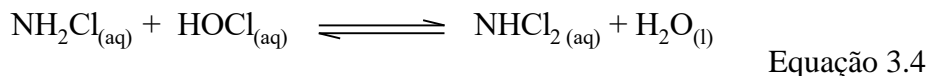
**Figura 3.2.** Distribuição do ácido hipocloroso e íon hipoclorito em água em diferentes valores de pH e temperatura.



Fonte: Lourenção, 2009

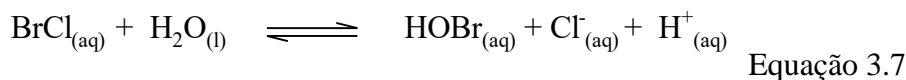
Em contato com amônia ou compostos amoniacais, onipresentes em mananciais, o ácido hipocloroso reage formando as cloraminas: monocloraminas, dicloraminas e tricloroaminas. A última espécie pode ser negligenciada em condições de pH empregadas nas estações de tratamento de água, haja vista que são predominantes em pH inferiores a 3 (Xu *et al.*, 2009). As Equações 3.3, 3.4 e 3.5 apresentam as reações de formação das cloroaminas.





As mono e as dicloroaminas são subprodutos de cloração com menor potencial oxidante e desinfetante que o ácido hipocloroso. As tricloroaminas, por sua vez, não possuem características desinfetantes.

Os íons brometo presentes na água também podem ser facilmente oxidados nos processos de cloração à ácido hipobromoso (HOBr), o qual é um oxidante mais forte que HOCl. Na reação, o  $\text{Cl}^+$  é transferido para o  $\text{Br}^-$ , resultando na formação do cloreto de bromo ( $\text{BrCl}$ ), o qual rapidamente hidrolisa em HOBr (Equações 3.6 e 3.7). Reações similares também ocorrem para íons iodeto, no entanto para a formação de um oxidante mais fraco que HOCl e HOBr.



Todas as espécies supracitadas efetivamente influenciam no processo de desinfecção da água e, por consequência dos seus potenciais de oxidação, na degradação da matéria orgânica natural e de possíveis microcontaminantes antropogênicos presentes. Muito embora bastante consolidado como agentes de desinfecção, o uso de cloro na potabilização de água esbarra na formação de subprodutos da degradação. Uma vez que a mineralização da matéria orgânica é dificilmente alcançada, esses oxidantes podem conduzir a formação de compostos comprovadamente e/ou potencialmente perigosos à saúde humana e ao meio ambiente (Augusto, 2010; Deborde e Gunten, 2008; Latifoglu, 2003; Yang *et al.*, 2012).

### **3.3. SUBPRODUTOS DE DESINFECÇÃO POR CLORAÇÃO: FORMAÇÃO, RISCO E REGULAMENTAÇÃO**

A preocupação com a formação DPBs deu-se no início dos anos 70, quando Rook (1974) e Bellar, Lichtenberg e Kroner (1974) relataram a presença de THMs e HAAs em águas cloradas.

Hrudey (2009), em seu estudo, conseguiu sintetizar, brilhantemente, a relevância dos trabalhos pioneiros na detecção dessas substâncias, afirmando que: “*as duas publicações (Rook, 1974; Bellar et al., 1974) mudaram para sempre a perspectiva anterior de que a segurança da água potável se referia apenas as doenças de veiculação hídrica*” (traduzido pelo autor).

A descoberta desses compostos somente aconteceu com a evolução das técnicas de cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (GC-ECD), permitindo a determinação com elevado poder de separação e sensibilidade (Augusto, 2010). Desde então, mais de 600 DBPs de compostos orgânicos e inorgânicos têm sido identificados, dentre os quais alguns considerados altamente tóxicos (Deborde e Gunten, 2008; Hua e Reckhow, 2008).

Devido ao elevado potencial oxidante do HOCl e sua estrutura química caracterizada pela polarização da ligação Cl – O ( $\text{Cl}^{\delta+} - \text{OH}^{\delta-}$ ), três tipos de reação com compostos orgânicos podem ser descritas: (i) reações de oxidação; (ii) reações de adição em ligações insaturadas; (iii) substituição eletrofílica em sítios nucleofílicos (Deborde e Gunten, 2008). Baseado na conhecida reatividade dos compostos de cloro com os principais grupos funcionais, foram definidos os principais sítios de reação, os quais podem ser ordenados de forma decrescente da seguinte forma: enxofre e fósforo > aminas primárias e secundárias > fenóis e aminas terciárias >> duplas ligações, outros aromáticos, carbonilas e amidas (Deborde e Gunten, 2008).

Sabe-se que todos esses mecanismos de reação, conjuntamente, são responsáveis pela formação dos DBPs, principalmente representados pelos THMs e HAAs, os quais são predominantemente formados a partir da cloração dos ácidos húmicos e fúlvicos. Estima-se que mais de 80% de toda a matéria orgânica natural dissolvida possa ser representada por essas espécies (Yano, 2007). Dentre as centenas de DPBs já identificados, podemos destacar os THMs, HAAs, haloacetoneitrilas (HANs) e os halogenetos de cianogênio como as substâncias mais relevantes quanto a frequência e a concentração em que são detectadas (Grünwald *et al.*, 2002). Algumas das principais espécies de DBPs são listadas na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Principais DBPs clorados.

Classe química	Composto	Fórmula química
Trihalometanos	Clorofórmio	$\text{CHCl}_3$
	Bromodiclorometano	$\text{CHBrCl}_2$
	Dibromoclorometano	$\text{CHBr}_2\text{Cl}$
	Bromofórmio	$\text{CHBr}_3$
Ácidos Haloacéticos	Ácido Monocloroacético	$\text{C}_2\text{H}_3\text{ClO}_2$

	Ácido Dicloroacético	$C_2H_2Cl_2O_2$
	Ácido Tricloroacético	$C_2HCl_3O_2$
	Ácido Monobromoacético	$C_2H_3BrO_2$
	Ácido Dibromoacético	$C_2H_2Br_2O_2$
	Ácido bromocloroacético	$C_2H_2BrClO_2$
	Ácido bromodicloroacético	$C_2HBrCl_2O_2$
	Ácido clorodibromoacético	$C_2HBr_2ClO_2$
Haloacetônitrilas	Dicloroacetônitrila	$C_2HCl_2N$
	Tricloroacetônitrila	$C_2Cl_3N$
	Dibromoacetônitrila	$C_2HBr_2N$
	Bromocloroacetônitrila	$C_2HBrClN$
Halogenetos de Cianogênio	Cloreto de cianogênio	CNCl

Fonte: Grünwald *et al.* (2002).

Além dos esforços dispendidos na identificação desses compostos gerados nos processos de desinfecção, diversos estudos têm sido desenvolvidos para a avaliação do potencial tóxico dos mesmos. Na mesma década em que foram constatados os primeiros DBPs, estudos revelaram indícios de toxicidade em ensaios envolvendo *Salmonella*. Segundo Loper (1980) os resultados dos testes biológicos indicaram um potencial mutagênico dos extratos orgânicos de amostras de água potável. Nas últimas décadas, vários estudos têm sugerido a alta probabilidade de desenvolvimento de câncer de fígado, bexiga, cólon e reto na exposição à algumas dessas substâncias (Abbas *et al.*, 2015; Komulainen, 2004; Lee *et al.*, 2004). Mais recentemente, Beane Freeman *et al.*, (2017), em um estudo de caso baseado em uma população de pacientes com câncer de bexiga entre 30 e 75 anos de idade, observaram uma associação moderada entre o desenvolvimento da doença e a ingestão oral de águas com altas concentrações de THMs.

Além disso, muitos ensaios biológicos *in vitro* para a avaliação de estrogenicidade, mutagenicidade, toxicidade aguda envolvendo *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*, inibição enzimática, entre outros, têm sido utilizados para mensurar o potencial tóxico dos mais diversos subprodutos clorados. Muitos compostos após o processo de cloração têm demonstrado em ensaios *in vitro* maior potencial tóxico que seus precursores (Bourgin *et al.*, 2013; Emin, Ozcan e Beduk, 2011; Kishida *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010; Onodera, Hirose e Ishikura, 1995; Tawk *et al.*, 2015).

O aumento da preocupação com os níveis desses compostos presentes em água converge com a crescente discussão no que diz respeito às legislações para padrões de potabilização em



inúmeros países. Nos Estados Unidos, a U.S.EPA estabeleceu que as concessionárias devem cumprir os níveis máximos dos THMs e HAAs em 80 e 60 µg/L, respectivamente (U.S.EPA, 2010). Os padrões de THMs fornecidos para outros países são: 100 µg/L para o Reino Unido e Irlanda, 10 µg/L para Alemanha e 1 µg/L para Holanda. No Brasil, a Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017, em seu anexo 7 do anexo XX, estabeleceu limites de 100 e 80 µg/L para os THMs e HAAs (Brasil, 2017).

Uma lista completa dos DBPs atualmente regulamentados em água potável e os limites promulgados para cada um deles pela Organização Mundial da Saúde (WHO), Agência de Proteção Ambiental dos EUA (U.S.EPA), Conselho da União Europeia (UE) e pela Portaria de Consolidação nº 5/2017 são apresentados na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2.** Limites (µg/L) para DBPs em água potável estabelecidos pela WHO (2011), U.S. EPA (2009), EU (1998) e Portaria de Consolidação nº 5/2017.

Composto	WHO	U.S. EPA	EU	Portaria nº 5/2017
Bromato	10	10	10	10
Bromodiclorometano	60	-	-	-
Bromofórmio	100	-	-	-
Clorato	700	-	-	-
Clorito	700	1000	-	1000
Clorofórmio	300	-	-	-
Dibromoclorometano	100	-	-	-
Dicloroacetato	50	-	-	-
Dicloroacetona	20	-	-	-
Ácidos haloacéticos <sup>a</sup>	-	60	-	80
Monocloroacetato	20	-	-	-
N-nitrosodimetilamina	0,1	-	-	-
Tricloroacetato	200	-	-	-
Trihalometanos totais <sup>b</sup>	-	80	100	100

<sup>a</sup>: Inclui a soma de ácido monocloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido monobromoacético e ácido dibromoacético; <sup>b</sup>: inclui a soma de bromodiclorometano, bromofórmio, clorofórmio e dibromoclorometano.

Fonte: Adaptado de (Brasil, 2017; Villanueva *et al.*, 2014)

Embora amplamente estudados, os DBPs identificados em água representam menos da metade da concentração total de organoclorados formados em processos de cloração, o que indica a necessidade de constantes pesquisas para identificação e avaliação de risco dessas substâncias. Uma vez que os THMs representam majoritariamente as concentrações de DBPs encontrados em águas tratadas, muitas substâncias têm sido negligenciadas tanto em estudos quanto no estabelecimento de padrões legais de potabilidade (Augusto, 2010). Tal realidade é devidamente representada pela presença de microcontaminantes de preocupação emergente como potenciais precursores de DBPs. Apesar de constantemente detectados em corpos hídricos, os compostos farmacêuticos ativos, desreguladores endócrinos, produtos de cuidado pessoal, agrotóxicos, entre outros, ainda precisam ser melhor avaliados quanto à formação de “novos” DBPs e, principalmente, quanto ao potencial tóxico dos subprodutos gerados. Ainda que detectados em níveis traço, não é razoável que se negligencie a contribuição individual e o efeito sinérgico desses contaminantes para a toxicidade da água tratada.

Esforços têm sido dispendidos na busca de compreender os processos de formação desses compostos e de identificar possíveis precursores presentes na água bruta que possam contribuir com o aumento do risco associado ao consumo humano. A ampliação do conhecimento na área tem direcionado a aplicação de estratégias que minimizem a formação desses compostos e a contínua reformulação nos parâmetros de segurança para a água potável.

### **3.4. AGROTÓXICOS**

#### **3.4.1. Contaminação de águas por agrotóxicos**

A presença de microcontaminantes orgânicos em águas superficiais e subterrâneas tem sido uma ameaça ao ambiente aquático e para o uso humano quando utilizadas para abastecimento público. A maioria desses compostos é proveniente de despejo de esgotos domésticos, efluentes industriais e de atividades agrícolas. Especificamente os agrotóxicos, oriundos da agricultura, do armazenamento de grãos, da proteção de pastagens, florestas e ambientes urbanos, assumem o

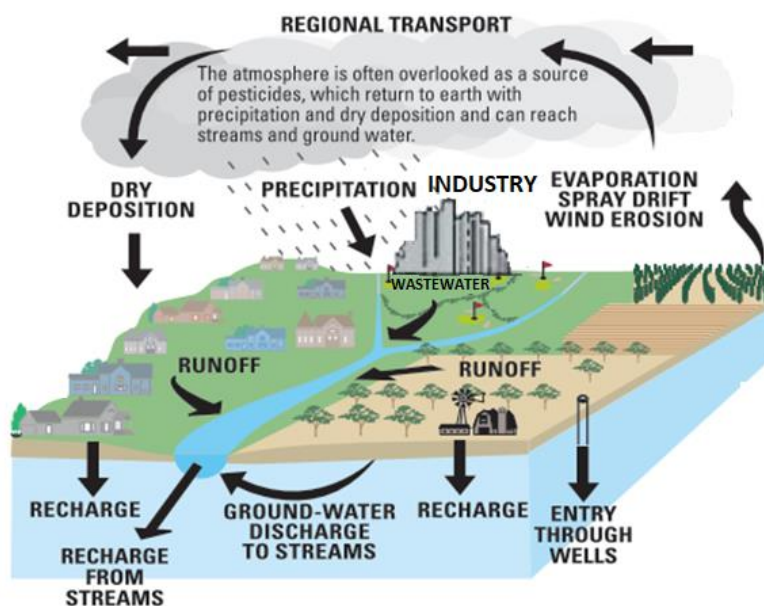
caráter destacado enquanto contaminantes, dada a intensidade e a forma indiscriminada em que são consumidos em todo o mundo.

Particularmente no Brasil, essa realidade é ainda mais impactante, haja vista que a produção de alimentos tornou-se vital para a economia nacional. Dessa forma, na tentativa de elevar, a qualquer custo, a produtividade das lavouras, o país tem ganhado destaque por ser o maior consumidor de agrotóxicos em todo o mundo (20% do total comercializado), mesmo não possuindo a maior área cultivada (Albuquerque *et al.*, 2016; Bombardi, 2017). Existem 130 empresas localizadas no Brasil produzindo 2400 produtos comerciais a base de 381 ingredientes ativos autorizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), juntamente com o Instituto Nacional de Meio Ambiente (Ibama) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Albuquerque *et al.*, 2016). É importante ressaltar que alguns desses compostos autorizados no Brasil já são considerados perigosos ao meio ambiente e/ou a saúde humana e, por conseguinte, proibidos em diversos países desenvolvidos (Bombardi, 2017).

Uma vez caracterizada a utilização indiscriminada dos agrotóxicos nas lavouras, faz-se necessária uma maior atenção para a possibilidade da presença desses compostos em recursos hídricos. A contaminação dos corpos d'água por agrotóxicos é dada, principalmente, pelo escoamento superficial da água de chuva, sendo o montante transportado para águas superficiais dependente de fatores com a topografia, natureza do solo, a solubilidade em água, a resistência à degradação de cada composto e a forma como são conduzidas as práticas agrícolas (Claver *et al.*, 2006; Konstantinou, Hela e Albanis, 2006). Além disso, águas subterrâneas, que a princípio parecem livres de contaminação, podem também conter concentrações na ordem de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dessas substâncias que, em alguns casos, são persistentes e lixiviáveis. A contaminação de fontes subterrâneas também está fortemente relacionada com conexão hidrogeológica entre superfície e poço, a condição do aquífero, as propriedades do sedimento e características do relevo (Malaguerra *et al.*, 2012).

Outras formas de contaminação de corpos d'água podem ocorrer por meio de acidentes no transporte do produto, pelo destino inadequado de embalagens usadas e pela emissão inadequada de efluentes líquidos oriundos da produção industrial desses insumos (Malaguerra *et al.*, 2012). A Figura 3.3 apresenta, de forma simplificada, a dinâmica de contaminação dos corpos hídricos pelas diversas fontes de poluição.

**Figura 3.3.** Dinâmica da contaminação de recursos hídricos por agrotóxicos.

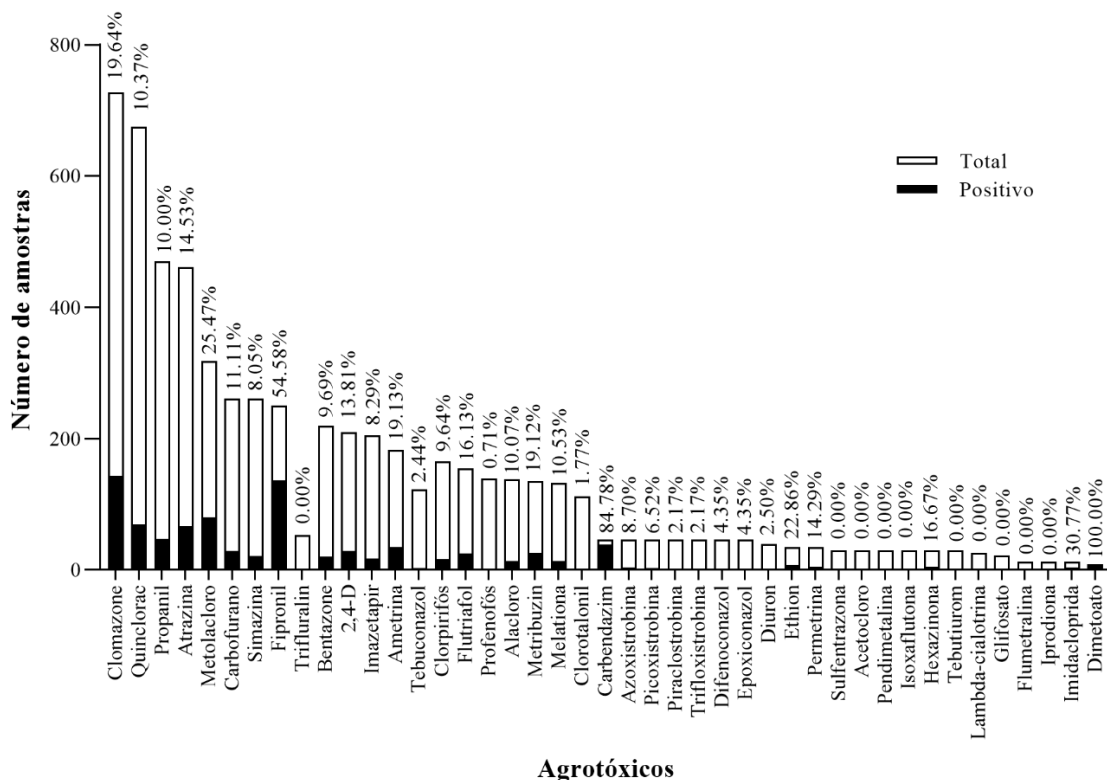


Fonte: Adaptado de Gilliom *et al.*, (2006).

Em estudo recente, Albuquerque *et al.*, 2016 fez uma revisão da literatura sobre a presença de agrotóxicos em água doce no Brasil. Apesar da escassez de estudos de ocorrência e da concentração desses dados em poucos estados brasileiros, a compilação dos resultados foi substancial para que se obtivesse um retrato dessa problemática no país. O levantamento permitiu que fossem identificados os agrotóxicos mais avaliados em águas superficiais e as frequências em que foram quantificados, conforme Figura 3.4.

Os resultados apresentados por Albuquerque *et al.* (2016) foram usados para auxiliar na definição dos agrotóxicos do presente estudo. No entanto, a ausência de estudos relacionados à cloração e a toxicidade de subprodutos formados foi fator determinante para a escolha dos compostos, além de ausência de legislação que regulem a presença desses compostos em águas de abastecimento.

**Figura 3.4.** Total de amostras analisadas (□) e amostras com agrotóxicos em concentrações acima do limite de quantificação do método analítico empregado (■).



Fonte: Adaptado de Albuquerque *et al.*, (2016).

### 3.4.2. Contribuição dos agrotóxicos na produção de DBPs e no risco associado ao consumo de água potável

Os agrotóxicos, por serem comumente detectados em fontes de água superficiais e subterrâneas, tornaram-se alvo de avaliações em sistemas de desinfecção. Classes de agrotóxicos como carbamatos, organoclorados, organofosforados, pirazóis, piretróides, entre outros, têm demonstrado de moderada a alta reatividade ao cloro livre e, portanto, podem representar possíveis precursores de DBPs (Chamberlain *et al.*, 2012). Em estudo recente, detectou-se altas concentrações de *N*-nitrosodimetilamina (NDMA), altamente carcinogênica, em água potável

resultante da reação de oxidação do fungicida nitrogenado tolilfluanida, amplamente utilizado na Europa (Richardson e Kimura, 2016).

Apesar dos avanços nas pesquisas envolvendo a formação de DBPs, muitos agrotóxicos ainda precisam ser avaliados quanto a formação de subprodutos nos processos de cloração, principalmente no que diz respeito a avaliação de toxicidade dos mesmos. Os estudos recentes têm voltado as atenções para a formação de subprodutos de processos de desinfecção alternativos utilizando ozônio, radiação UV, dióxido de cloro, entre outros (Chamberlain *et al.*, 2012; Javier Benitez, Acero e Real, 2002; Li, Qu e Liu, 2007; Tian *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2016). As avaliações de toxicidade tem consistindo, basicamente, da avaliação de toxicidade aguda por *Vibrio fischeri* e *Daphnia magna* e na mutagênicidade por testes Ames (Kishida *et al.*, 2010; Tawk *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2014).

Muito embora seja extremamente relevante a avaliação de processos alternativos de desinfecção, é necessário que se aprofunde o conhecimento na formação de subprodutos de agrotóxicos na cloração, uma vez que tal processo representa a ampla maioria das tecnologias empregadas na desinfecção em tratamento de água em todo mundo e, ainda mais expressiva, no Brasil e em países em desenvolvimento. A Tabela 3.3 apresenta, resumidamente, os estudos envolvendo a cloração de agrotóxicos e os testes de toxicidade aplicados nos trabalhos encontrados na literatura.

**Tabela 3.3.** Revisão da literatura sobre formação de subprodutos de desinfecção de agrotóxicos submetidos à processos de desinfecção por compostos de cloro e os respectivos ensaios biológicos utilizados para avaliação de toxicidade. **(início)**

Agrotóxicos	Composto de cloro	Cinética de Degradação	Identificação de subprodutos	Ensaio de Toxicidade	Referência Bibliográfica
<b>Fenitrotiona</b>	NaOCl	Não houve estudo de cinética.	3-metil-4-nitrofenol 4-nitrofenol 2-cloro-4-nitrofenol 2,6-dicloro-4-nitrofenol 2,4,6-triclorofenol	Mutagenicidade por teste Ames. Nenhum composto apresentou mutagenicidade, no entanto o 3-metil-4-nitrofenol apresentou potencial de formação de mutagênio superior ao composto precursor	(Kishida <i>et al.</i> , 2010)
<b>Glifosato e Glicina</b>	NaOCl	Avaliou-se a influência da concentração de cloro	Metanodiol (Formaldeído hidratado) Nitrato Ácido fosfórico Cloreto de Cianogênio Cianato (IV)	Não avaliado	(Brosillon <i>et al.</i> , 2006b)
<b>Bensulfurona-metil</b>	NaOCl	Avaliou-se a influência do pH, temperatura, dosagem de cloro, e a presença de bromo, amônia, concentração de cloro	Avaliou-se apenas os DBPs voláteis, dentre os quais foram detectados: Clorofórmio; Dicloroacetona; Tricloronitrometano; 1,1,1-tricloroacetona; Bromodichlorometano; Dibromoclorometano; Bromofórmio; Bromocloroacetona; Dibromoacetona	Não avaliado	(Hu, Cheng e Lin, 2015).

**Tabela 3.3.** Revisão da literatura sobre formação de subprodutos de desinfecção de agrotóxicos submetidos à processos de desinfecção por compostos de cloro e os respectivos ensaios biológicos utilizados para avaliação de toxicidade. (**continuação**)

Agrotóxicos	Composto de cloro	Cinética de Degradação	Identificação de subprodutos	Ensaio de Toxicidade	Referência Bibliográfica
<b>Clortolurona</b>	NaOCl	Avaliou-se a influência do pH, dosagem de cloro, e a presença de bromo, amônia, concentração de cloro	Foram encontrados diversos subprodutos da oxidação, substituição e hidroxilação do anel aromático e das cadeias laterais ureicas. Houve abertura de anel e a formação de seis DBPs voláteis: Clorofórmio; dicloronitrometano; dicloroacetonitrila; tricloronitrometano; 1,1-dicloropropano; 1,1,1-tricloropropanona.	Não avaliado	(Xu <i>et al.</i> , 2011b)
<b>Clorpirifós, clorfenvinfos e diazinona</b>	Cl <sub>2</sub>	Avaliou-se a influência do pH, dosagem de cloro e temperatura	Foram avaliados apenas os THMs regulamentados. Clorofórmio, bromodiclorometano e bromofórmio foram detectados.	Não avaliado	(Acero <i>et al.</i> , 2008)
<b>Tembotriona e sulcotriona</b>	NaOCl	Avaliou-se a influência do pH, dosagem de cloro e temperatura	Os agrotóxicos foram transformados rapidamente em clorofórmio, ácido glutárico e compostos clorofenólicos.	Teste com <i>Vibrio fischeri</i> . Os resultados sugerem maior toxicidade dos agrotóxicos pós processo de cloração.	(Tawk <i>et al.</i> , 2015)



**Tabela 3.3.** Revisão da literatura sobre formação de subprodutos de desinfecção de agrotóxicos submetidos à processos de desinfecção por compostos de cloro e os respectivos ensaios biológicos utilizados para avaliação de toxicidade. (**continuação**)

Agrotóxicos	Composto de cloro	Cinética de Degradação	Identificação de subprodutos	Ensaio de Toxicidade	Referência Bibliográfica
<b>Dinoseb</b>	NaOCl	Avaliou-se a influência do pH, dosagem de cloro e temperatura	A degradação se deu por meio de reações simultâneas de oxidação, substituição, hidroxilação ocorrem tanto no anel aromático do herbicida quanto nas cadeias laterais ureicas. Na fase final de cloração o anel aromático é quebrado, gerando seis DBPs nocivos, incluindo CF, monocloroacetona, TCNM, 1,1-dicloro-2-metil-butano, 1,2-dicloro-2-metano-butano e 1-cloro-3-metil-pentanona	Não avaliado	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
<b>Metribuzim</b>	NaOCl	Avaliou-se a influência da concentração de cloro livre, pH, concentração de íons brometo e $\text{NH}_4^+$ e temperatura.	Foram avaliados apenas os DBPs voláteis regulados, sendo detectada a formação de clorofórmio, cromofórmio, bromodiclorometano e dibromoclorometano.	Não avaliado	(Hu <i>et al.</i> , 2017).
<b>Prometrina, terbutrina, ametrina e desmetrina</b>	NaOCl	Não houve estudo de cinética.	Foram avaliados apenas os subprodutos da oxidação do enxofre, gerando seus respectivos derivados sulfóxido e sulfona. Após a oxidação completa do enxofre houve a substituição dos grupos sulfônicos por uma hidroxila.	Não avaliado	(Mascolo <i>et al.</i> , 1994)
<b>Clorpirifós, diazinona, malationa, tolclofós-metil</b>	NaOCl	Não houve estudo de cinética.	Foram determinados apenas os respectivos derivados OXON <sup>a</sup> dos agrotóxicos.	Não avaliado	(Li, W. <i>et al.</i> , 2016)

**Tabela 3.3.** Revisão da literatura sobre formação de subprodutos de desinfecção de agrotóxicos submetidos à processos de desinfecção por compostos de cloro e os respectivos ensaios biológicos utilizados para avaliação de toxicidade. (**continuação**)

Agrotóxicos	Composto de cloro	Cinética de Degradação	Identificação de subprodutos	Ensaio de Toxicidade	Referência Bibliográfica
<b>Dimetoato</b>	NaOCl	Avaliou-se concentração de cloro livre, pH, concentração de íons brometo e NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e concentração de ácidos húmicos.	Os subprodutos detectados por GC foram o Ácido fosforotioico, <i>N</i> -metil-2-(metiltio) acetamida e ometoato.	Teste com <i>Daphnia magna</i> . Os resultados indicaram para um aumento da toxicidade das soluções cloradas.	(Tian, F. <i>et al.</i> , 2014)
<b>Diuron e isoproturona</b>	NaOCl	Avaliou-se a concentração de cloro livre, pH, presença de íons brometo.	Foram determinados apenas THMs totais, representados por clorofórmio, diclorobromometano, dibromoclorometano, bromofórmio.	Não avaliado	(Acero <i>et al.</i> , 2007)
<b>Metiocarbe</b>	NaOCl	Avaliou-se a concentração de cloro livre e pH.	Foram identificados os subprodutos da oxidação do enxofre, formando os derivados sulfóxido e sulfona do metiocarbe. Além disso, em meio mais básico foi evidenciado a hidrólise do anel aromático formando metiocarbe fenol e metilcarbe sulfóxido fenol.	As toxicidades das soluções foram determinadas por índice de risco (RI), por meio de dados da literatura. Os subprodutos formados são mais tóxicos que o precursor.	(Tian <i>et al.</i> , 2013)
<b>Butamifós</b>	NaOCl	Não houve estudo de cinética.	Foram identificados os subprodutos 5-metil-2-nitrofenol, 4-cloro-5-metil-2-nitrofenol e 2-amimino-4-cloro-5-metilfenol e seus respectivos isômeros.	Mutagenicidade por teste Ames. Foi identificada atividade mutagênica para os subprodutos formados pela cloração.	(Kamoshita <i>et al.</i> , 2010)

**Tabela 3.3.** Revisão da literatura sobre formação de subprodutos de desinfecção de agrotóxicos submetidos à processos de desinfecção por compostos de cloro e os respectivos ensaios biológicos utilizados para avaliação de toxicidade. (**final**)

Agrotóxicos	Composto de cloro	Cinética de Degradação	Identificação de subprodutos	Ensaio de Toxicidade	Referência Bibliográfica
<b>Tefuiltriona e seu produto de degradação natural CMTBA</b>	NaOCl	Não houve estudo de cinética.	A tefuiltriona sob cloração gera o seu produto de degradação CMTBA majoritariamente, o qual por sua vez mostrou-se recalcitrante ao tratamento de cloração.	Não avaliado	(Kamata, Asami e Matsui, 2017)
<b>Fenitrotiona</b>	NaOCl	Não houve estudo de cinética.	Foram identificados os subprodutos da oxidação do fósforo e, ainda, os compostos, 3-metil-4-nitrofenol; 2-cloro-5-metil-4-nitrofenol; tricloro-3-metilfenol.	Mutagenicidade por teste Ames. Não houve atividade mutagênica dos subprodutos formados.	(KISHIDA <i>et al.</i> , 2010)

<sup>a</sup> derivado OXON: composto orgânico derivado de outro produto químico no qual uma ligação fósforo-enxofre no produto químico original é substituída por uma ligação fósforo-oxigênio.

### 3.4.3. Agrotóxicos selecionados

Para a seleção dos agrotóxicos foram levados em consideração os dados relacionados à presença dessas substâncias em águas superficiais e subterrâneas, a ausência ou limitação nos estudos de cloração, tanto na identificação de “novos” DBPs como na avaliação de toxicidade.

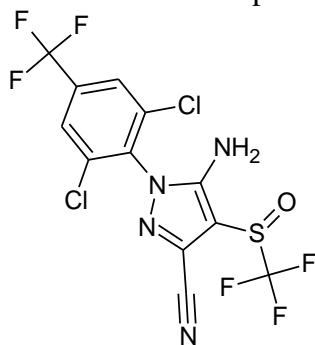
Destaca-se ainda que, para os objetivos do presente estudo, não foram considerados os dados de toxicidade dos princípios ativos, uma vez que o interesse é avaliar a toxicidade dos subprodutos de cloração que podem ser muito mais tóxicos que o composto precursor. Dessa forma, agrotóxicos que são considerados muito seguros e com poucos efeitos adversos conhecidos acabam não sendo incluídos na legislação vigente de controle de qualidade de água e possuem valores de ingestão diária aceitável (IDA) bastante permissivos, mas podem representar riscos, ainda que desconhecidos, após a etapa de cloração. A solubilidade em água das substâncias escolhidas também foi um fator importante devido ao design dos experimentos propostos nesse estudo.

Dessa forma, optou-se pela avaliação do fipronil, metribuzim e bentazone, os quais tem características desejáveis que serão discutidas na sequência.

#### (a) Fipronil

O fipronil (Figura 3.5), (5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(1R,S)-(trifluoromethyl)sulfinyl]-1H-pyrazole-3-carbonitrile), é um inseticida da classe dos fenilpirazóis de fórmula molecular  $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ , massa molar 437,15 g/mol e solubilidade em água de aproximadamente 2,0 mg/L (20°C)(Lilia, 2003).

**Figura 3.5.** Fórmula estrutural do inseticida fipronil.



Fonte: Lu *et al.*, 2015.

O princípio ativo é um inseticida de amplo espectro e baixa taxa de aplicação, que age como um potente disruptor do sistema nervoso central em insetos. O inseticida causa interferência na passagem dos íons cloreto através do canal do cloro regulado pelo ácido  $\gamma$ -aminobutírico (canal GABA), resultando na atividade descontrolada do sistema nervoso central, seguido da morte do inseto. Embora o canal GABA seja importante na transmissão nervosa em animais vertebrados e invertebrados, a ligação do fipronil é menos estável nos vertebrados, o que oferece um grau de seletividade (Lilia, 2003). Sua alta eficiência no combate a pragas de sucção e mastigação faz com que o inseticida seja amplamente usado para o controle de muitas espécies de solo e insetos foliares em várias culturas (Li, M. *et al.*, 2015). Além disso, esse inseticida é potente ingrediente ativo contra uma diversidade de pragas urbanas, tais como: baratas, mosquitos, formigas, pulgas e carrapatos, expandindo a sua utilização em ambientes domésticos, inclusive para o controle de pragas em pets (Poppenga e Oehme, 2010).

Dessa forma, fipronil e seus metabólitos fipronil sulfeto, fipronil sulfona e, principalmente, fipronil desulfinil estão sendo frequentemente detectados em corpos d'água em áreas rurais e urbanas, em água potável e até em esgotos domésticos. O fipronil e seus metabólitos foram detectados no Rio Mermentau (Louisiana, EUA) em concentrações de 0,01 a 10  $\mu\text{g/L}$  (Gilliom *et al.*, 2006). Kurz *et al.*, (2013) detectaram os metabólitos fipronil-desulfinil, fipronil-sulfona e fipronil-sulfeto em águas superficiais de campos de arroz inundados em concentração máxima de 6,9; 0,5 e 0,2  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. De acordo com Wu *et al.*, (2015), fipronil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto foram detectados em ambiente aquático localizado em paisagem residencial (Flórida, EUA) com concentrações variando de 0,5 a 207,3; 0,46 a 57,75; e 0,40-26,92  $\text{ng/L}$ , respectivamente. Em análise de 109 amostras lodos de esgotos nos EUA entre 2001 e 2016, o fipronil e seu principal metabólito aeróbio, fipronil sulfona, foram detectados de forma ubíqua em concentrações que variaram de 0.04 a 191.8  $\mu\text{g/kg}$  e 0.1 a 208.6  $\mu\text{g/kg}$ , respectivamente. Fipronil sulfeto, metabolite anaeróbico, também foi detectado em 90% das amostras (0.9 a 149.2  $\mu\text{g/kg}$ ) (Sadaria *et al.*, 2019). Em estudo de revisão descrito por Albuquerque *et al.*, (2016), fipronil foi identificado como o inseticida mais frequentemente detectado em amostras de água doce no Brasil, com frequência de 54% do total de 251 amostras analisadas.

Embora assumam um importante papel nas práticas agrícolas, a contaminação de corpos d'água pelo fipronil tem se tornado uma preocupação devido a sua elevada toxicidade a organismos

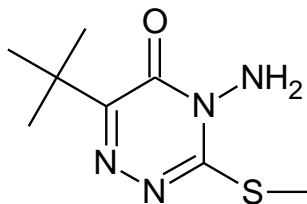
não alvo, tais como peixes, pássaros e invertebrados aquáticos. Além disso, seus produtos de degradação via redução ou oxidação biológica podem apresentar toxicidade superior à algumas espécies (Al-Badran *et al.*, 2018; Lilia, 2003; Supowit *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2014). Considerando a toxicidade dos seus metabólitos, o uso desse inseticida tem sido restrito ou mesmo proibido em alguns países como os EUA, França e Uruguai (Li, M. *et al.*, 2015), mas, no Brasil, o princípio ativo ainda é comercializado e utilizado de forma irrestrita.

Apesar de amplamente estudado em sistemas de desinfecção por processos alternativos como fotólise (Goff *et al.*, 2017; Mianjy e Niknafs, 2013; Raveton *et al.*, 2006), fotocatalise (Gomes Júnior *et al.*, 2017) e ozonização (Anandan e Wu, 2015), poucos estudos foram encontrados relacionados a cloração do fipronil. Chamberlain *et al.*, (2010) avaliaram a cinética de degradação do inseticida em sistemas de tratamento de água e, embora altamente reativo com cloro, não foram identificados subprodutos de degradação. Em outro trabalho, Chamberlain *et al.*, (2012) avaliaram a degradação do fipronil em diversos agentes oxidantes, inclusive cloro livre, e observaram alta reatividade frente aos processos de cloração. No entanto, não foram feitos estudos de elucidação de subprodutos e avaliação de toxicidade dos mesmos.

(b) *Metribuzin*

O metribuzim (Figura 3.6), 4-amino-6-tert-butyl-4,5-dihydro-3-methylthio-1,2,4-triazin-5-one, é um herbicida do grupo químico das triazinonas, de fórmula molecular  $C_8H_{14}N_4OS$ , massa molar 214,29 g/mol e solubilidade em água de aproximadamente 1,05 g/L (20°C)(Plhalova *et al.*, 2012).

**Figura 3.6.** Fórmula estrutural do herbicida metribuzin.



Fonte: adaptado de Khoury, Coste e Kawar (2006).

O metribuzin é usado com um herbicida pré ou pós-emergência para o controle de gramíneas e ervas daninhas de folhas largas. Atua como inibidor da fotossíntese, bloqueando o transporte de elétrons na reação Hill do fotossistema. A absorção do agrotóxico pela planta se dá principalmente pelas raízes, mas também pelas folhas e é translocado para o xilema (Štěpánova *et al.*, 2012). Esse herbicida tem sido utilizado em culturas intensivas de vegetais, incluindo tomate e batata, além de culturas agrônômicas como cana-de-açúcar e outras (Xie *et al.*, 2017).

Metribuzin é considerado não tóxico ou levemente tóxico para espécies não alvo, como mamíferos, insetos, peixes, e invertebrados, e moderadamente tóxico para espécies aviárias. De acordo com a EPA, metribuzin não demonstrou causar efeitos mutagênicos, carcinogênicos ou no desenvolvimento de animais e humanos (EPA, 1998, 2003).

Devido à sua eficiência herbicida e sua relativa baixa toxicidade, o metribuzin tornou-se um agrotóxico amplamente empregado em todo o mundo, principalmente em culturas de soja, cana de açúcar, tomates, cenouras, uvas, entre outras (Honório *et al.*, 2013; Travlos *et al.*, 2017). Como consequência, este herbicida começou a ser frequentemente detectado em diferentes compartimentos aquáticos a níveis de concentração até 25 µg/L (Antonopoulou e Konstantinou, 2014). O metribuzin é altamente susceptível ao escoamento superficial e à lixiviação para corpos d'água superficiais e subterrâneo devido às suas propriedades físicas e químicas, como: altamente solúvel em água (1,05 g/L a 20 °C); K<sub>oc</sub> = 41; pressão de vapor = 1,3 mPa; tempo de meia vida no solo = 30 dias (Antonopoulou e Konstantinou, 2014; Fairchild e Sappington, 2002; Štěpánova *et al.*, 2012).

No Brasil, a contaminação de águas superficiais e subterrâneas por metribuzin tem sido associada à regiões produtoras de soja, milho e algodão (Albuquerque *et al.*, 2016). Em um estudo de monitoramento na Região de Primavera do Leste (centro oeste do Brasil), o metribuzin foi o herbicida mais frequentemente detectado (48%) em concentrações que chegaram a 351 ng/L. As análises foram feitas em diferentes fontes de água, tais como: poços de água potável, represa, poços de irrigação, rio entre outros (Dores *et al.*, 2006). Em um estudo de revisão sobre a presença de microcontaminantes orgânicos em matrizes aquosas no Brasil, o metribuzin foi um dos compostos identificados entre aqueles com as maiores concentrações detectadas em amostras de água subterrânea (Montagner, Vidal e Acayaba, 2017).

Embora presentes em corpos d'água, foram encontrados poucos trabalhos de elucidação de subprodutos do metribuzin em processos de desinfecção por ozonização (Honório *et al.*, 2013),

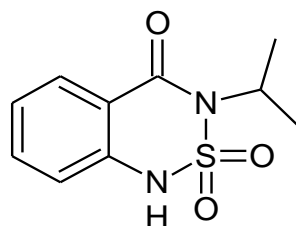
fotólise (Raschke, U *et al.* 1998a,b) e fotocatalise (Antonopoulou e Konstantinou, 2014). Estudos de toxicidade utilizando bactérias bioluminescentes (Microtox Model 500 Toxicity Analyzer) demonstraram que os subprodutos da fotocatalise, formados após 120 min de exposição à radiação, apresentaram maior toxicidade que o herbicida incólume (Antonopoulou e Konstantinou, 2014).

Muito recentemente, foi publicado o primeiro trabalho de cloração do metribuzin que demonstrou que o herbicida é altamente reativo ao cloro livre. Segundo Hu *et al.*, (2017), a velocidade de degradação do metribuzin é aumentada em pH ácido, com a concentração de brometo e com a temperatura, e diminuída com a concentração de amônia. Além disso, Hu *et al.*, (2017) avaliaram a presença de alguns DBPs halogenados descritos nos métodos EPA 551 A e EPA 551 B. Não há na literatura nenhum estudo sobre a formação de novos DBPs e a possível rota de degradação do metribuzin pela cloração. Ademais, não foram encontrados dados a respeito da toxicidade desse herbicida após tratamento com compostos de cloro.

### c) Bentazone

Bentazone, 3-isopropyl-(1H)-2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)- one-2,2-dioxide] [3-isopropyl-(1H)-2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)- one-2,2-dioxide, é um agrotóxico pertencente ao grupo de tiadiazinas que é amplamente empregado como herbicida em áreas agrícolas. Bentazone é um exemplo de herbicida de contato pós-emergência utilizado, principalmente, no combate de ervas daninhas de folhas largas e junco, este uma espécie semelhante as gramíneas que crescem predominantemente em áreas alagadiças. Bentazone possui fórmula química  $C_{10}H_{12}N_2O_3S$ , massa molecular de 240,28 g/mol, e solubilidade em água de 500 mg/L (pH 7 e 20 °C). Sua fórmula estrutural está representada na Figura 3.7 (Pergal *et al.*, 2020; Peschka *et al.*, 2007).

**Figura 3.7.** Fórmula estrutural do herbicida bentazone.



Fonte: Adaptado de Peschka *et al.*, (2007).



Com relação a sua toxicidade, o bentazone é classificado com levemente a moderadamente tóxico para diversas espécies. No entanto, a sua classificação vem sendo rediscutida nos últimos anos, uma vez que ela não é sustentada pelos estudos de toxicidade envolvendo esse princípio ativo. Tanto a exposição aguda quanto subcrônica a esse herbicida pode causar sérias alterações no sangue, tais como: a redução drástica de hematócrito e hemoglobina; perda na capacidade de coagulação; e perda de sangue no trato intestinal. Em estudos de toxicidade subcrônica envolvendo cachorros, o bentazone provocou alta perda de peso, diarreia, aparição de sangue fresco nas fezes, entre outros efeitos adversos. Além disso, uma inspeção histológica nos animais mostrou infiltração gordurosa no coração, congestão necrótica do fígado, e inchaço albuminoso dos rins. Bentazone não apresentou efeitos estrogênicos, androgênicos, mutagênicos, carcinogênicos ou neurotóxicos (European Food Safety Authority, 2015).

Parâmetros de reprodutividade e fertilidade também não foram alterados pela administração desse herbicida. Já com relação à toxicidade de desenvolvimento, efeitos como o aumento da perda pós-implantação do embrião, número reduzido de fetos vivos e retardo no desenvolvimento fetal foram observados na ausência clara de toxicidade materna, o que o levou a ser classificado como “suspeito de causar danos ao feto”. Baseado nos efeitos relacionados aos sérios riscos ao sangue, a dose aceitável diária (ADI) de bentazone foi estipulada em 0.09 mg/kg/dia. Os estudos de toxicidade demonstraram que os metabólitos desse herbicida são menos tóxicos do ponto de vista de exposição aguda e de alterações no desenvolvimento de embriões. Bentazone demonstrou baixo risco para organismos aquáticos, aves, e outras espécies (European Food Safety Authority, 2015).

Devido à sua alta solubilidade em água e baixa adsorção em solos ( $K_{oc} = 35$ ), o bentazone e seus principais metabólitos (6-hidroxibentazone e 8-hidroxibentazone), têm sido frequentemente detectados em águas superficiais e subterrâneas em concentrações acima do limite Europeu para água potável (Pergal *et al.*, 2020). De acordo com Tornquist *et al.*, (2007) (*apud* Bach *et al.*, 2010), bentazone foi detectado em águas superficiais na Suécia com frequência de 30%, classificando esse herbicida como a substância mais frequentemente detectada em cursos d'água entre aquelas contempladas nesse estudo. Entre outros agrotóxicos, o bentazone foi um dos principais contaminantes nas águas do estuário do rio Ebro (Espanha), com concentrações máxima detectada em torno de 3 µg/L (Barceló *et al.*, 1996). Em estudos mais recentes, Bentazone foi detectado em concentrações máximas de 300 ng/L em amostras de água superficial na Alemanha (Bach *et al.*,

2010). Uma pesquisa entre sistemas hidráulicos na Alemanha, em 2006, classificou a bentazone como o número três dos agrotóxicos mais relevantes (depois do diuron e do isoproturon), causando problemas no abastecimento de água potável (Bach *et al.*, 2010). Em estudo desenvolvido por Ricart *et al.*, (2010), bentazone foi detectado em amostras de água e sedimento do rio Llobregat, uma das principais fontes de água potável de Barcelona. Concentrações de bentazone na ordem de ng/L foram também detectados em águas superficiais, de torneira e engarrafadas em amostras coletadas no Vietnã (Wan *et al.*, 2021).

Em um estudo de revisão sobre agrotóxicos em fontes de água doce no Brasil, bentazone foi apontado como um dos princípios ativos detectados em águas superficiais, com frequência de detecção de aproximadamente 10% das amostras analisadas. A presença desse herbicida foi relacionada à sua utilização em campos alagados de produção de arroz (Albuquerque *et al.*, 2016). Embora amplamente empregado nas culturas brasileiras como soja, arroz, amendoim, entre outros, os estudos de monitoramento desse agrotóxico no Brasil são muito limitados.

Conforme anteriormente mencionado, o bentazone tornou-se uma preocupação quando relacionado a sua presença em sistemas de abastecimento de água potável. Diversos estudos discutem a sua degradação por meio de processos oxidativos com utilização de dióxido de cloro ou por processos de fotólise, fotocatalise, fotofenton, fotoeletroquímicos, entre outros (Bessegato, Santos e Lindino, 2012; Pergal *et al.*, 2020; Peschka *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2019). Não há estudos na literatura referentes à degradação e à formação de subprodutos do bentazone em processos de cloração.

#### **3.4.4. Métodos analíticos para a determinação dos DBPs de agrotóxicos**

O avanço científico na descoberta de novos DBPs se dá pela constante evolução das técnicas analíticas nas últimas décadas, viabilizando, portanto, a detecção de uma grande variedade de contaminantes de diferentes características físico-químicas em níveis de concentração cada vez mais baixos. Os primeiros estudos de DBPs voláteis em amostras de água potável foram garantidos pela evolução das técnicas de GC-ECD, as quais garantiam elevado poder de separação e sensibilidade aos contaminantes orgânicos apolares/lipofílicos voláteis e semivoláteis (Augusto, 2010). Dessa forma, muitos compostos de mais alto peso molecular e polares não eram detectados dada a predominância de métodos baseados em cromatografia gasosa.

Com a mais recente “explosão” das técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), compostos não voláteis, altamente polares, hidrofílicos e termicamente lábeis começaram a ser mais facilmente detectados em amostras de água (Charrois, 2010). A técnica de espectrometria de massas para a detecção e identificação tem sido frequentemente empregada em conjunto com técnicas de cromatografia líquida e gasosa e procedimentos de extração e pré-concentração das amostras. Alguns estudos têm reportado o uso de ressonância magnética nuclear (RMN) para a elucidação de compostos gerados na cloração de microcontaminantes (Richardson e Ternes, 2014).

As técnicas de extração e pré-concentração da amostra têm convergido para a utilização de extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME). Para a determinação de DBPs regulados, a utilização de éter metil-terc-butilico (MTBE) como solvente extrator e a posterior análise via cromatografia gasosa tem sido a metodologia mais empregada nos estudos encontrados na literatura (Li, W. *et al.*, 2016; Tian, F. *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2011b; Zhang *et al.*, 2013). A Tabela 3.4 apresenta resumidamente os métodos analíticos comumente utilizados para a determinação de DBPs formados por cloração de agrotóxicos.

**Tabela 3.4.** Revisão da literatura para metodologias analíticas aplicadas para a determinação de DBPs formados pela cloração de agrotóxicos (início).

Agrotóxicos	Agente de cloração	Agente de extinção da reação	Procedimento de extração/concentração	Técnica analíticas para quantificação ou identificação/elucidação dos DBPs	Referência
Diversos organofosforados	NaOCl	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (tiosulfato)	SPE Cartucho Exelpak GLF 500mg/8mL	GC-MS coluna C18 DB-1301 (30 m × 0,25 mm i.d; 0,25 μm)	(Magara <i>et al.</i> , 1994)
Ametrina	NaOCl puro e na presença de íons brometo e amônio	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (tiosulfato)	---	HPLC-UV (apenas DBPs marcados) Coluna VP ODS (150 mm × 4,6 mm)	(Xu <i>et al.</i> , 2009)
Metiocarbe	NaOCl	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (sulfito)	---	HPLC-DAD-MS Coluna Atlantis C18 (150 mm × 2,1 mm i.d., 3 μm)	(Tian <i>et al.</i> , 2013)
Clortolurão	NaOCl puro e na presença de íons amônio	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (tiosulfato)	LLE usando MTBE como solvente de extração	GC-MS e GC-ECD (voláteis) Coluna RTX-5MS (30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm)  UHPLC-ESI-MS (não voláteis) Coluna Thermos Hypersil GOLD C18 (100 mm × 2,1 mm i.d., 3μm,)	(Xu <i>et al.</i> , 2011a)
Hidrolisado do fenitrotona	NaOCl	Não utilizado	SPE Cartucho Sep-Pak Plus PSI CPS 800 e Cartucho Sep-Pak Plus PS II	HPLC-ESI-LQT/Orbitrap Coluna Shim Pak FC-ODS (150 mm × 4,6 mm i.d., 3 μm)	(Takanashi <i>et al.</i> , 2012)
14 organofosforados	NaOCl	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (sulfito)	SPE	GC-MS Coluna Restek Rtx-200 (30 m × 0,25 mm i.d., 0,5 μm)	(Duirk, Desetto e Davis, 2009)

**Tabela 3.4.** Revisão da literatura para metodologias analíticas aplicadas para a determinação de DBPs formados pela cloração de agrotóxicos (continuação).

Agrotóxicos	Agente de cloração	Agente de extinção da reação	Procedimento de extração/concentração	Técnica analíticas para quantificação ou identificação/elucidação dos DBPs	Referência
Butamifós	NaOCl	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (tiosulfato)	---	HPLC-DAD Coluna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm × 2,1 mm i.d.; 3,5 µm)  UHPLC-MS Coluna BEH C18 (150 mm × 2,1 mm i.d., 1,7 µm)	(Kamoshita <i>et al.</i> , 2010)
Tembotriona e sulcotriona	NaOCl	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (tiosulfato)	---	HPLC-ESI-HRMS (Q-Exactive Quadrupole-Orbitrap) coluna Kinetex C18 (100 × 3 mm, 2,6 µm)	(Tawk <i>et al.</i> , 2015)
Glifosato e Ampa	NaOCl	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (tiosulfato)	---	Cromatógrafo de íons Coluna IonPac AS19 (4 mm × 250 mm) (detecção apenas de íons cianeto, nitrato e fosfato)	(Brosillon <i>et al.</i> , 2006b)
Metribuzin	NaOCl puro e na presença de íons brometo e amônio.	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (tiosulfato)	LLE usando MTBE como solvente de extração	GC-ECD Coluna capilar RTX-5 (30 m × 0,25 mm i.d.; 0,25µm)	(Hu <i>et al.</i> , 2017)
Metiocarbe	NH <sub>2</sub> Cl	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (sulfito)	LLE usando MTBE como solvente de extração para as análises envolvendo cromatografia gasosa	GC-MS com derivatização da amostra com BSTFA Coluna HP-5 (30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 µm)  HPLC/DAD/MS Coluna Atlantis C18 (150 mm × 2,1 mm i.d., 3 mm)	(Qiang <i>et al.</i> , 2014)

**Tabela 3.4.** Revisão da literatura para metodologias analíticas aplicadas para a determinação de DBPs formados pela cloração de agrotóxicos (**continuação**).

Agrotóxicos	Agente de cloração	Agente de extinção da reação	Procedimento de extração/concentração	Técnica analíticas para quantificação ou identificação/elucidação dos DBPs	Referência
Dinoseb	NaOCl puro e na presença de íons amônio.	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (tiosulfato)	LLE usando MTBE como solvente de extração	GC-MS Coluna RTX-5MS (30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm)	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
				GC-ECD Coluna HP-5 (30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm)	
Isoproturona	NaOCl na presença de íons brometo	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (tiosulfato)	SPME Fibra de poliacrilato	GC-MS Coluna RTX-200 (60 m × 0,32 mm i.d., 0,25 μm)	(Lopez <i>et al.</i> , 2001)
Organofosforados	NaOCl	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (tiosulfato)	LLE usando MTBE como solvente de extração para as análises envolvendo cromatografia gasosa	GC-MS/MS Coluna HP-M5S (30 m × 0,25 mm i.d.; 0,25 μm) UHPLC-ESI-MS/MS Coluna Acquity UPLC BEH C8 (100 mm × 2,1 mm i.d.; 1,7 μm)	(Li, W. <i>et al.</i> , 2016)
Bromacil	NaOCl	Não utilizado	---	UHPLC-ESI-HRMS (Q/ToF) Coluna Acquity UPLC BEH C18 (100 mm × 2,1 mm i.d.; 1,7 μm)	(Ibáñez <i>et al.</i> , 2011)
Organofosforados	NaOCl	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (tiosulfato)	LLE usando cloreto de metileno como solvente de extração para as análises envolvendo cromatografia gasosa	CG-MS Coluna DB-5MS (60 m × 0,32 mm i.d.; 0,25 μm) UHPLC-ESI-MS/MS Coluna Acquity UPLC BEH C18 (100 mm × 2,1 mm i.d.; 1,7 μm)	(Kamel <i>et al.</i> , 2009)

**Tabela 3.4.** Revisão da literatura para metodologias analíticas aplicadas para a determinação de DBPs formados pela cloração de agrotóxicos (**final**).

Agrotóxicos	Agente de cloração	Agente de extinção da reação	Procedimento de extração/concentração	Técnica analíticas para quantificação ou identificação/elucidação dos DBPs	Referência
<b>Dimetoato</b>	NaOCl	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (sulfito)	SPE Cartucho Oasis HLB 500 mg/6 mL	GC-MS Coluna HP5 (30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm)	(Tian, F. <i>et al.</i> , 2014)
<b>Tefuriltriona</b>	NaOCl	Ácido ascórbico	---	Cromatógrafo de íons Coluna IonPac AS19 (4 mm × 250 mm) HPLC-ESI-HRMS (Q-Exactive Quadrupole-Orbitrap) Coluna Acclaim C18 (150 mm × 2.2 mm i.d., 2.6 μm)	(Kamata, Asami e Matsui, 2017)
<b>Clorpirifós</b>	NaOCl	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (sulfito)	SPE C18	CG-MS Coluna RTX-200 (30 m × 0,25 mm i.d., 0,5 μm)	(Duirk, Tarr e Collette, 2008)
<b>Organofosforados</b>	NaOCl	Não utilizado	SPE Cartucho Sep-Pak Plus CPS-800 Cartucho Sep-Pak Plus PS-2	GC-MS GC-HRMS Coluna DB-5MS (60 m × 0,32 mm i.d.; 0,25 μm)	(KISHIDA <i>et al.</i> , 2010)
<b>Glifosato e glicina</b>	NaOCl em solução de D <sub>2</sub> O	Não utilizado	---	RMN (padrões isotopicamente enriquecidos) HPLC-detector de fluxo radioativo Coluna Aminex 5A SCX (300 × 7.8 mm)	(Mehrsheikh <i>et al.</i> , 2006)
<b>Feniluréias</b>	NaOCl	Não utilizado	LLE com acetato de etila	HPLC-ESI-MS/MS	(Chusaksri <i>et al.</i> , 2012)
<b>Fipronil</b>	NaOCl NH <sub>2</sub> Cl	Não utilizado	---	HPLC-ESI-MS Coluna Synergi Fusion-RP 80 <sup>a</sup> (150 mm × 3 mm i.d.; 4 μm)	(Chamberlain <i>et al.</i> , 2010)

### 3.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS

À medida que a humanidade avança no sentido do aprimoramento da tecnologia, mais resíduos da atividade antropogênica são descartados no meio ambiente. As fontes de poluição pontuais (efluentes líquidos) e difusas (lixiviação de solos agrícolas, sedimentos contaminados, acidentes ambientais) têm contribuído significativamente para o desequilíbrio das comunidades de organismos aquáticos e/ou terrestres e para produção de efeitos adversos à saúde humana. Para mensurar tais contribuições, diversos ensaios biológicos têm sido desenvolvidos e empregados na avaliação do potencial tóxico de substâncias individualizadas ou de misturas complexas.

O primeiro grande impacto que impulsionou o desenvolvimento de testes biológicos cada vez mais representativos se deu após uma tragédia que causou a morte de pelo menos 73 pessoas nos EUA na década de 1970 pelo consumo do chamado “Elixir de Sulfalanamida” (Gray *et al.*, 1997; Krewski *et al.*, 2010). Tal fato tornou prioritária a avaliação sistemática de medicamentos, formulações de produtos de cuidado pessoal, próteses e materiais médicos, entre outros, para posterior liberação para o uso humano.

Desde então, os testes de toxicidade têm evoluído exponencialmente de forma a garantir a segurança da exposição humana à diversas substâncias químicas, extrapolando as suas aplicações inicialmente farmacêuticas e médicas. Atualmente, diversos estudos *in vivo* e/ou *in vitro* estão sendo desenvolvidos e empregados para a avaliação de toxicidade causada ao homem e à biota (ecotoxicologia) pela exposição a uma infinidade de substâncias químicas sintéticas e naturais, dentre as quais podemos destacar os microcontaminantes orgânicos de preocupação emergente.

Os ensaios *in vivo* correspondem a experimentação feita dentro ou no tecido de um grupo de animais vivos. Tais ensaios visam aferir anomalias e utilizam vários parâmetros conhecidos como avaliações finais (endpoints), que incluem pesagem e histologia de órgãos, identificação e quantificação de marcadores sanguíneos, atividade enzimática, crescimento e desenvolvimento dos indivíduos, aparecimento de anomalias, taxa de mortalidade e natalidade, entre outros. As vantagens da utilização de ensaios *in vivo* estão no fato de que se leva em consideração a absorção, distribuição, metabolismo e excreção do composto no organismo vivo, incorpora uma ampla faixa de mecanismos, podem ser aplicados em espécies que possuam maior similaridade com o homem e são mais eficientes na extrapolação dos resultados para a espécie humana. Por outro lado, os falsos negativos são um dos maiores e intransponíveis problemas nos testes em animais, uma vez



que a simples variação na espécie e no experimento pode produzir resultados diferentes. Um exemplo clássico é a talidomida: ratos são resistentes e os fetos humanos altamente sensíveis à exposição. Por fim, mas não menos importante, os testes *in vivo* esbarram na questão ética da utilização de animais na experimentação (Gray *et al.*, 1997; Krewski *et al.*, 2010).

Já os ensaios *in vitro* são baseados em experimentos realizados fora de um organismo vivo e envolvem normalmente a avaliação de células e tecidos específicos de acordo com o interesse do estudo. Esses testes são muito eficientes na avaliação de substâncias em concentrações muito baixas, são bastante específicos, possuem um custo reduzido, produzem respostas quase que instantaneamente, possuem ampla faixa dinâmica e podem ser utilizados em misturas complexas, avaliando, portanto, possíveis efeitos sinérgicos (Gray *et al.*, 1997). A desvantagem do uso desses testes é basicamente o fato de não levar em consideração o organismo vivo como uma unidade, desconsiderando os fatores de absorção, distribuição, metabolismo e excreção do composto. A extrapolação dos resultados negativos de toxicidade é certamente inviabilizada caso não haja testes *in vivo* a posteriori.

Mais especificamente, ensaios *in vitro* baseados em gene repórter tem sido amplamente utilizados em testes de toxicidade de diversas substâncias, incluindo misturas complexas de amostras ambientais. Tipicamente, um gene repórter é clonado com uma sequência de DNA de interesse em um vetor de expressão, o qual é então transferido para o hospedeiro (bactérias, fungos, algas e célula animal). Após a transferência, as células são analisadas quanto à presença do repórter, medindo-se diretamente a própria proteína repórter ou a atividade enzimática da mesma. Um bom gene repórter pode ser identificado facilmente e medido quantitativamente quando expresso no organismo ou células de interesse (Allard e Kopish, 2008; Khan, 2013).

Mais recentemente, os métodos de predição *in silico* tem ganhado popularidade nas pesquisas de avaliação de toxicidade. Essa nova estratégia baseia-se em simulações e predições computacionais da interação do composto com um organismo alvo. Para tal, vários procedimentos foram desenvolvidos para rastrear bibliotecas digitais com milhares e até milhões de moléculas e correlacioná-las, por meio de descritores, com a substância estudada. As previsões computacionais são, certamente, ferramentas importantes para o estudo de moléculas desconhecidas e suas vantagens estão no fato de serem metodologias muito rápidas, sem custo, robustas (produzem poucos falsos negativos) e aplicáveis a uma diversidade de modelos experimentais (peixes, crustáceos, mamíferos, etc). É importante destacar que, apesar de produzir interpretações teóricas

rigorosas, as predições computacionais devem ser encaradas como ferramentas alternativas e complementares aos ensaios biológicos *in vitro*, almejando minimizar, tanto quanto possível, a utilização de animais vivos como modelos experimentais nos casos em que a toxicidade for previamente evidenciada (Santos e Rodrigues, 2011; Shityakov, Salvador e Förster, 2013).

Dada a enorme variedade de ferramentas e abordagens disponíveis para a avaliação de toxicidade de substâncias e/ou misturas de substâncias, é importante que sejam definidos os testes que serão utilizados no presente estudo para uma avaliação preliminar da possível formação de DBPs mais tóxicos. O objetivo dos ensaios propostos é avaliar se há aumento ou redução da produção de efeitos tóxicos após o composto de interesse ser submetido à cloração. Para tal, foram estabelecidos os ensaios de toxicidade aguda por *A. Salina*, estrogênicidade por leveduras BLYES, viabilidade celular por MTT e aplicação de modelos computacionais para a predição de outros parâmetros de toxicidade.

### 3.5.1. Teste de toxicidade aguda por *Artemia salina*

Os testes padrão de toxicidade aguda com peixes e macroinvertebrados aquáticos tem desempenhado um papel importante nas avaliações de risco e perigo aquático, especialmente em um nível de triagem. No entanto, diversos procedimentos alternativos foram propostos para essa finalidade, dado à simplicidade experimental, baixo custo, sensibilidade, reprodutibilidade, facilidade de manuseio, e o curto tempo de exposição. Alguns desses testes de triagem alternativos incluem Microtox®, Politox®, alongamento de raiz de alfaca, e o uso de cistos de camarões de água doce (camarões rotíferos) e de salmoura (*Artêmia salina*). Esses testes rápidos tem como principal função rastrear de forma prática um grande número de amostras para indicações preliminares de toxicidade (Toussaint *et al.*, 1995).

A *A. salina* (Crustacea, Anostraca) é um microcrustáceo de água salgada rotineiramente empregado como organismo teste para estudos de ecotoxicidade. O ciclo de vida da *A. salina* inicia-se pela eclosão de cistos dormentes, os quais são embriões metabolicamente inativos. Esses cistos permanecem em estado latente por anos quando mantidos em ambiente sem humidade e, assim que entram em contato com água salgada, eles retomam o seu desenvolvimento (Benassi, 2004). Depois de aproximadamente 20 horas de imersão em solução salina, a membrana externa do cisto se rompe e o embrião aparece, ainda protegido por uma “capa” vazia. Em um curto período

de tempo, a membrana de eclosão é completamente rompida e emerge um náuplio com natação livre (primeiro estágio larval). Dentro das próximas 24 horas, as larvas se desenvolvem gerando uma segunda fase larval (náuplios II), na qual os pequenos crustáceos passam a se alimentar por meio de filtração de pequenas partículas de alimento (bactérias e detritos). Essa fase é ideal para a avaliação de toxicidade pela exposição aos compostos de interesse (Corrêa e Penafort, 2011).

Os primeiros bioensaios utilizando náuplios de *A. salina* como modelo em ensaios de toxicidade foram reportados por Meyer *et al.*, (1982) em um estudo envolvendo constituintes bioativos de extratos de plantas. Desde então, o ensaio passou a ser amplamente empregado em estudos envolvendo toxicidade de diversos tipos de amostras, tais com: formulações de agrotóxicos (Alyürük e Çavaş, 2013; Barahona e Sánchez-Fortún, 1999), resíduos líquidos de aterros sanitários (Svensson *et al.*, 2005), efluentes de tratamentos de resíduos industriais (Punzi *et al.*, 2015), extratos bioativos de plantas (Punzi *et al.*, 2015), entre outras.

A popularização do uso de *A. salina* para tais aplicações se dá pela facilidade de obtenção e manutenção dos cistos, os quais são obtidos em mercados de aquarismo, a tolerância a mudanças de temperatura e salinidade da água, ciclo de vida curto, fácil manuseio, não requer métodos assépticos nem equipamentos especiais, são requeridos pequenos volumes de amostra e possuem uma boa reprodutibilidade nos resultados (Rodrigues, 2013).

Apesar de seu uso em ecotoxicologia, estudos demonstram uma menor sensibilidade da *A. salina* para os ensaios de letalidade, quando comparada com outros organismos sob as mesmas condições experimentais, tais como testes com raízes de alface, rotíferos de água doce, *Daphnia magna* e ensaios microtóxicos (testes microbiológicos)(Toussaint *et al.*, 1995). Por outro lado, essa menor sensibilidade pode ser encarada como uma vantagem quando levamos em consideração a sua melhor adaptação a variações no sistema.

### **3.5.2. Viabilidade celular por ensaios colorimétricos**

O uso de células para bioensaios é uma ferramenta valiosa para a investigação de efeitos causados por substâncias sobre as culturas celulares, uma vez que a exposição é feita em células viáveis, possibilitando, portanto, a análise do metabolismo e comportamento celular pelo contato com o composto de interesse. A base desse tipo de ensaio está exatamente na avaliação da interferência induzida pelas substâncias testadas sobre o metabolismo celular e na investigação a

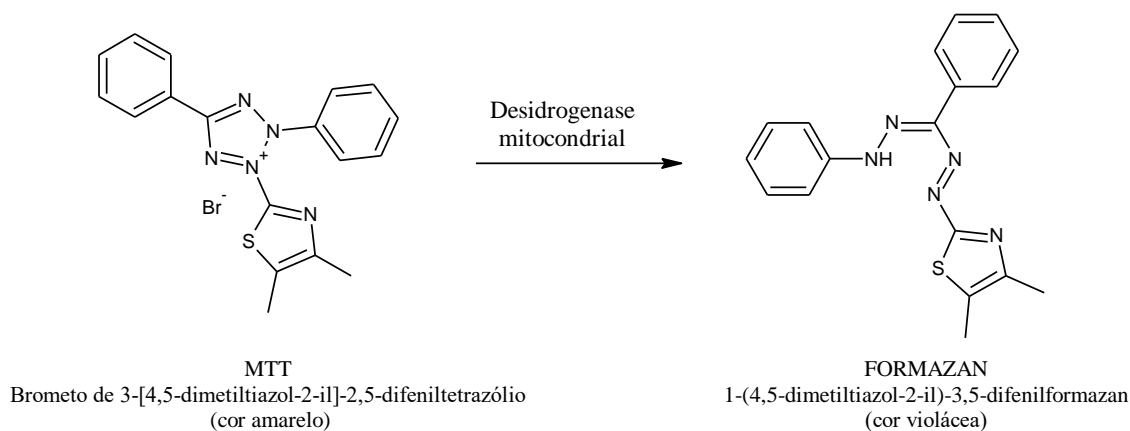
respeito da maneira como esses produtos podem interferir no crescimento, multiplicação, e até na possível morte celular, reduzindo, portanto, o número de células viáveis quando comparado a culturas controles não tratadas. Estes ensaios são muito simples, reprodutíveis e de baixo custo, o que os torna extensamente empregados nas mais diversas áreas (Franchi *et al.*, 2012).

Ao longo dos anos, os sais de tetrazólio têm sido incorporados em uma variedade de ensaios *in vitro*, os quais se baseiam na redução desses compostos por meio de atividade mitocondrial. De forma geral, os sais de tetrazólio são substâncias incolores ou levemente coloridas com alta solubilidade em água que, uma vez reduzidos por atividade enzimática, geram sais de formazan correspondentes, solúveis ou insolúveis no meio e de coloração intensa (Grela, Kozłowska e Grabowiecka, 2018).

Um dos experimentos mais comumente aplicados para a avaliação da viabilidade, proliferação ou ativação celular, dependendo do ponto de vista do investigador e da característica do estudo, são àqueles baseados na redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) por meio de reações bioquímicas (Grela, Kozłowska e Grabowiecka, 2018). O primeiro relato da utilização do MTT para estimar a viabilidade de células vivas foi escrito por Mosmann (1983) que, em seu trabalho, descreveu a possível avaliação da resposta de linhagens de células de mamíferos aos compostos citotóxicos.

O ensaio de MTT baseia-se na medida do dano induzido pela substância/mistura no metabolismo celular de glicídeos, usualmente por meio da avaliação da atividade das desidrogenases mitocondriais. As células vivas utilizam o MTT, um sal solúvel em água e de coloração amarela, como substrato e o reduz através da clivagem do anel, gerando o composto formazan (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan), um produto de cor violácea e insolúvel em água. Este sal, quando solubilizado em isopropanol ou dimetilsulfóxido, permite uma medida espectrofotométrica para a quantificação da viabilidade celular (Figura 3.8). A absorbância observada é diretamente proporcional a quantidade de células viáveis.

**Figura 3.8.** Estrutura do sal de MTT e seu respectivo sal formazan, o qual é formado pela redução do MTT via reações envolvendo atividade mitocondrial de células viáveis



Fonte: Adaptado de Grela, Kozłowska e Grabowiecka (2018).

É muito importante destacar que uma redução na viabilidade celular é muitas vezes referida como citotoxicidade. No entanto, ambos os conceitos não são necessariamente comutáveis, haja vista que diferentes mecanismos estão relacionados à redução da viabilidade, dentre os quais podemos citar: morte celular (citotoxicidade), inibição da proliferação celular (efeito citoestático), alteração da capacidade de adesão celular (efeito anti-adesivo), entre outros. Para a determinação do efeito citotóxico, deve-se utilizar técnicas bioquímicas e/ou morfológicas complementares que são descritas por Galluzzi *et al.* (2012, 2015). Uma redução de 30% na viabilidade celular com relação ao grupo controle não tratado, tem sido considerada como efeito adverso causado pela presença de substâncias tóxicas (Zegura et al 2009).

Estudos envolvendo à avaliação de viabilidade celular por exposição à fármacos, subprodutos de desinfecção de microcontaminantes orgânicos, águas superficiais e potável, e efluentes têm sido reportados na literatura (Souza, 2014; Žegura *et al.*, 2009).

### 3.5.3. Ensaio de estrogênicidade com levedura recombinante BLYES

Evidências sugerem que uma ampla variedade de compostos xenobióticos, tais como agrotóxicos, plastificantes, hormônios sintéticos, e compostos de ocorrência natural possuem atividades semelhantes aos esteroides que interferem no sistema endócrino em vertebrados. Em resposta à preocupação com a saúde pública, vários órgãos reguladores passaram a desenvolver

programas de avaliação do potencial de agrotóxicos e outras substâncias na indução de efeitos à saúde hormonal. Dessa forma, vários ensaios *in vivo* e *in vitro* foram desenvolvidos para avaliação dos efeitos estrogênicos (Zacharewski, 1997).

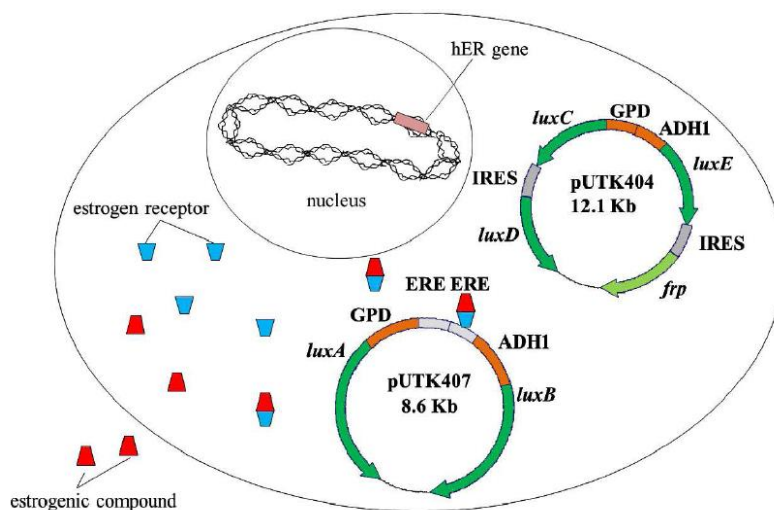
Dentre aqueles ensaios classificados como *in vitro*, existem diversas categorias, tais como: ensaios de ligação de ligantes competitivos, proliferação celular, indução de expressão proteica/atividade enzimática, e genes receptor/repórter recombinantes (Zacharewski, 1997). Os ensaios gene repórter com células de leveduras, método de interesse para o presente estudo, são comumente empregados para analisar a atividade estrogênica de uma enorme variedade de substâncias e amostras complexas através da interação com receptores de estrogênio humano ou de animais. As leveduras são modificadas inserindo-se vetores contendo sequências de DNA para receptores humanos de compostos que causam efeito estrogênico, juntamente com o gene repórter contendo elementos de resposta (Gray *et al.*, 1997). Diferentes métodos baseados na utilização de linhagens de leveduras foram propostos por diversos pesquisadores, destacando-se o ensaio colorimétrico YES (Yeast Estrogen Screen) criado por Routledge e Sumpter em 1996, pioneiros no desenvolvimento desse tipo de ensaio (Balsiger *et al.*, 2010; Huggett *et al.*, 2003; Zacharewski, 1997).

Mais recentemente, Sanseverino *et al.*, (2005) desenvolveu um novo teste de estrogenicidade baseado na utilização de uma nova linhagem de levedura recombinante chamada Bioluminescent Yeast Estrogen Screen (BLYES). O grande avanço com relação aos ensaios colorimétricos desenvolvidos anteriormente foi a utilização de um outro sistema repórter, construído em um plasmídeo contendo o aparato do gene *lux* de bactérias luminescentes. Tal modificação garantiu a emissão de luminescência sem a necessidade de um substrato no meio, obtendo resultados muito mais rápidos e sensíveis (Montagner, 2011).

A linhagem BLYES recebeu um plasmídeo contendo o gene receptor humano de estrogênio (hER) e outro contendo o aparato completo de produção de luz de bactérias luminescentes *Photobacterium luminescens* (genes *lux A*, -B, -C, -D, -E) e *Vibrio harveyi* (gene *frp*). A construção da linhagem BLYES incluiu a inserção de elementos de resposta ao estrogênio (ERE) em série entre os promotores de leveduras divergentes GPD (gliceraldeído-3-fosfodesidrogenase) e ADH1 (álcool desidrogenase I) que constitutivamente expressam *LuxA* e *LuxB*, gerando a enzima luciferase.

De forma bastante superficial, o mecanismo envolvido na produção de luminescência pela levedura se dá quando o composto estrogênico atravessa a membrana da célula e se liga à proteína do receptor de estrógeno humano (hER), cujo gene está localizado no cromossoma. O complexo formado se liga à elementos de resposta ao estrógeno (ERE) que estão entre os promotores de leveduras divergentes GPD e ADH1, que constitutivamente expressam *LuxA* e *LuxB*, gerando a enzima luciferase. Em um segundo plasmídeo, transformado com genes *LuxC*, *-D*, e *E* de *Photorhabdus luminescens* e gene da flavina oxirredutase (*frp*) de *Vibrio harveyi*, há a codificação do cofator FMNH<sub>2</sub> (flavina mononucleotídeo na forma reduzida). A luciferase produzida catalisa a reação de oxidação da FMNH<sub>2</sub> para FMN (flavina mononucleotídeo na forma oxidada), promovendo a bioluminescência (Figura 3.9).

**Figura 3.9.** Representação esquemática da linhagem *S. cerevisiae* BLYE, contendo receptor de estrógeno humano (hER), elementos de resposta a estrogênio (ERE), genes *luxA*, *-B*, *-C*, *-D* e *E* e gene *frp*.



Fonte: Sanseverino *et al.*, (2005).

De modo associativo aos ensaios BLYES, é necessário utilizar a linhagem de leveduras BLYR (constitutivamente luminescente), a qual produz luminescência de forma contínua e sem relação com a exposição aos estrógenos. O uso dessa levedura é destinado ao controle de toxicidade, haja vista que a redução em mais de 20% da luminescência emitida pela linhagem BLYR configura a existência de toxicidade das amostras para os ensaios BLYES. Uma vez tóxicas, as amostras devem ser diluídas até que não seja mais evidenciado tal efeito (Bergamasco, 2010).

As substâncias e/ou amostras ambientais avaliadas nos testes BLYES são quantificadas quanto a atividade estrogênica com base na curva padrão feita com o estrógeno 17 $\beta$ -Estradiol (controle positivo) e os resultados são expressos em concentração equivalente do mesmo (Bergamasco, 2010).

Muitos estudos têm sido aplicados utilizando diferentes ensaios *in vitro* para a avaliação de atividade estrogênica numa enorme variedade de amostras ambientais e/ou substâncias isoladas. Estudo realizado por Ruan *et al.*, (2015) demonstrou a atividade estrogênica considerável para todos os análogos de bisfenol e ainda avaliou a contribuição dos mesmos para a estrogenicidade em amostras de esgoto na China. Balázs *et al.*, (2016), por meio de ensaio BLYES, avaliaram protetores solares e detectaram a presença de atividades hormonais nos mesmos. Em estudo desenvolvido no Brasil, Bergamasco *et al.*, (2011) constataram atividade estrogênica em amostras de água superficial e potável no estado de São Paulo, também empregando ensaios BLYES.

Diversos estudos foram feitos com compostos estrogênicos após etapa de desinfecção por cloração e em todos eles foi observado a redução de atividade estrogênica após exposição prolongada ao cloro (Bila *et al.*, 2007; Hu, Xie e Aizawa, 2002; Lee, *et al.*, 2004). Em um estudo muito relevante para o nosso trabalho, Sanseverino *et al.*, (2009) avaliaram diversas substâncias químicas utilizando ensaio BLYES, incluindo agrotóxicos. Princípios ativos como diclorodifeniltricloroetano (DDT), diclorodifenildicloroetileno (DDE), fenitrotiona, fenarimol, procimidona apresentaram alguma atividade estrogênica.

Apesar da imensa quantidade de trabalhos produzidos nesse sentido, não foram encontrados estudos de avaliação de atividade estrogênica para a DBPs formados na cloração de agrotóxicos.

#### **3.5.4. Ensaio de toxicidade *in silico* por metodologia (Q)SAR**

A metodologia de toxicidade *in silico* é uma ciência na qual se aplicam modelos computacionais e matemáticos para a predição de efeitos adversos de uma dada substância e para o melhor entendimento dos mecanismos por meio dos quais ela provoca um dano. Em uma definição mais abrangente, podemos incluir a afirmativa de que são modelos de predição de exposição interna e externa, organização de dados toxicológicos e atribuição de peso às evidências de toxicidade (Santos e Rodrigues, 2011).



A modelagem *in silico* pode ser baseada em diferentes princípios metodológicos ou da combinação destes, tais como: Q(SAR) - Relação Quantitativa Estrutura-Atividade (em inglês (*Quantitative*) *Structure-Activity Relationships*); formação de categoria; análise de tendência; métodos de extrapolação; etc. Essas abordagens são aplicadas em softwares de diversas agências como a U.S.EPA, OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) e Comissão Européia (Santos e Rodrigues, 2011).

As previsões de toxicidade (Q)SAR são amplamente empregadas e podem ser muito úteis para rastrear compostos não testados, visando estabelecer prioridades para futuros bioensaios tradicionais, os quais são mais caros, demorados e que envolvem questões éticas quanto à aplicação. A maioria das técnicas (Q)SAR são baseadas no uso de descritores moleculares, os quais são séries numéricas que codificam informações químicas úteis e permitem correlações entre as propriedades estatísticas e biológicas (Santana *et al.*, 2006).

Várias abordagens de predição por meio da metodologia (Q)SAR podem ser aplicadas, dentre as quais podemos citar: agrupamento hierárquico, modelo simples, contribuição por grupo, método Food and Drug Administration (FDA), vizinho próximo, modo de ação e consenso. O uso de cada abordagem de predição vai da escolha do pesquisador de acordo com a sua experiência, com a substância de interesse e com a informação que se deseja obter. Destaca-se que cada uma das abordagens supracitadas possuem vantagens e desvantagens específicas, as quais podem ser compreendidas no Guia do Usuário para T.E.S.T versão 4.2 (Toxicity Estimation Software Tool) disponibilizado pela U.S.EPA (Martin, 2016).

Existe um consenso de que os modelos *in silico* precisam ser válidos ou validados caso forem utilizados na avaliação regulatória de produtos químicos e, de acordo com a OECD (OECD, 2007), os princípios para a validação dos métodos (Q)SAR devem estar associados com as seguintes informações:

1. definição dos “endpoints”,
2. um algoritmo inequívoco,
3. um domínio definido de aplicabilidade,
4. medidas apropriadas de adequação, robustez e previsibilidade,
5. uma previsão mecanicista, se possível.

Para manter as aplicações de (Q)SAR em uma fundação científica sólida, existe um grande esforço internacional para articular os princípios para o desenvolvimento e atualização de tecnologias e para a disponibilização de documentos de orientação para a utilização nos mais diversos meios (OECD, 2007). O desenvolvimento dessas ferramentas envolve fatores científicos, econômicos e sociais que unem governos, academia e indústrias em prol do aprimoramento constante das ferramentas baseadas nos métodos (Q)SAR.

Diversos estudos têm utilizado essas metodologias computacionais para prever efeitos tóxicos e ecotóxicos para diversas classes de compostos químicos, tais como fármacos, produtos de cuidado pessoal, agrotóxicos, subprodutos de desinfecção, entre outros contaminantes ambientais importantes. Ortiz de García *et al.*, (2013) utilizaram de ferramentas (Q)SAR para fazer um ranking de preocupação, baseado em índices ambientais, de 96 produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais amplamente utilizados e detectados em ambientes aquáticos na Espanha.

Petrescu e Ilia (2016) avaliaram o potencial carcinogênico e toxicidade em mamíferos para agrotóxicos tiofosfonatos, baseado nos modelos (Q)SAR. Em estudo recente, Li *et al.* (2016) avaliaram a genotoxicidade de diversos subprodutos voláteis da desinfecção de matéria orgânica natural por meio da aplicação de modelos (Q)SAR. Dentre as substâncias analisados, um total de 58 DBPs foram considerados genotóxicos reais ou potenciais e a formação desses compostos se deu em diferentes procedimentos de desinfecção, tais como ozonização, cloração e cloraminação.

Em outro trabalho, também muito recente, Wang *et al.*, (2018) determinaram a toxicidade dos subprodutos da ozonização da oxcarbedazina, um droga antiepiléptica potente e amplamente utilizada nos últimos anos. A avaliação, usando a ferramenta T.E.S.T (Toxicity Estimation Software Tool) da U.S.EPA, sugeriu que a maioria dos subprodutos identificados era provavelmente mais tóxica do que o composto precursor.

Apesar do crescimento e da aceitação do emprego dessas abordagens computacionais para a avaliação de toxicidade de DBPs, as técnicas (Q)SAR ainda continuam subutilizadas nessa área (Li *et al.*, 2016). Não foram encontrados trabalhos envolvendo a cloração de agrotóxicos, seguido da avaliação de toxicidade por meio das ferramentas discutidas anteriormente. Faz-se necessário, portanto, uma melhor investigação no que diz respeito ao potencial tóxicos de DBPs derivados de processos de desinfecção por cloração de agrotóxicos e, certamente, o uso de predições computacionais se torna uma alternativa estratégica para tal.

### 3.6. BIBLIOGRAFIA

ABBAS, S. *et al.* Monitoring of chlorination disinfection by-products and their associated health risks in drinking water of Pakistan. **Journal of Water and Health**, v. 13, n. 1, p. 270–284, 2015.

ACERO, J. L. *et al.* Kinetics of reactions between chlorine or bromine and the herbicides diuron and isoproturon. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 2, p. 214–222, fev. 2007.

ACERO, J. L. *et al.* Chlorination of organophosphorus pesticides in natural waters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, n. 1–2, p. 320–328, 2008.

AL-BADRAN, A. A. *et al.* Lethal and sub-lethal effects of the insecticide fipronil on juvenile brown shrimp *Farfantepenaeus aztecus*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 28–31, 2018.

ALBUQUERQUE, A. F. *et al.* Pesticides in Brazilian freshwaters: A critical review. **Environmental Science: Processes and Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779–787, 2016.

ALLARD, S. T. M.; KOPISH, K. Luciferase Reporter Assays : Powerful , Adaptable Tools for Cell Biology Research. **Cell Notes**, n. 21, p. 23–26, 2008.

ALYÜRÜK, H.; ÇAVAŞ, L. Toxicities of diuron and irgarol on the hatchability and early stage development of *Artemia salina*. **Turkish Journal of Biology**, v. 37, n. 2, p. 151–157, 2013.

ANANDAN, S.; WU, J. J. Effective Degradation of Fipronil Using Combined Catalytic Ozonation Processes. **Ozone: Science and Engineering**, v. 37, n. 2, p. 186–190, 2015.

ANTONOPOULOU, M.; KONSTANTINOY, I. Photocatalytic treatment of metribuzin herbicide over TiO<sub>2</sub> aqueous suspensions: Removal efficiency, identification of transformation products, reaction pathways and ecotoxicity evaluation. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 294, p. 110–120, nov. 2014.

AUGUSTO, F. Sub-produtos de desinfecção de águas potáveis : antigos e novos desafios. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 59–69, 2010.

BACH, M. *et al.* Measurement and modeling of bentazone in the river Main (Germany) originating from point and non-point sources. **Water Research**, v. 44, n. 12, p. 3725–3733, 2010.

BALÁZS, A. *et al.* Hormonal activity, cytotoxicity and developmental toxicity of UV filters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 131, p. 45–53, 2016.

BALSIGER, H. A. *et al.* A four-hour yeast bioassay for the direct measure of estrogenic

activity in wastewater without sample extraction, concentration, or sterilization. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 6, p. 1422–1429, 2010.

BARAHONA, M. V.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Environmental Pollution**, v. 104, n. 3, p. 469–476, 1999.

BARCELÓ, D. *et al.* Monitoring Pesticides and Metabolites in Surface Water and Groundwater in Spain. **ACS Symposium Series**, v. 630, p. 237–253, 1996.

BEANE FREEMAN, L. E. *et al.* Bladder cancer and water disinfection by-product exposures through multiple routes: A population-based case–control study (New England, USA). **Environmental Health Perspectives**, v. 125, n. 6, p. 1–9, 2017.

BELLAR, T.; LICHTENBERG, J.; KRONER, R. C. The occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters. **Journal of American Water Works Association**, v. 66, n. 12, p. 703–706, 1974.

BENASSI, J. C. **O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluente de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana**. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

BERGAMASCO, A. M. *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, n. 11, p. 3288–3293, 2011.

BERGAMASCO, A. M. D. D. **Emprego de bioensaios para avaliação da atividade estrogênica em água para consumo humano e mananciais do Estado de São Paulo**. 2010. 125 f. Dissertação (Mestrado em toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmaceuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BESSEGATO, G. G.; SANTOS, V. P.; LINDINO, C. A. Degradação fotoeletroquímica do herbicida bentazona sobre eletrodos de carbono modificados por TiO<sub>2</sub>. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 332–336, 2012.

BILA, D. *et al.* Estrogenic activity removal of 17 $\beta$ -estradiol by ozonation and identification of by-products. **Chemosphere**, v. 69, n. 5, p. 736–746, 2007.

BOMBARDI, L. M. **Atlas: Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Européia**. 1. ed. São Paulo: FFLCH- USP, 2017.

BOURGIN, M. *et al.* Chlorination of bisphenol A: Non-targeted screening for the identification of transformation products and assessment of estrogenicity in generated water. **Chemosphere**, v. 93, n. 11, p. 2814–2822, 2013.

BRASIL. **Portaria de Consolidação N° 5/2017, Anexo XX. Procedimentos do controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.** Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: <  
<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/MatrizesConsolidacao/Matriz-5-Programas.html> >

BROSILLON, S. *et al.* Chlorination kinetics of glyphosate and its by-products: Modeling approach. **Water Research**, v. 40, n. 11, p. 2113–2124, 2006.

CHAMBERLAIN, E. *et al.* Comprehensive screening study of pesticide degradation via oxidation and hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 354–363, 2012.

CHAMBERLAIN, E. F. *et al.* Oxidative removal and kinetics of fipronil in various oxidation systems for drinking water treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6895–6899, 2010.

CHARROIS, J. W. A. Analysis of Emerging Disinfection By-Products in Drinking Water. *In: Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010. p. 1–16.

CHUSAKSRI, S. *et al.* Reactions of phenylurea compounds with aqueous chlorine: Implications for herbicide transformation during drinking water disinfection. **Journal of Hazardous Materials**, v. 209–210, p. 484–491, mar. 2012.

CLAVER, A. *et al.* Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). **Chemosphere**, v. 64, n. 9, p. 1437–1443, 2006.

CORRÊA, J. M.; PENAFORT, J. M. Considerações sobre biologia e utilização de *Artemia* sp. (CRUSTACEA: BRANCHIOPODA: ANOSTRACA). **Revista eletrônica de veterinária**, v. 12, n. 12, p. 1–11, 2011.

DEBORDE, M.; GUNTEN, U. VON. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment—Kinetics and mechanisms: A critical review. **Water Research**, v. 42, n. 1–2, p. 13–51, jan. 2008.

DORES, E. F. G. C. *et al.* Multiresidue determination of herbicides in environmental

waters from Primavera do Leste Region (Middle West of Brazil) by SPE-GC-NPD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 5, p. 866–873, out. 2006.

DUIRK, S. E.; DESETTO, L. M.; DAVIS, G. M. Transformation of organophosphorus pesticides in the presence of aqueous chlorine: Kinetics, pathways, and structure - Activity relationships. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 2335–2340, 2009.

DUIRK, S. E.; TARR, J. C.; COLLETTE, T. W. Chlorpyrifos transformation by aqueous chlorine in the presence of bromide and natural organic matter. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1328–1335, 2008.

EMIN, M.; OZCAN, S.; BEDUK, F. Acute Toxicity of Organophosphorus Pesticides and Their Degredation By-Products to *Daphnia Magna*, *Lepidium Sativum* and *Vibrio Fischeri*. **Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure**, n. 2006, 2011.

EPA. R.E.D Facts Metribuzin. **Prevention, Pesticides and Toxic Substances**, p. 1–7, 1998.

\_\_\_\_. Health effects support document for Metribuzin. **EPA 822-R-03-005, Office of Water, Health and Ecological Criteria Division, Washington, DC.**, p. Available online at <http://www.epa.gov/safewater/>, 2003.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance bentazone. **EFSA Journal**, v. 13, n. 4, 2015.

FAIRCHILD, J. F.; SAPPINGTON, L. C. Fate and effects of the triazinone herbicide metribuzin in experimental pond mesocosms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, n. 2, p. 198–202, 2002.

FERREIRA FILHO, S. S.; SAKAGUTI, M. K Inetic Behavior of Free Chlorine in the Liquid Phase and Disinfection By - Product ( Dbp ) Formation. **Engenharia Sanit Ambiental**, v. 13, n. 2, p. 198–206, 2006.

FRANCHI, L. P. *et al.* Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbon. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 571–580, 2012.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2012.

\_\_\_\_. Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 1, p. 58–73, 2015.

GILLIOM, R. J. *et al.* **The Quality of Our Nation's Water - Pesticides in the Nation's Streams and Groundwater, 1992–2001**. Virgínia: U.S. Geological Survey Circular, 2006.

GOFF, A. D. *et al.* The effects of fipronil and the photodegradation product fipronil desulfinyl on growth and gene expression in juvenile blue crabs, *Callinectes sapidus*, at different salinities. **Aquatic Toxicology**, v. 186, p. 96–104, 2017.

GOMES JÚNIOR, O. *et al.* Optimization of fipronil degradation by heterogeneous photocatalysis: Identification of transformation products and toxicity assessment. **Water Research**, v. 110, p. 133–140, mar. 2017.

GRAY, E. L. *et al.* Endocrine Screening Methods Workshop report: Detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. **Reproductive Toxicology**, v. 11, n. 5, p. 719–750, 1997.

GRELA, E.; KOZŁOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 4, p. 303–311, maio 2018.

GRÜNWARD, A. *et al.* Formation of Haloforms during Chlorination of Natural Waters. **Acta Polytechnica**, v. 42, n. 2, p. 56–59, 2002.

HONÓRIO, M. O. *et al.* Removal of Metribuzin by Ozonation: Effect of Initial Concentration and pH. **Journal of Environmental Protection**, v. 04, n. 06, p. 564–569, 2013.

HRUDEY, S. E. Chlorination disinfection by-products, public health risk tradeoffs and me. **Water Research**, v. 43, n. 8, p. 2057–2092, 2009.

HU, C.; CHENG, M.; LIN, Y. Chlorination of bensulfuron-methyl : Kinetics , reaction factors and disinfection by-product formation. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 53, p. 46–51, 2015.

HU, C. Y. *et al.* Degradation kinetics and DBP formation during chlorination of metribuzin, **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 80, p. 255-261, 2017.

HU, J. Y.; XIE, G. H.; AIZAWA, T. Products of aqueous chlorination of 4-nonylphenol and their estrogenic activity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 10, p. 2034–2039, 2002.

HUA, G.; RECKHOW, D. A. DBP formation during chlorination and chloramination: Effect of reation time, pH, dosage, and temperature. **Journal (American Water Works Association)**, v. 100, n. 8, p. 82–95, 2008.

HUGGETT, D. B. *et al.* Comparison of in vitro and in vivo bioassays for estrogenicity in

effluent from North American municipal wastewater facilities. **Toxicological Sciences**, v. 72, n. 1, p. 77–83, 2003.

IBÁÑEZ, M. *et al.* Use of quadrupole time-of-flight mass spectrometry to determine proposed structures of transformation products of the herbicide bromacil after water chlorination. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, n. 20, p. 3103–3113, 2011.

JAVIER BENITEZ, F.; ACERO, J. L.; REAL, F. J. Degradation of carbofuran by using ozone, UV radiation and advanced oxidation processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 89, n. 1, p. 51–65, 2002.

KAMATA, M.; ASAMI, M.; MATSUI, Y. Presence of the B-triketone herbicide tefuryltrione in drinking water sources and its degradation product in drinking waters. **Chemosphere**, v. 178, p. 333–339, 2017.

KAMEL, A. *et al.* Oxidation of selected organophosphate pesticides during chlorination of simulated drinking water. **Water research**, v. 43, n. 2, p. 522–534, 2009.

KAMOSHITA, M. *et al.* Mutagenic activities of a chlorination by-product of butamifos, its structural isomer, and their related compounds. **Chemosphere**, v. 78, n. 4, p. 482–487, 2010.

KHAN, K. H. Gene expression in mammalian cells and its applications. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, n. 2, p. 257–263, 2013.

KHOURY, R.; COSTE, C. M.; KAWAR, N. S. Degradation of metribuzin in two soil types of Lebanon. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 41, n. 6, p. 795–806, 2006.

KISHIDA, M. *et al.* Chlorination by-products of fenitrothion. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 85–91, 2010.

KISHIDA, M. *et al.* Production of Trichloromethylphenol from Organophosphorus Pesticide Fenitrothion by Chlorination. **Journal of Water and Environment Technology**, v. 8, n. 3, p. 185–191, 2010.

KOMULAINEN, H. Experimental cancer studies of chlorinated by-products. **Toxicology**, v. 198, n. 1–3, p. 239–248, 2004.

KONSTANTINOOU, I. K.; HELA, D. G.; ALBANIS, T. A. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. **Environmental Pollution**, v. 141, n. 3, p. 555–570, 2006.

KREWSKI, D. *et al.* Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy.



**Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 13, n. 2–4, p. 51–138, 17 jun. 2010.

KURZ, M. H. S. *et al.* Development of a fast method for the determination of the insecticide fipronil and its metabolites in environmental waters by SPE and GC-ECD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 4, p. 631–638, 2013.

LATIFOGLU, A. Formation of Trihalomethanes by the Disinfection of Drinking Water. **Indoor and Built Environment**, v. 12, n. 6, p. 413–417, 2003.

LEE, B.-C. *et al.* Effects of chlorine on the decrease of estrogenic chemicals. **Water Research**, v. 38, n. 3, p. 733–739, fev. 2004.

LEE, S. C. *et al.* Multipathway risk assessment on disinfection by-products of drinking water in Hong Kong. **Environmental Research**, v. 94, n. 1, p. 47–56, 2004.

LI, C. *et al.* Identifying unknown by-products in drinking water using comprehensive two-dimensional gas chromatography–quadrupole mass spectrometry and in silico toxicity assessment. **Chemosphere**, v. 163, p. 535–543, nov. 2016.

LI, H. YAN; QU, J. HUI; LIU, H. JUAN. Decomposition of alachlor by ozonation and its mechanism. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, n. 7, p. 769–775, 2007.

LI, M. *et al.* Determination and dissipation of fipronil and its metabolites in peanut and soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 18, p. 4435–4443, 2015.

LI, W. *et al.* Impact of prechlorination on organophosphorus pesticides during drinking water treatment: Removal and transformation to toxic oxon byproducts. **Water Research**, v. 105, p. 1–10, 2016.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de Qualidade e Tratamento de Água**. 3ª ed. Campinas, SP: 2010, 2010.

LILIA, A. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. New York, NY: Springer New York, 2003. v. 176

LOPER, J. C. Mutagenic effects of organic compounds in drinking water. **Mutation research**, v. 76, p. 241–268, 1980.

LOPEZ, A. *et al.* Formation of volatile halogenated by-products during chlorination of isoproturon aqueous solutions. **Chemosphere**, v. 45, p. 269–274, 2001.

LOURENÇÃO, J. **Avaliação da Resistência de Microrganismos Patogênicos à Desinfecção Sequencial com Ozônio-Radiação Ultravioleta e Cloro-Radiação ultravioleta**.

2009. 162 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Sanitária) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

LU, M. *et al.* Endocrine disrupting potential of fipronil and its metabolite in reporter gene assays. **Chemosphere**, v. 120, p. 246–251, fev. 2015.

MAGARA, Y. *et al.* Degradation of pesticides by chlorination during water purification. **Water, Science and Technology**, v. 30, n. 7, p. 119-128, 1994.

MALAGUERRA, F. *et al.* Pesticides in water supply wells in Zealand, Denmark: A statistical analysis. **Science of the Total Environment**, v. 414, p. 433–444, 2012.

MARTIN, T. **User's Guide for T.E.S.T. (version 4.2)** United States Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio: 2016. Disponível em: <<https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test%0AUser's>>

MASCOLO, G. *et al.* DEGRADATION OF SULPHUR CONTAINING S-TRIAZINES DURING WATER CHLORINATION. **Water Research**, v. 28, n. 12, p. 2499–2506, 1994.

MCGUIRE, M. J. Drinking Water Chlorination: A Review of U.S. Disinfection Practices and Issues. **American Chemistry Council**, p. 1–38, 2016.

MEHRSHEIKH, A. *et al.* Investigation of the mechanism of chlorination of glyphosate and glycine in water. **Water Research**, v. 40, n. 16, p. 3003–3014, 2006.

MEYER, B. *et al.* Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 05, p. 31–34, 1982.

MEYER, S. T. O Uso de Cloro na Desinfecção de Águas, a Formação de Trihalometanos e os Riscos Potenciais à Saúde Pública Chlorine. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. 1, p. 99–110, 1994.

MIANJY, J. G.; NIKNAFS, B. H. Photodegradation of Fipronil in Natural Water by High Intensity UV Light Under Laboratory Conditions. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 4, p. 2284–2288, 2013.

MONTAGNER, C. C. **Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica**. 2011. 203 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094–1110, 11 jul. 2017.

MOSMANN, T. Rapid Calorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

OECD. **Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models**. Paris: OECD Publishing, 2007. v. 2

OLIVEIRA, G. A. R. *et al.* Chlorination treatment of aqueous samples reduces, but does not eliminate, the mutagenic effect of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 703, n. 2, p. 200–208, 2010.

ONODERA, S.; HIROSE, Y.; ISHIKURA, S. Changes in Genetic and Enzymatic Inhibiting Effects of Organophosphorus Pesticides during Aqueous Chlorination. **Journal of Environmental Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 65–71, 1995.

ORTIZ DE GARCÍA, S. *et al.* Ranking of concern, based on environmental indexes, for pharmaceutical and personal care products: An application to the Spanish case. **Journal of Environmental Management**, v. 129, p. 384–397, nov. 2013.

PERGAL, M. V. *et al.* Oxidative degradation and mineralization of bentazone from water. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2020.

PESCHKA, M. *et al.* Determination of two phototransformation products of bentazone using quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 5–6, p. 1227–1234, 2007.

PETRESCU, A. M.; ILIA, G. Molecular docking study to evaluate the carcinogenic potential and mammalian toxicity of thiophosphonate pesticides by cluster and discriminant analysis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 47, p. 62–78, 2016.

PLHALOVA, L. *et al.* The effects of subchronic exposure to metribuzin on *Danio rerio*. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

POPPENGA, R. H.; OEHME, F. W. **Pesticide Use and Associated Morbidity and Mortality in Veterinary Medicine**. Third Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. v. Volume 1

PUNZI, M. *et al.* Combined anaerobic-ozonation process for treatment of textile wastewater: Removal of acute toxicity and mutagenicity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 292, p. 52–60, 2015.

QIANG, Z. *et al.* Degradation of methiocarb by monochloramine in water treatment: kinetics and pathways. **Water research**, v. 50, p. 237–44, 2014.

RASCHKE, U *et al.* Photodecomposition of 4-amino-1,2,4-triazin-3,5-diones and -thiones in oxygenated aqueous solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 115, p. 191–197, 1998(a).

RASCHKE, U. *et al.* Photolysis of metribuzin in oxygenated aqueous solutions. **Chemosphere**, v. 36, n. 8, p. 1745–1758, 1998(b).

RAVETON, M. *et al.* Phototransformation of the insecticide fipronil: Identification of novel photoproducts and evidence for an alternative pathway of photodegradation. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 13, p. 4151–4157, 2006.

RICART, M. *et al.* Primary and complex stressors in polluted mediterranean rivers: Pesticide effects on biological communities. **Journal of Hydrology**, v. 383, n. 1–2, p. 52–61, 2010.

RICHARDSON, S. D.; KIMURA, S. Y. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues, **Analytical Chemistry**, v. 88, n.1, 2016.

RICHARDSON, S. D.; TERNES, T. A. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 6, p. 2813–2848, 18 mar. 2014.

RODRIGUES, L. DE B. **Efeitos ecotoxicológicos do glifosato e formulações em diferentes organismos**. 2014, 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmaceuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia 2013.

ROOK, J. J. Chlorination Reactions of Fulvic Acids in Natural-Waters. **Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 5, p. 478–482, 1977.

RUAN, T. *et al.* Evaluation of the in vitro estrogenicity of emerging bisphenol analogs and their respective estrogenic contributions in municipal sewage sludge in China. **Chemosphere**, v. 124, p. 150–155, 2015.

SADARIA, A. M. *et al.* Retrospective nationwide occurrence of fipronil and its degradates in U.S. wastewater and sewage sludge from 2001 - 2016. **Water Research**, v. 155, p. 465–473, 2019.

SANSEVERINO, J. *et al.* Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES Expressing Bacterial Bioluminescence for Rapid , Sensitive Detection of Estrogenic Compounds Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES Expressing Bacterial Bioluminescence for Rapid , Sensitive Detection of

Estrogenic Com. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4455–4460, 2005.

\_\_\_\_. Screening of potentially hormonally active chemicals using bioluminescent yeast bioreporters. **Toxicological Sciences**, v. 107, n. 1, p. 122–134, 2009.

SANTANA, L. *et al.* A QSAR model for in silico screening of MAO-A inhibitors. Prediction, synthesis, and biological assay of novel coumarins. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1149–1156, 2006.

SANTOS, C. E. M. DOS; RODRIGUES, A. S. Toxicologia in silico: contexto de aplicação e o modelo de custo-efetividade nos testes alternativos. **RevInter Revista de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, p. 92–113, 2011.

SHITYAKOV, S.; SALVADOR, E.; FÖRSTER, C. In silico, in vitro and in vivo methods to analyse drug permeation across the blood brain barrier: a critical review. **OA Anaesthetics**, p. 1–7, 2013.

SONG, S. *et al.* Hydrolysis and photolysis of bentazone in aqueous abiotic solutions and identification of its degradation products using quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 10, p. 10127–10135, 2019.

SOUZA, C. C. E. **Aplicação dos ensaios Salmonella/microsossoma e MTT para avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade de águas submetidas à cloração e fotocatalise**. 2014. 129 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), ProAmb, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

ŠTĚPÁNOVA, S. *et al.* The effects of metribuzin on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 2, p. 152–158, 2012.

SUPOWIT, S. D. *et al.* Mass Balance of Fipronil and Total Toxicity of Fipronil-Related Compounds in Process Streams during Conventional Wastewater and Wetland Treatment. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 1519–1526, 2016.

SVENSSON, B. M. *et al.* *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from landfills. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 102, n. 1–3, p. 309–321, 2005.

TAKANASHI, H. *et al.* Production of Chloro-5-hydroxy-2-nitrobenzoic Acid through Chlorination of 3-Methyl-4-nitrophenol, a Typical Hydrolysate of Fenitrothion. **Journal of Water and Environment Technology**, v. 10, n. 4, p. 437–447, 2012.

TAWK, A. *et al.* Chlorination of the beta-triketone herbicides tembotrione and sulcotrione:

Kinetic and mechanistic study, transformation products identification and toxicity. **Water research**, v. 76, p. 132–142, 2015.

TIAN, F. *et al.* Kinetics and mechanism for methiocarb degradation by chlorine dioxide in aqueous solution. **Chemosphere**, v. 79, n. 6, p. 646–51, 2010.

\_\_\_\_. Methiocarb degradation by free chlorine in water treatment: Kinetics and pathways. **Chemical Engineering Journal**, v. 232, p. 10–16, out. 2013.

\_\_\_\_. Kinetics and mechanism of dimethoate chlorination during drinking water treatment. **Chemosphere**, v. 103, p. 181–187, 2014.

TIAN, F. X. *et al.* Degradation of phenylurea herbicides by chlorine dioxide and formation of disinfection by-products during subsequent chlor(am)ination. **Chemical Engineering Journal**, v. 258, p. 210–217, 2014.

TOUSSAINT, M. W. *et al.* A comparison of standard acute toxicity test with rapid-screening toxicity test. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 907–915, 1995.

TRAVLOS, I. S. *et al.* Effects of the herbicides benfluralin, metribuzin and propyzamide on the survival and weight of earthworms (*Octodrilus complanatus*). **Plant, Soil and Environment**, v. 63, n. 3, p. 117–124, 2017.

U.S.EPA. Comprehensive Disinfectants and Disinfection Byproducts Rules (Stage 1 and Stage 2): Quick Reference Guide Overview of the Rules. p. 4, 2010.

VILLANUEVA, C. M. *et al.* Assessing exposure and health consequences of chemicals in drinking water: Current state of knowledge and research needs. **Environmental Health Perspectives**, v. 122, n. 3, p. 213–221, 2014.

WAN, Y. *et al.* Neonicotinoids, fipronil, chlorpyrifos, carbendazim, chlorotriazines, chlorophenoxy herbicides, bentazon, and selected pesticide transformation products in surface water and drinking water from northern Vietnam. **Science of the Total Environment**, v. 750, p. 141507, 2021.

WANG, T. *et al.* Insights into influencing factor, degradation mechanism and potential toxicity involved in aqueous ozonation of oxcarbazepine (CHEM46939R1). **Chemosphere**, v. 201, p. 189–196, 2018.

WHO. 2 . Chemistry of Disinfectants and Disinfectant By-Products. **EHC 216: Disinfectants Disinfectant By- products**, p. 27–109, 2000.

WU, H. *et al.* Acute toxicity and sublethal effects of fipronil on detoxification enzymes in

juvenile zebrafish (*Danio rerio*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 115, p. 9–14, 2014.

WU, J. *et al.* Occurrence and ecological risks from fipronil in aquatic environments located within residential landscapes. **Science of the Total Environment**, v. 518–519, p. 139–147, 2015.

XIE, Y. L. *et al.* Simultaneous analysis of herbicide metribuzin and its transformation products in tomato using QuEChERS-based gas chromatography coupled to a triple quadrupole mass analyzer. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 468–473, 2017.

XU, B. *et al.* Ametryn degradation by aqueous chlorine: Kinetics and reaction influences. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1–3, p. 586–592, set. 2009.

\_\_\_\_. Chlorination of chlortoluron: Kinetics, pathways and chloroform formation. **Chemosphere**, v. 83, n. 7, p. 909–916, 2011a.

YANG, X. *et al.* Precursors and nitrogen origins of trichloronitromethane and dichloroacetonitrile during chlorination/chloramination. **Chemosphere**, v. 88, n. 1, p. 25–32, 2012.

YANO, D. M. E. **Estudos de formação e remoção de subprodutos de desinfecção (spds) em águas contendo ácidos húmicos quando submetidas a dióxido de cloro.** [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2007.

ZACHAREWSKI, T. In vitro bioassays for assessing estrogenic substances. **Environmental Science and Technology**, v. 31, n. 3, p. 613–623, 1997.

ŽEGURA, B. *et al.* Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1453–1460, 2009.

ZHANG, T. Y. *et al.* Degradation kinetics and chloropicrin formation during aqueous chlorination of dinoseb. **Chemosphere**, v. 93, n. 11, p. 2662–2668, 2013.

ZHAO, Q. *et al.* Degradation of Thiamethoxam in aqueous solution by ozonation: Influencing factors, intermediates, degradation mechanism and toxicity assessment. **Chemosphere**, v. 146, p. 105–112, 2016.

***CAPÍTULO 4. PROCEDIMENTOS PARA  
AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DOS  
SUBPRODUTOS FORMADOS***



#### **4.1. LIMPEZA DAS VIDRARIAS**

Para o desenvolvimento do presente estudo, todas as vidrarias foram previamente lavadas com detergente não-iônico Extran 12,5% com auxílio de uma escova e/ou aplicação de banho de ultrassom por uma hora, enxaguadas exaustivamente com água corrente e em seguida com água destilada. Após este procedimento, as mesmas foram submersas em solução de ácido nítrico 20% durante 24 h e, então, enxaguadas com água ultrapura (Sistema Direct-Q3 MILLIPORE). As vidrarias não volumétricas foram levadas à estufa para a secagem, enquanto as volumétricas secaram-se naturalmente em uma bancada limpa.

Especificamente para os ensaios de cloração, os frascos reagentes foram ainda submetidos a uma hora de banho de ácido nítrico 30% a quente para garantir a completa oxidação de matéria orgânica residual e, em seguida, enxaguado com água ultrapura. Esta etapa é fundamental para a identificação inequívoca dos subprodutos.

Além disso, as vidrarias utilizadas nos ensaios biológicos, as quais demandavam materiais esterilizados, foram autoclavadas em autoclave do tipo vertical (Phoenix) com utilização de calor em ambiente úmido. Os materiais altoclaváveis foram submetidos à inspeção de limpeza e integridade e devidamente embalados em papel grau cirúrgico, o qual foi selado após remoção do ar do interior do mesmo. Os pacotes foram então dispostos na autoclave de modo a facilitar a difusão do agente esterilizante e, posteriormente, submetidos a esterilização a 121 °C por 20 min. Terminado o ciclo, aguardou-se a saída do vapor, abriu-se a porta da autoclave e verificou-se o resfriamento do material que, em seguida, foi armazenado em caixas plásticas com tampa. Os pacotes esterilizados foram manuseados o mínimo possível e sempre com a utilização de luvas vinílicas, sendo a abertura dos mesmos condicionada à utilização de capela de fluxo laminar previamente descontaminada com álcool 70% e 15 min de exposição à luz UV.

#### **4.2. ENSAIOS DE CLORAÇÃO E TÉCNICAS ANALÍTICAS**

##### **4.2.1. Reagentes, solventes, equipamentos e vidrarias**

- Padrões analíticos dos agrotóxicos: fipronil, metribuzim e bentazone (Sigma-Aldrich®)
- Solventes grau HPLC: metanol (J. T. Backer®);

- Reagentes: hipoclorito de sódio; tiosulfato de sódio; fosfato de potássio monobásico anidro; fosfato de potássio bibásico anidro. Todos obtidos da Dinâmica Química Contemporânea LTDA<sup>®</sup>.
- Balança analítica LIBROR – 45 SM;
- pHmetro digital (Tecnal<sup>®</sup>);
- Mesa com agitadores magnéticos;
- Banho de ultrassom digital (Kondortech);
- Micropipetas automáticas da eppendorf de volumes variados (10000 µL; 5000 µL; 1000 µL; 200,0 µL; 100,0 µL; 10,0 µL; e 5,00 µL);
- Frascos de vidro âmbar de 20 mL com batoque em teflon e tampa;
- Barras magnéticas em vidro;
- Vials, inserts, tampa e septo de politetrafluoretileno (PTFE)/silicone para autoinjeter;
- Béqueres, balões volumétricos, funis e provetas de diversos volumes;
- Cromatógrafo líquido ultra alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo (UHPLC-ESI-MS/MS) – sistema UHPLC Nexera X2 – LCMS 8040 (Shimadzu);
- Cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução (HRMS) – sistema UltiMate<sup>™</sup> 3000 UHPLC e Q-Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific<sup>™</sup>);
- Analisador de carbono orgânico total do tipo TOC-L (cph) (Shimadzu);
- Colunas analíticas: (1) Shim-Pack ODS III da Shimadzu (150 mm × 2.0 mm; 2.1 µm de tamanho de partícula); (2) Synchronis C18 da Termo<sup>™</sup> (50 mm × 2.1 mm; 1.7 µm de tamanho de partícula).

#### **4.2.2. Preparo das soluções**

As soluções estoque dos agrotóxicos isolados foram preparadas em metanol à concentração de 1 g·L<sup>-1</sup> e armazenadas em frascos âmbar sob refrigeração a – 20 °C, a fim de evitar uma possível degradação. As soluções foram mantidas no freezer por no máximo 3 meses, prazo em que as mesmas eram refeitas.

Para a etapa de cloração, as soluções de agrotóxicos empregadas foram preparadas com um dia de antecedência e mantidas em geladeira à 4 °C. Para tal, um volume da solução estoque foi transferido para um balão volumétrico, seco sob fluxo de nitrogênio e o resíduo ressuspendido em tampão fosfato 10 mM (pH 7,5 ± 0,2).

O hipoclorito de sódio, tiosulfato de sódio e cloreto de amônia foram preparados a 10% (m/v) em água ultrapura, e diluídos conforme a demanda dos ensaios.

### **4.2.3. Produção das soluções cloradas para as análises químicas e biológicas**

#### *a) Ensaio de cloração para avaliação da degradação dos agrotóxicos*

Para a avaliação da degradação dos agrotóxicos frente aos processos de cloração preparou-se uma solução isolada de cada um dos compostos na concentração de 20 µg/L em tampão fosfato (10 mM) a pH 7,5 ± 0,2. A degradação dos agrotóxicos foi avaliada com a adição de hipoclorito de sódio para obter a concentração de cloro livre de 2,0 mg/L, comumente empregada na entrada dos processos de cloração em estações de tratamento de água. Vale ressaltar que esse valor pode ser maior ou menor de acordo com a quantidade de matéria orgânica presente na água, ficando estabelecido pela legislação que a quantidade residual de cloro livre deva ser superior a 0,2 e inferior a 2,0 mg/L (World Health Organization, 2017). As reações foram feitas em frascos de sacrifício do tipo Ambar de 10 mL, na ausência de luz, a 25 ± 2 °C e sob agitação constante. Cloreto de amônia foi adicionado em excesso como agente de extinção do cloro livre e as soluções foram imediatamente analisadas.

Para calcular o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) dos agrotóxicos nas condições de cloração empregadas nesse estudo, considerou-se que a degradação segue uma cinética de pseudo-primeira ordem, visto que a concentração do cloro livre é muito superior a dos agrotóxicos, sendo sua variação desprezível ao fim do tempo de cloração. Sendo assim, uma reação de pseudo-primeira, onde não há variação da concentração do oxidante, pode ser expressa conforme a Equação 10.

$$\text{velocidade instantânea} = \frac{dC_A}{dt} = -k'C_A \quad \text{Equação 10}$$

Onde,  $C_A$  é a concentração do agrotóxico ( $\mu\text{g/L}$ ),  $k'$  é a constante de velocidade de pseudo-primeira ordem observada ( $\text{min}^{-1}$ ), e  $t$  é o tempo de reação ( $\text{min}$ ).

A integração da equação de velocidade produz a equação de plotagem usada para determinar  $k'$  (Equação 11), por meio da qual podemos calcular o  $t_{1/2}$  (Equação 12).

$$-\ln \frac{C_{At}}{C_{A0}} = k' t \quad \text{Equação 11}$$

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0,6931}{k'} \quad \text{Equação 12}$$

Onde,  $C_{At}$  e  $C_{A0}$  são a concentração dos agrotóxicos no tempo  $t$  e no tempo zero, respectivamente.

A suposição da cinética de primeira ordem é válida se a linearidade for observada quando a Equação 11 for plotada e as concentrações de oxidante estiverem em excesso suficiente, sendo  $k'$  o parâmetro de inclinação da regressão.

*b) Ensaio de cloração para a avaliação de mineralização, identificação e elucidação dos DBPs, e análise de toxicidade das soluções dos agrotóxicos.*

Os ensaios de cloração para avaliação da mineralização, identificação e elucidação dos DBPs formados e análise de toxicidade seguiram o mesmo protocolo, com a exceção de que para a mineralização testou-se apenas o maior tempo de contato (24 h). Dessa forma, preparou-se soluções mais concentradas dos agrotóxicos (fipronil 2,0 mg/L; metribuzin 10 mg/L; bentazone 10 mg/L) em tampão fosfato 10 mM (pH  $7,5 \pm 0,2$ ). A concentração aplicada nos ensaios foi consideravelmente superior àquelas detectadas em águas superficiais para garantir a identificação e a elucidação do máximo de DBPs, sem que haja a necessidade de procedimentos de extração e pré-concentração da amostra. Além disso, os ensaios biológicos utilizados nesse estudo requerem concentrações mais altas dos compostos para mensurar os efeitos tóxicos sob exposição aguda.

Dessa forma, alíquotas das soluções tamponadas dos agrotóxicos foram dispostas em frascos Ambar e levadas à agitação com auxílio de barras magnéticas de vidro previamente lavadas e aquecidas em banho de ácido nítrico 30%. Em cada frasco, adicionou-se hipoclorito de sódio (NaOCl) em uma relação de 3 mg de cloro livre ( $\text{OCl}^{-1} \leftrightarrow \text{HOCl}$ ) para cada 1 mg de C disponível na solução de agrotóxico, conforme procedimento descrito por Kishida *et al.*, (2010).

Alíquotas foram coletadas em tempos predefinidos (15, 30 e 60 min; 12 e 24 h), transferidas para frascos âmbar contendo tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) ou cloreto de amônia ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) em excesso e agitadas em vortex por 2 min à 1600 rpm para garantir o consumo do cloro residual. Utilizou-se dois agentes de extinção distintos para avaliar uma possível diferença na formação dos subprodutos, uma vez que o tiosulfato é um agente redutor forte que pode reagir com os subprodutos formados, especialmente quando há aminas primárias cloradas na estrutura (Dodd e Huang, 2004). Por outro lado,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  é considerado um agente de extinção mais brando que evita reações de redução com os DBPs formados. Esse teste foi necessário porque, embora o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  seja um agente de extinção bastante utilizado, ele forma subprodutos de cloração conhecidos como as cloroaminas que, embora muito menos reativas, ainda podem continuar lentamente o processo de cloração, dependendo dos compostos presentes no meio (Gao, Proulx e Rodriguez, 2020). Isso poderia alterar a composição das soluções para análise dos ensaios biológicos quando comparado com os ensaios químicos, uma vez que os testes biológicos demandam horas ou dias para a obtenção dos resultados.

Os ensaios de tempo zero, ou seja, sem o contato entre o cloro livre e o agrotóxico, foram conduzidos por adição do hipoclorito e excesso de agente de extinção no frasco âmbar, o qual foi agitado para garantir a completa inativação do cloro livre antes da adição das soluções tamponadas dos agrotóxicos. O branco do ensaio consistiu da cloração da solução tampão sem a presença dos agrotóxicos com a mesma quantidade de cloro livre dos ensaios sobrescritos, respeitando os mesmos tempos de reação e com a posterior extinção da reação por adição de tiosulfato de sódio.

Os ensaios foram conduzidos em triplicata, na ausência de luz e a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C} \pm 2$ ). As soluções foram analisadas imediatamente após as reações químicas.

#### **4.2.4. Determinações Analíticas**

- a) Degradação dos agrotóxicos via cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC-ESI- MS/MS)*

A degradação dos agrotóxicos foi analisada pela injeção de 10  $\mu\text{L}$  da solução de cada tempo de reação em um sistema UHPLC (UHPLC Nexera X2, Shimadzu Corporation) equipado com uma coluna analítica Shim-Pack ODS III (150 mm x 2.0 mm; 2.1  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula). A

fase móvel foi composta por (A) água ultrapura e (B) acetonitrila, ambas a 0,1% de ácido fórmico como modificador de fase. A cromatografia seguiu o seguinte gradiente de eluição: fase móvel (A) de 95 % a 5% em 4 min, mantendo-se 5% por 1,5 min; em seguida, 5% até 95% de (A) em 1,0 min, mantendo-se 95% de (A) por 1,5 min. A vazão total de fase móvel foi de 0,2000 mL/min.

A quantificação dos analitos foi realizada por espectrômetro de massas do tipo triploquadrupolo, modelo LCMS-8040 (Shimadzu corporation), equipado com fonte de ionização do tipo electrospray (ESI). As condições de operação do espectrômetro de massas foram: tensão da interface de 3,5 kV (ESI-) e 4,5 kV (ESI+); temperatura da linha de dessolvatação de 250 °C; temperatura do bloco de aquecimento de 400 °C. Nitrogênio foi usado como gás nebulizador (3 L/min) e gás de secagem aquecido (15 L/min). Argônio 5.0 (White Martins, Minas Gerais, Brasil) foi usado como gás de dissociação induzida por colisão (CID). A quantificação deu-se no modo monitoramento de múltiplas reações (MRM mode) com prévia construção de curva analítica com solução padrão dos agrotóxicos. As relações massa/carga dos íons de transição utilizados para cada composto foram: (A) fipronil: 434,80>**329,80**; 434,80>249,80; 434,80>317,85; no modo ESI negativo; (B) metribuzin: 215,10<**187,05**; no modo ESI positivo; (C) Bentazone: 239,15>**132,05**; 239,15>197,00; 239,15>133,00; no modo ESI negativo. Os íons fragmentos destacados em negrito foram aqueles utilizados para a quantificação, enquanto que os outros para a identificação do composto de interesse.

*b) Identificação e elucidação de DBPs via cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HESI-HRMS)*

A separação dos DBPs formados foi realizada pela injeção de 5 µL de cada solução clorada em um sistema UHPLC, modelo UltiMate™ 3000, equipado com coluna analítica Synchronis C18 (50 mm x 2.1 mm; 1.7 µm de tamanho de partícula), ambos da Thermo Scientific™. A fase móvel foi composta de (A) água ultrapura e (B) acetonitrila, ambos com 0.1% de ácido fórmico como modificador de fase. A separação analítica dos DBPs foi feita no modo gradiente de eluição: 95% de (A) mantido por 0.3 min, em seguida para 90% de (A) em 0.2 min; 90% para 75% de (A) em 0.5 min; 75% para 10% (A) em 5 min; 10% para 5% de (A) em 2,0 min, mantido por 1 min; por fim, de 5% para 95% de (A) em 0.5 min, mantido por 2 min até o final da corrida cromatográfica. O vazão total da fase móvel foi de 0.4 mL/min.

A identificação e elucidação estrutural deu-se via detector de espectrometria de massas de alta resolução, modelo Q-Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap da Thermo Scientific™, equipado com fonte de ionização aquecida do tipo electrospray (HESI). Os parâmetros do HESI e do detector de massas foram: vazão do gás auxiliar 20 (unidade arbitrária); gás de bainha 60 (unidades arbitrárias); temperatura do capilar de 325 °C; voltagem do spray – 3,9 kV e + 4,5 kV para ESI no modo negativo e positivo, respectivamente; S-lens RF 60; resolução do massas 70.000; tempo máximo de acumulação 200 ms; e a energia de colisão na CID de 35 com seleção de íons com intensidade superior a  $2 \times 10^5$ .

*c) Análise de carbono orgânico total (TOC)*

Para avaliar a porcentagem de mineralização, a análise de TOC foi realizada pelo método indireto utilizando um analisador TOC-L (cph) da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão). O método consiste na análise do carbono total e do carbono inorgânico presente na solução e, por diferença, calcula-se a concentração de carbono orgânico.

### **4.3. ENSAIOS DE TOXICIDADE**

Os ensaios de toxicidade foram realizados no laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos (LBTM), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob a supervisão da professora Dr<sup>a</sup> Silvana de Queiroz Silva.

#### **4.3.1. Reagentes, solventes, equipamentos e vidrarias**

*(a) Ensaio de Artêmia salina*

- Cistos de *Artêmia salina* (Sea Express);
- Sal marinho (obtido em loja de aquarismo por peso);
- Aquário com sistema adaptado de divisória para seleção de larvas de Artemia (produzido no laboratório);
- Bomba de aquário (VigoAr).

*(b) Ensaio de MTT*

- Células HepG2 (ATCC HB-8065).
- Reagentes: Cloreto de Sódio Cristal P.A ACS (Êxodo Científica<sup>®</sup>); Fosfato de Potássio Monobásico P.A ACS (Dinâmica Química Contemporânea LTDA<sup>®</sup>); Fosfato de Sódio Bibásico P.A ACS (Dinâmica Química Contemporânea LTDA<sup>®</sup>); Cloreto de potássio (Synth<sup>®</sup>); Glicose (Synth<sup>®</sup>); bicarbonato de sódio (Synth<sup>®</sup>); Tripsina (Gibco); EDTA (Synth<sup>®</sup>); Solução vermelho de fenol 1% (Synth<sup>®</sup>); Soro fetal bovino (Gibco<sup>®</sup>); penicilina 10 U/mL e estreptomicina 10 mg/mL (Gibco<sup>®</sup>); Anfotericina B (Cultilab<sup>®</sup>); DMEM (Cultilab<sup>®</sup>).

*(c) Ensaio de estrogenicidade*

- Cepas de *S.cerevisiae* BLYES e BLYR da empresa 490 Biotech (cedida pela Companhia de Ambiental de São Paulo CETESB)
- Reagentes: 17 $\beta$ -estradiol (Sigma Aldrich<sup>®</sup>); Ácido Nítrico 65% P.A. A.C.S. (Neon<sup>®</sup>); meio mínimo para levedura (leu<sup>-</sup>, ura<sup>-</sup>); Adenina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>); Fosfato de Potássio Monobásico P.A. A.C.S. (Dinâmica Química Contemporânea LTDA<sup>®</sup>); Hidróxido de Potássio (Dinâmica Química Contemporânea LTDA<sup>®</sup>); L-Ácido Glutâmico (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>); L-Arginina HCl (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>); L-Fenilalanina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>); L-Histidina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>); L-Isoleucina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>); L-Lisina HCl (Casa Americana de Artigos para Laboratórios LTDA<sup>®</sup>); L-Metionina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>); L-Serina (Vetec<sup>®</sup>); L-Tirosina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>); L-Valina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>); Sulfato de Amônio P.A ACS (Vetec<sup>®</sup>); Sulfato de Magnésio (Synth<sup>®</sup>); Sulfato Ferroso (Synth<sup>®</sup>); Agar em Pó Puro Bacteriológico (Impex<sup>®</sup>); D-Glicose Anidra P.A. – A.C.S. (Synth<sup>®</sup>); L-Aspártico (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>); L-Treonina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>); Sulfato de Cobre II Pentahidratado (Dinâmica Química Contemporânea LTDA<sup>®</sup>); Ácido Pantotênico (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>); Biotina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>); Inositol (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>); Piridoxina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>); Tiamina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>).



- Solventes: metanol grau HPLC (J.T. Baker<sup>®</sup>), DMSO P.A. (Synth<sup>®</sup>), água ultrapura (milli-Q<sup>®</sup>).

*(d) Materiais de uso comum aos ensaios*

- Utilizáveis: Balões volumétricos (volumes variados); coxinhos; erlenmeyers (volumes variados); filtro 0,2µm; frascos estéreis para cultura de cepas; frascos Schott (volumes variados); microplacas (96 poços); pipetas de vidro; placas de Petri; provetas (volumes variados); ponteiras descartáveis; tubos de ensaio; tubos de Eppendorf ; tubos tipo falcon.
- Equipamentos: Agitador magnético (Labor<sup>®</sup>); pHmetro (Tecnal<sup>®</sup>); Cabine de fluxo laminar (Grupo Veco<sup>®</sup>); Centrífuga (Centrifuge 5804 R Eppendorf<sup>®</sup>); Espectrofotômetro (Shimadzu<sup>®</sup>); Micropipetas (LabMateSoft<sup>®</sup> e Thermo Scientific<sup>®</sup>); Ultrassom (UltraCleaner 1400<sup>®</sup>); Victor<sup>™</sup> X3 ME-9669 (PerkinElmer<sup>®</sup>).

### **4.3.2. Toxicidade aguda por *Artemia salina***

A *Artemia salina* é um pequeno crustáceo de água salgada comumente utilizado para testes de toxicidade aguda devido à simplicidade e o baixo custo do ensaio, à facilidade de obtenção dos cistos, os quais são facilmente encontrados em lojas de aquarismo, além da alta resistência dos mesmos a longos períodos de estocagem quando desidratados. Para a avaliação da toxicidade aguda, os cistos, o sal marinho, uma luminária com fonte de luz de 70 watts (w) e um aquário adaptado para a devida finalidade foram obtidos em comércio local.

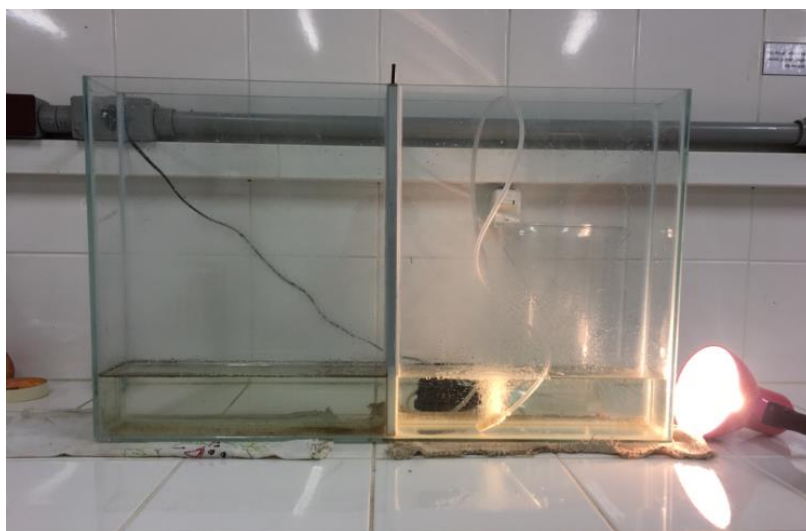
Dessa forma, uma solução salina foi preparada na concentração de 30 g·L<sup>-1</sup> e o pH ajustado entre 8 e 9 com o uso de hidróxido de amônio. Em seguida, a solução foi transferida para um aquário adaptado com uma divisória contendo furos de 2 mm igualmente espaçados entre eles. Um lacre foi adicionado à divisória furada, a fim de evitar a passagem de qualquer cisto ou larva de *A. salina* para o lado oposto do aquário nas primeiras horas de eclosão. Em um dos lados adicionou-se os cistos (0,500 mg/L de solução) e a solução foi mantida em constante aeração e sob incidência de luz por 24 horas a aproximadamente 27°C ± 2 (Figura 4.1).

Sob as condições sobrescritas, uma grande quantidade de cistos sofreu eclosão, iniciando o primeiro estágio larval das *A. salinas* (náuplios I). Em seguida, a parte do aquário em que ocorreu

a eclosão dos cistos foi completamente vedada de luz com papel alumínio, desligou-se o sistema de aeração e retirou-se o anteparo que vedava a divisória, deixando, portanto, os orifícios disponíveis para a passagem dos pequenos crustáceos. Do lado oposto ao vedado com papel alumínio, posicionou-se uma fonte de luz que mantinha o meio iluminado, o que, por conseguinte, atraía as larvas por fototropismo.

Dessa forma, as larvas de *A. salina* mais ativas são separadas pela passagem através do anteparo e a aproximação das mesmas a fonte luminosa, o que garante, de certa forma, uma seleção com base na mobilidade dos organismos. Com a intensa migração das larvas para as proximidades da lâmpada, fechou-se o anteparo e a aeração e a incidência de luz foram mantidas por mais 24 horas, tempo suficiente para garantir que as Artemias alcançassem a fase de náuplios II, ideal para a aplicação do teste de toxicidade aguda.

**Figura 4.1.** Aquário adaptado para a eclosão e seleção das Artemias utilizadas nos ensaios de toxicidade aguda.



Fonte: próprio autor.

Passadas as 48 horas, 10 crustáceos foram coletados utilizando vidros de relógio e pipetas de Pasteur, transferidos para tubos eppendorf de 2 mL e o volume completado para 1 mL com solução salina aerada. Em seguida, 1 mL das soluções do agrotóxico pré e pós etapa de cloração foram adicionadas, completando o volume total de 2 mL. As concentrações finais testadas para os agrotóxicos foram: fipronil 1,0 mg/L; metribuzin 5 mg/L; e bentazone 5 mg/L.

O controle negativo do ensaio biológico foi feito apenas com água salina e o controle positivo utilizando solução de lauril sulfato de sódio (LAS) em diferentes concentrações (10; 13,5; 18,0; 24; 32 mg·L<sup>-1</sup>) (Vanhaecke *et al.*, 1981). De acordo com trabalhos de Vanhaecke *et al.* (1981) e Vanhaecke e Persoone (1981), a faixa ideal para a concentração letal (CL<sub>50</sub>) em 24 horas de exposição ao LAS deve variar de 13,33 a 19,9 mg·L<sup>-1</sup>, ou os testes devem ser descartados e refeitos. Caso o problema persista, o lote de cistos deve ser descartado e um novo submetido ao teste de determinação de sensibilidade à exposição a mesma substância controle.

Todas as soluções com as *A. salinas* foram transferidas para placas de cultura de 24 poços, as quais foram incubadas a 27 °C por 24 e 48 horas e, posteriormente, avaliadas quanto à mortalidade. Para garantir o nível de oxigênio dissolvido, os poços da placa eram reaerados a cada 12 horas. Foram consideradas mortas aquelas que, mesmo após agitação mecânica, não apresentaram nado livre por um período de 20 segundos de observação, ainda que fossem capazes de movimentar as antenas. Os ensaios foram conduzidos em sextuplicata e a curva do ensaio de controle positivo em triplicata. Para a avaliação dos resultados de toxicidade aguda, aplicou-se o Teste t com nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) para análise da diferença entre as médias.

### **4.3.3. Viabilidade celular por ensaio de MTT**

Para a avaliação da citotoxicidade das amostras dos agrotóxicos pré e pós cloração, implementou-se o ensaio de MTT conforme a ISO 10993-5: 2009 (Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity), com algumas adaptações. Para tal, utilizou-se o modelo *in vitro* empregando a linhagem de células de hepatocarcinoma humano (HepG2), as quais foram cedidas pelo professor Dr. Breno de Melo Silva do LBTM.

Os ensaios foram realizados em duas etapas: cultivo e manutenção das células (a) e aplicação das mesmas nos testes de toxicidade aguda pela técnica de MTT (b). Todos os meios de cultivo e reagentes necessários para ambas as etapas estão descritos em pormenores no Anexo A do presente documento.

#### *(a) Cultivo e manutenção das células*

Inicialmente, descongelou-se e centrifugou-se as células que estavam devidamente estocadas em nitrogênio líquido a temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e as células transferidas para uma garrafa de cultura de  $25\text{ cm}^3$ , a qual continha meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução de antibióticos –  $100\text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$  de penicilina,  $0,1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de estreptomicina e  $0,25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de anfotericina (meio DMEM 10%).

As garrafas foram então transferidas e mantidas parcialmente abertas em estufa sob atmosfera de 5% de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  até que fossem observadas, em microscópio invertido, uma morfologia adequada das células e a formação de uma monocamada com 90 a 100% de confluência. Uma vez alcançada as condições supracitadas, descartou-se o meio de cultura, retirou-se o meio residual e as células mortas utilizando solução tampão fosfato salino para a lavagem (phosphate buffered saline – PBS) e, em seguida, adicionou-se 2 mL tripsina na garrafa, a qual foi mantida em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 5 min para o desprendimento das células aderidas no fundo (tripnização). O conteúdo da garrafa foi então ressuspensionado com meio DMEM suplementado com 5% de SFB e solução de antibióticos (meio DMEM 5%) e, em seguida, homogeneizadas com auxílio de uma pipeta para desfazer os grumos formados.

As células individualizadas foram então transferidas para uma garrafa de cultura de  $75\text{ cm}^3$  com aproximadamente 20 mL de meio DMEM 5% e mantidas em atmosfera de 5% de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  por até 48 horas. Dentro desse tempo, avaliou-se a morfologia das mesmas e a formação da monocamada confluenta (90 - 100%) para que, alcançadas as condições ideais, fossem realizados os ensaios de MTT.

Nos casos em que as condições supracitadas não foram atingidas nas primeiras 48 horas de cultivo, realizou-se procedimentos de repique celular. Para tal, eram feitos o descarte do meio e a lavagem da garrafa com PBS, seguido do processo de tripnização, conforme descrito anteriormente. As células eram ressuspensionadas em 2 mL de meio DMEM 5%, homogeneizadas com auxílio de uma pipeta e parte da solução transferida para uma nova garrafa de  $75\text{ cm}^3$  com 20 mL de meio de cultura novo.

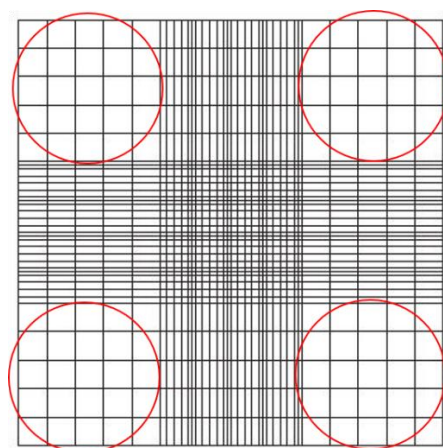
Após todas essas etapas, as células chegavam à condição ótima de ensaio e, portanto, estavam aptas para a aplicação dos testes de viabilidade celular por MTT. Os procedimentos envolvendo o cultivo das células foram realizados, obrigatoriamente, em capela de fluxo laminar previamente descontaminada.

*(b) Aplicação do teste de MTT usando as células HepG2*

Após a etapa de cultivo e manutenção da HepG2, foi possível avaliar os efeitos na viabilidade celular das soluções obtidas nos ensaios de cloração dos agrotóxicos. Para tal, descartou-se o meio de cultura da garrafa, lavou-se a mesma com solução de PBS e, em seguida, adicionou-se 1 mL de tripsina para o processo de tripnização. A garrafa foi então mantida por 5 min na estufa a 37°C e agitada manualmente para garantir o “descolamento” das células da superfície onde estavam aderidas. Então, adicionou-se 2 mL de meio DMEM 5% e, com o auxílio de uma pipeta, homogeneizou-se cuidadosamente o conteúdo da garrafa para desfazer os grumos formados.

Após a obtenção da individualização celular no meio, iniciou-se o processo de contagem das células na câmara de Neubauer. Deste modo, pipetou-se 100 µL do conteúdo final da garrafa e transferiu-se para um tubo eppendorf de 2mL, onde a solução foi diluída e homogeneizada com 900 µL de PBS. Em seguida, 10 µL dessa solução foram aplicados na borda superior da câmara, a qual foi levada para o microscópio invertido e, como o auxílio de um contador manual de células, foram feitas as contagens nos quatro quadrantes indicados na Figura 4.2.

**Figura 4.2.** Designer de uma célula de Neubauer vista em microscópio. Os quadrantes destacados em vermelho são aqueles utilizados para a contagens das células



Fonte: próprio autor.

Dessa forma, o número de células em 1 mL de solução foi calculado com base no valor médio da contagem dos quatro quadrantes, considerando, ainda, o fator de diluição da solução preparada no eppendorf (10 vezes) e o fator de correção da câmara de Neubauer ( $10^4$ ), conforme as Equações 4.1 e 4.2.

$$N_M = N_T \div 4 \quad (\text{Equação 4.1})$$

$$N_C = N_M \times 10 \text{ (fator de concentração)} \times 10^4 \text{ (fator de correção da câmara)} \quad (\text{Equação 4.2})$$

Onde,

$N_M$  = número médio de células contadas;

$N_T$  = número total de células contadas nos quadrantes destacados;

$N_C$  = número de células em 1 mL da solução original da garrafa de cultura.

Uma vez determinada a concentração de células na garrafa, foi possível definir o fator de diluição necessário para que 200  $\mu$ L da solução final contivesse  $4 \times 10^4$  células, valor esse definido como ideal para cada poço da placa. Esse valor foi fixado após uma série de testes envolvendo quantidades distintas de células em cada poço, sendo a faixa estudada entre  $1 \times 10^4$  a  $4 \times 10^5$ .

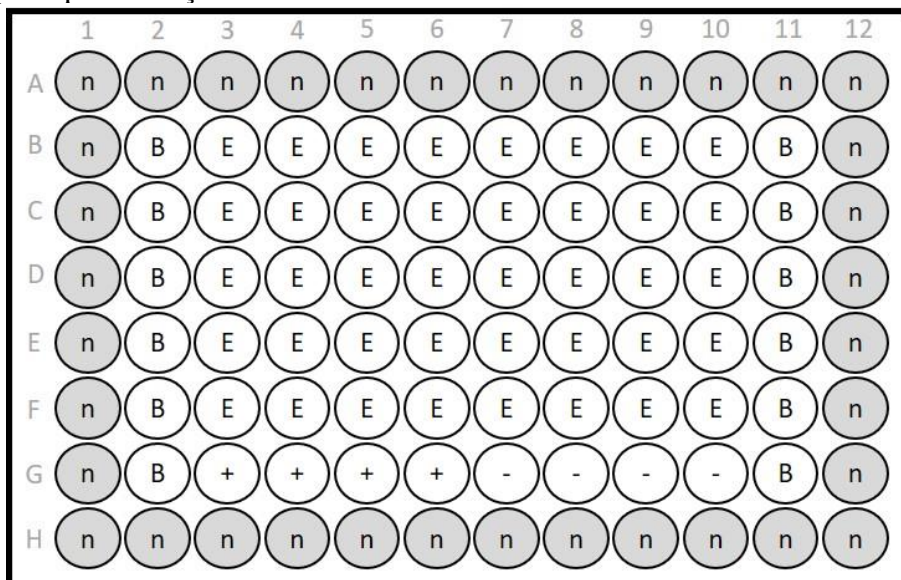
Preparada a solução diluída com meio DMEM 5%, transferiu-se 200  $\mu$ L de meio com as células para cada poço da placa com o auxílio de uma pipeta multicanal, com exceção dos poços da extremidade que foram preenchidos apenas com meio. Essa configuração é recomendada para evitar o chamado “efeito de borda”, o qual pode causar alterações na morfologia e na abundância das células dos poços da extremidade em relação ao restante. A placa foi então incubada por 24 horas em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e a temperatura de 37 °C para que ocorresse a adesão das células no fundo dos poços e, ainda, a formação da monocamada confluenta (90 – 100%), requisitos para prosseguimento do ensaio.

Após a avaliação de cada poço e confirmado o crescimento relativamente uniforme das células, descartou-se o meio da placa e lavou-se cuidadosamente a mesma utilizando 200  $\mu$ L de PBS. Em seguida, adicionou-se em cada poço 100  $\mu$ L de meio DMEM enriquecido com 2% de SFB (DMEM 2%) e 100  $\mu$ L das soluções dos agrotóxicos obtidas na cloração. Os testes para as soluções resultantes dos diferentes tempos de cloração foram feitos em cinco concentrações distintas, considerando a concentração inicial dos agrotóxicos. As soluções de fipronil foram

avaliadas na faixa de concentração entre 0,05 e 1,00 mg/L, metribuzin e bentazone entre 0,3125 e 5,00 mg/L. Todas as soluções foram diluídas em PBS e testadas em triplicata. O branco do ensaio biológico foi feito com adição de 100 µL da solução fosfato com a mesma quantidade de hipoclorito previamente estabilizado com tiosulfato, o controle negativo pela adição de 100 µL PBS e o positivo com adição de 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). É importante ressaltar que todas as soluções testadas no ensaio de MTT foram previamente esterilizadas por meio de filtração em membranas filtrantes de 0,22 µm de diâmetros de poro.

A configuração do ensaio na placa de 96 poços, apresentada na Figura 4.3, foi utilizada no presente estudo conforme sugerido pela ISO 10993-5: 2009.

**Figura 4.3.** Configuração da placa de 96 poços para os ensaios de citotoxicidade das soluções dos agrotóxicos pré e pós-cloração.



n: apenas meio sem célula, região de borda; B: branco do ensaio biológico, apenas célula em meio DMEM 1% e a solução usada na cloração sem os agrotóxicos; E: região dos ensaios com meio DMEM 1% e as soluções dos agrotóxicos a serem testadas; (+): replicatas do controle positivo do ensaio biológico; (-): replicatas do controle negativo do ensaio biológico.

Fonte: próprio Autor.

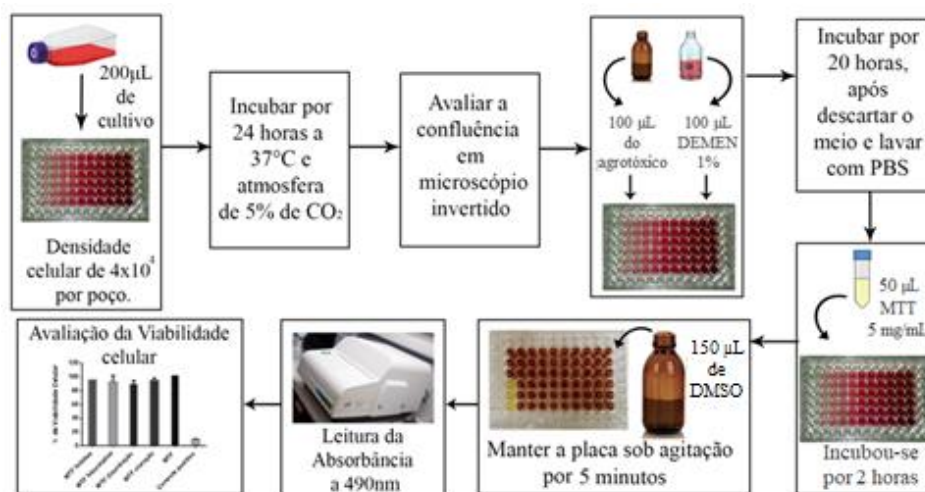
As placas preparadas foram então incubadas nas mesmas condições já descritas anteriormente por mais 24 horas e, transcorrido esse tempo, as mesmas foram retiradas da estufa e avaliadas em microscópio invertido. Se não houvesse alteração nas características das células ou problemas na monocamada formada nos poços das soluções de agrotóxicos, a placa era incubada

por mais 24 horas, totalizando 48 h de exposição. Qualquer deformação na monocamada de células nos poços controle (branco e controle negativo) invalidaria o ensaio.

Após a inspeção, descartou-se o meio da placa e os poços foram cuidadosamente lavados com 200  $\mu\text{L}$  de PBS por duas vezes, etapa muito importante para evitar que possíveis substâncias químicas redutoras pudessem causar interferência. Em cada poço, acrescentou-se 50  $\mu\text{L}$  de MTT em concentração de 5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , cobriu-se a placa com papel alumínio e, por fim, incubou-se a mesma na estufa por 2 horas a 37°C. Terminado o período de contato, adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  de DMSO nos poços e agitou-se a placa por 5 minutos para a solubilização dos cristais de formazan.

Por fim, a leitura do ensaio foi realizada em leitor de microplaca (Victor™ X3 ME-9669 da Perkin Elmer) equipado com um filtro de 490 nm. Conforme preconizado pela ISO 10993 – 5: 2009, a confirmação de efeito tóxico da solução testada se deu pela redução da absorbância e, portanto, da viabilidade celular, em mais de 30%. Como critério de aceitação do ensaio, além das análises da morfologia e confluência das células antes do ensaio, foram avaliados possíveis erros sistemáticos na semeadura por meio dos resultados dos brancos da esquerda (linha 2) e da direita (linha 11) da placa (Figura 4.3). Para que um teste atenda o critério de aceitação, a média dos brancos da direita e da esquerda não devem diferirem em mais de 15% do valor médio de todos os brancos. Todos os procedimentos descritos na aplicação dos testes de MTT podem ser resumidamente representados pelo esquema apresentado na Figura 4.4.

**Figura 4.4.** Esquema sintetizando o procedimento de avaliação da viabilidade celular de células de hepatoma humano (HepG2) pela a exposição à solução de agrotóxico pré e pós tratamento de cloração.



Fonte: adaptado de Machado, 2016.



#### **4.3.4. Ensaio de atividade estrogênica BLYES**

Os ensaios de atividade estrogênica das soluções produzidas na cloração foram realizados pelo emprego de levedura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante BLYES, a qual recebeu um plasmídeo contendo receptor de estrógeno humano e um aparato completo de produção de luz de bactérias luminescentes. Portanto, essas leveduras passam a ter a capacidade de emissão de luz quando em contato com compostos estrogênicos.

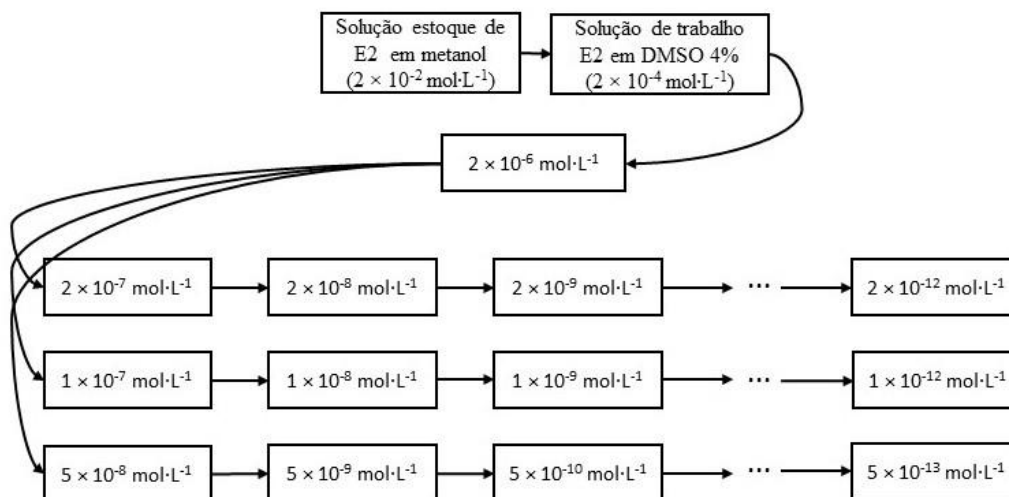
A levedura *S. cerevisiae* utilizada no presente estudo foi doada pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), pelo setor de Análises Toxicológicas e com prévia autorização da empresa 490 Biotec (Knoxville, Tennessee, USA). Os meios de cultura mínimo (YMM) e completo (YMMG), utilizados para o cultivo, manutenção e congelamento das leveduras estão descritos no Anexo B do presente documento.

##### **4.3.4.1. Preparo da solução padrão de 17 $\beta$ -estradiol**

Para a avaliação do potencial estrogênico utilizando os ensaios BLYES, preparou-se uma curva padrão de 17 $\beta$ -estradiol ou, simplesmente, estradiol (E2), a partir da qual foi possível quantificar a atividade estrogênica das amostras obtidas nos ensaios de cloração. Dessa forma, preparou-se uma solução estoque de  $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de E2 em metanol grau HPLC, a qual foi armazenada em frasco âmbar e em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  por um período máximo de 3 meses.

A partir da solução estoque, preparou-se a concentração de  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de estradiol em solução aquosa de 4% de DMSO. Para tal, pipetou-se 100  $\mu\text{L}$  do estoque para um balão volumétrico de 10 mL, secou-se o metanol em fluxo de nitrogênio e o resíduo foi ressuscitado, com auxílio de ultrassom por 5 min, em 10 mL de DMSO 4%. Em seguida, foram feitas diluições seriadas para a obtenção de uma curva em 18 concentrações entre  $5,0 \times 10^{-13}$  e  $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de estradiol em DMSO 4%, conforme pode ser observado no esquema da Figura 4.5. As soluções diluídas foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas em temperatura de aproximadamente  $4^{\circ}\text{C}$ , sendo renovadas quinzenalmente para evitar possíveis perdas por degradação.

**Figura 4.5.** Esquema de diluição seriada utilizada para o preparo de 18 concentrações de estradiol em solução de DMSO 4%, as quais foram aplicadas como controle positivo dos ensaios de estrogênicidade.



Fonte: próprio autor.

#### **4.3.4.2. Cultivo e manutenção das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* – BLYES**

As leveduras das linhagens BLYES e BLYR, previamente conservadas em criotubos de congelamento com solução de 20% de glicerol em meio YMMG (v/v) a  $-70^{\circ}\text{C}$ , foram descongeladas em capela de fluxo laminar e, em seguida, transferidas para Erlenmeyers de vidro de 250 mL, contendo aproximadamente 150 mL de meio YMMG. Em um outro Erlenmeyer de vidro de 50 mL, adicionou-se apenas 30 mL de meio de cultivo sem as leveduras para a avaliação da esterilidade do mesmo.

Os erlenmeyers foram então transferidos para um Shaker a 180 rpm com temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  e incubados por cerca de 12 a 18 horas, dependendo da resposta de crescimento de ambas as linhagens. Transcorrido o tempo determinado, avaliou-se, primeiramente, o meio YMMG incubado para o controle de esterilidade, haja vista que em caso de contaminação (meio apresenta leve turbidez), o ensaio é imediatamente interrompido e, se porventura o problema for confirmado, os meios de cultivo devem ser esterilizados novamente conforme descrito no Anexo B.

Descartada a possibilidade de contaminação, a densidade ótica das culturas de levedura foi determinada usando espectrofotômetro com leitura a 600 nm ( $\text{DO}_{600}$ ), sendo o meio puro

utilizado como branco. Alcançada a  $DO_{600}$  de aproximadamente 1, as culturas de BLYES e BLYR estavam aptas para a realização dos ensaios de estrogenicidade.

É importante destacar que parte da cultura das leveduras era destinada aos ensaios biológicos e parte era congelada, quando necessário, para garantir a manutenção das mesmas para ensaios futuros. Os procedimentos envolvendo ambos os destinos serão descritos detalhadamente nos itens a seguir.

#### **4.3.4.3. Construção da curva padrão de $17\beta$ -estradiol e avaliação de interferência da matriz**

Para a avaliação da resposta das leveduras pela exposição às substâncias estrogênicas, analisou-se a curva de estradiol em quadruplicata e, conforme a literatura, a resposta da concentração efetiva que causa 50% do efeito máximo investigado ( $EC_{50}$ ) para o estradiol deve estar na ordem de  $10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  para o prosseguimento dos ensaios. Ainda, determinou-se a média e o desvio padrão de cada um dos 18 pontos e, sobretudo, a variação do valor de  $EC_{50}$  entre as replicatas das curvas.

Tendo em vista o meio de reação envolvendo os ensaios de cloração, testou-se também a possível interferência dos compostos da matriz no comportamento das leveduras e, por conseguinte, na alteração da resposta de bioluminescência das mesmas em contato com o estradiol. Dessa forma, avaliou-se duas situações distintas: a primeira com a curva em DMSO 4% adicionando as mesmas concentrações de hipoclorito de sódio, tiosulfato de sódio e tampão fosfato utilizadas no ensaio de cloração; e a segunda, avaliando a curva em solução de DMSO 4%. Os brancos dos ensaios são representados pela matriz utilizada em cada teste sem a presença de estradiol e o controle negativo pela utilização de (A) água ultrapura e (B) DMSO 4%. Os testes foram conduzidos dessa forma para avaliar possíveis efeitos de estresse osmótico, a presença de contaminantes nos sais utilizados que pudesse potencializar ou atenuar os efeitos de substâncias hormonalmente ativas (efeito sinérgico) ou, até mesmo, a influência do tampão fosfato no resultado dos ensaios.

Posto isso, os experimentos foram realizados pela distribuição apropriada de 50  $\mu\text{L}$  dos padrões de E2, cujas concentrações são descritas no item 4.3.4.1, em microplacas brancas de 96 poços de fundo chato, seguido da adição de 150  $\mu\text{L}$  de meio com levedura em cada poço. Dessa

forma, as concentrações do estradiol serão diluídas 4 vezes no poço e o DMSO passa a ser 1%, ideal para esse tipo de ensaio. As microplacas foram então incubadas por 8 horas a 30°C no leitor Victor™ X3 (Perkin Elmer) e as leituras feitas a cada hora seguindo o protocolo de agitação rápida em orbital (diâmetro de 1 mm) por 20 s para, posteriormente, serem medidos os valores de luminescência com tempo de aquisição de 1 segundo por poço.

Os dados de luminescência, medida em contagens por segundo (CPS), versus a concentração molar do padrão de E2 (M) foram plotados no gráfico em escala logarítmica, gerando uma curva sigmoide de concentração-resposta. A EC<sub>50</sub> foi determinada pelo ponto médio da porção linear da curva.

É relevante ressaltar que, juntamente com a construção das curvas padrão, foram conduzidos os ensaios com a levedura BLYR, seguindo o mesmo protocolo, com a finalidade de determinar a possível presença de contaminantes que pudessem causar toxicidade à levedura BLYES. A redução em mais de 20% da luminescência emitida pela linhagem BLYR deve ser atribuída ao efeito tóxico causado pela presença substâncias na matriz utilizada para a construção da curva padrão.

Uma vez definida as leveduras BLYES e BLYR e confirmada a viabilidade através da análise dos valores de EC<sub>50</sub>, destinou-se parte do cultivo para o congelamento. Dessa forma, o volume remanescente de cultura foi centrifugado a 4000 rpm a 5 °C, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido com volumes entre 5 a 10 mL de meio YMMG, dependendo da quantidade de levedura obtida. Por fim, transferiu-se 500 µL do cultivo resultante para criotubos de congelamento de 2 mL e, em seguida adicionou-se 500 µL de solução de glicerol a 40% previamente esterilizada. A mistura foi homogeneizada e imediatamente armazenada em freezer a -70 °C.

As etapas de cultivo, manutenção e congelamento das leveduras utilizadas nos ensaios de estrogenicidade estão representadas de forma concisa no esquema apresentado na Figura 4.6.

**Figura 4.6.** Esquema sintetizando as etapas de cultivo, manutenção e aplicação das leveduras BLYES e BLYR nos ensaios de estrogenicidade.



Fonte: Machado, 2016.

#### 4.3.4.4. Ensaio de estrogenicidade para as amostras cloradas

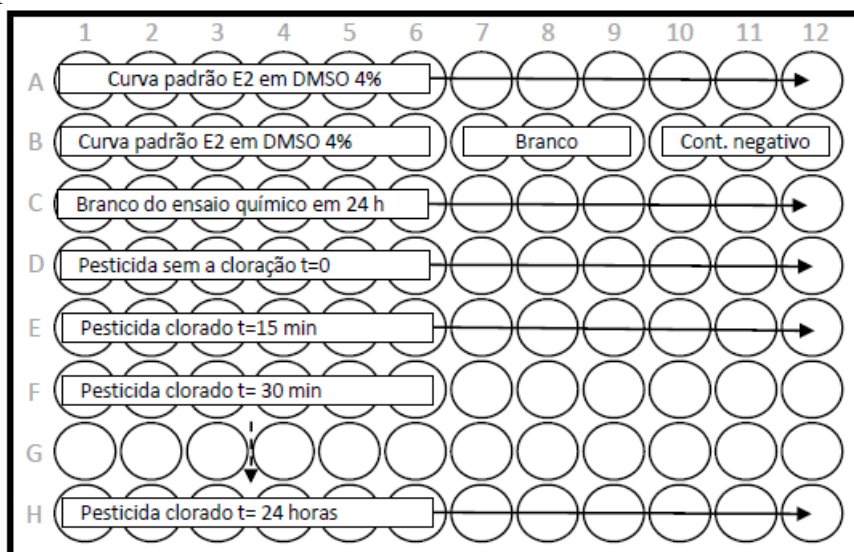
Para a avaliação da estrogenicidade nas amostras, preparou-se 12 diluições das soluções provenientes dos ensaios de cloração. Como trata-se de uma mistura de compostos formados na solução, deve-se considerar os fatores de diluição de cada amostra. Os fatores de diluição para todas as amostras foram, inicialmente, de 4 a 5333.3 vezes, ou seja, variando de 0,25 a 0,001875 em relação a amostra sem diluição (concentração final no poço). Em caso de toxicidade às leveduras que possa inviabilizar a avaliação da estrogênica, as amostras devem ser diluídas ainda mais. A concentração molar só pode ser utilizada para compostos puros, como o padrão de E2, por exemplo. Assim como na construção da curva padrão, as diluições foram conduzidas de forma que a solução final de cada concentração contivesse 4% de DMSO (v/v).

Dessa forma, todas as soluções geradas foram diluídas e analisadas por meio do ensaio biológico em triplicata. Já o branco do ensaio químico, também analisado em triplicata, foi testado apenas no tempo de 24 h, haja vista que não houve diferença na análise química das soluções de branco nos diferentes tempos de cloração. Dessa forma, 50 µL das soluções foram devidamente distribuídos em uma microplaca de 96 poços, sendo imprescindível a construção de uma curva padrão (controle positivo) para cada placa utilizada no ensaio. Além disso, os controles negativos foram feitos utilizando apenas (A) água milli-Q e (B) DMSO 4% com a cultura de leveduras. É

importante destacar que, com a adição do meio com levedura, a faixa de concentração do analito aplicada no poço será diluída 4 vezes, assim como a concentração de DMSO que passa a ser 1%. A distribuição das amostras nas placas utilizadas para os ensaios de estrogenicidade está representada na Figura 4.7.

Para cada teste eram construídas duas placas idênticas, sendo uma para o ensaio com a linhagem responsiva a estrógeno (BLYES) e outra para a linhagem de controle de toxicidade (BLYR). As placas foram então levadas para estufa a 30 °C e, dado o tempo de incubação preestabelecido, as mesmas foram analisadas no equipamento Victor™, conforme protocolos de agitação e de leitura de luminescência descritos anteriormente.

**Figura 4.7.** Microplaca ilustrando a distribuição dos padrões de estradiol, do branco e controle negativo do ensaio biológico, do branco do ensaio químico e das soluções dos agrotóxicos em diferentes tempos de contato com cloro livre.



Fonte: próprio autor.

#### 4.3.4.5. Análise e interpretação dos dados

As respostas de luminescência das leveduras nos testes com as amostras geradas na cloração foram expressas em função da curva padrão produzida com a mesma cultura. Portanto, plotou-se o gráfico de porcentagem em relação a luminescência máxima de E2 pelo log do fator de diluição das soluções dos agrotóxicos, sendo o cálculo de estrogenicidade expresso em concentração equivalente de E2.

Para as soluções cloradas, a concentração do agrotóxico que produz 50% da resposta máxima de luminescência para o E2 é considerada o EC<sub>50</sub> da amostra. Dividindo-se o EC<sub>50</sub> do padrão pelo das amostras, obtem-se o valor de equivalente de E2. Nos casos em que a resposta máxima da amostra não superar o valor de bioluminescência obtido para o EC<sub>50</sub> do padrão, o equivalente de E2 deve ser mensurado com base na concentração efetiva que causa 20% do efeito máximo investigado (EC<sub>20</sub>) para o padrão de E2, evitando, portanto, cálculos por extrapolação. O critério de positividade, ou seja, a menor resposta de bioluminescência para que a amostra seja considerada estrogênica, foi calculado com base na resposta média produzida pelas réplicas da leitura do branco. Dessa forma, considerou-se como estrogênica aquela concentração que produziu luminescência igual a média das respostas do branco (bioluminescência de background), adicionada de 3 vezes o desvio padrão das replicatas. O limite de detecção (LD) adotado para o ensaio biológico foi a concentração de E2 capaz de produzir resposta igual ao critério de positividade e o limite de quantificação (LQ) foi aquela concentração equivalente a 3,3 vezes o LD.

Ressalta-se que a variabilidade do método foi definida pela média e desvio padrão dos valores de EC<sub>50</sub> das replicatas das curvas padrão e, ainda, que a redução da resposta de luminescência no ensaio BLYR em mais de 20% (IC<sub>20</sub>), quando em contato com as amostras, foi considerada como efeito tóxico para as leveduras. Esse fato levou a repetição dos ensaios com maior nível de diluição das amostras ou, em casos de poucos pontos da curva acima de 20% de redução da bioluminescência, os mesmos foram removidos dos cálculos de estrogenicidade.

#### **4.3.5. Toxicidade *in silico***

Para a predição das toxicidades por meio de metodologias (Q)SAR, utilizou-se a ferramenta Toxicity Estimation Software Tool (T.E.S.T.) versão 4.2 da U.S. EPA. Essa abordagem de avaliação utiliza modelos matemáticos para prever a toxicidade de compostos a partir de descritores moleculares (ver detalhes no guia de utilização - Martin, (2016)).

Utilizou-se o método de predição “consensus” como opção para as previsões de toxicidade dos compostos, o qual apresenta a vantagem de produzir os melhores resultados de predição durante a validação externa. O método “consensus” calcula a média do resultado de até 5 métodos de predição distintos, entre eles: “hierarchical clustering”, “nearest neighbor”, “single model”,

“group contribution” and “Food and Drug Administration (FDA)”. Dessa forma, para que haja a predição por método “consensus” é necessário que pelo menos 2 métodos sejam capazes de calcular a toxicidade das estruturas químicas de cada DBP.

Os “endpoints” avaliados foram mutagênicidade (referente ao teste Ames) e toxicidade para o desenvolvimento de animais ou homens, ambos binários (positivo ou negativo). Para esses “endpoints” binários a precisão do modelo é baseada nos parâmetros de validação sensibilidade, especificidade e concordância. Esses parâmetros são calculados por validação cruzada utilizando compostos do conjunto de treinamento do modelo com similaridade acima de 0,50 (varia de 0,0 a 1,0) com o composto testado.

- Sensibilidade: é a fração de compostos com similaridade com o composto testado que são experimentalmente ativos e que o modelo prevê serem ativos.
- Especificidade: é a fração de compostos com similaridade com o composto testado que são experimentalmente inativos e que o modelo prevê serem inativos.
- Concordância: fração de acertos na predição, tanto para compostos ativos quanto inativos.

Valores de concordância, sensibilidade e especificidade mais próximos de 1,0 significam melhor precisão na previsão de toxicidade do composto alvo. Sensibilidades de predição mais altas do que especificidades são comuns e aceitáveis para aplicações regulatórias porque é desejável minimizar falsos negativos. A utilização do software e a interpretação dos dados foram conduzidos de acordo com o recomendado pelo Guia do Usuário para T.E.S.T versão 4.2 (Martin, 2016).



#### **4.4. BIBLIOGRAFIA**

DODD, M. C.; HUANG, C. H. Transformation of the antibacterial agent sulfamethoxazole in reactions with chlorine: Kinetics, mechanisms, and pathways. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 21, p. 5607–5615, 2004.

GAO, J.; PROULX, F.; RODRIGUEZ, M. J. Synergistic effects of quenching agents and pH on the stability of regulated and unregulated disinfection by-products for drinking water quality monitoring. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 2, 2020.

ISO 10993-5:2009. **Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. Switzerland: [s.n.].

KISHIDA, M. *et al.* Chlorination by-products of fenitrothion. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 85–91, 2010.

MARTIN, T. **User's Guide for T.E.S.T. (version 4.2)**. United States Environmental Protection Agency. **Anais...Cincinnati**, Ohio: 2016Disponível em: <<https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test%0AUser's>>

VANHAECKE, P. *et al.* Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 5, n. 3, p. 382–387, set. 1981.

VANHAECKE, P.; PERSOONE, G. Report on an Intercalibration Exercise on a Short-term Standard Toxicity Test with *Artemia Nauplii* (Arc-Test). **INSERM**, v. 106, p. 359–376, 1981.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for Drinking-water Quality**. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254637/1/9789241549950-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 1 jan. 2017.

***CAPÍTULO 5. CLORAÇÃO DO FIPRONIL:  
DEGRADAÇÃO, FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS  
E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE.***

## **5.1. ANÁLISES QUÍMICAS DAS SOLUÇÕES CLORADAS DE FIPRONIL**

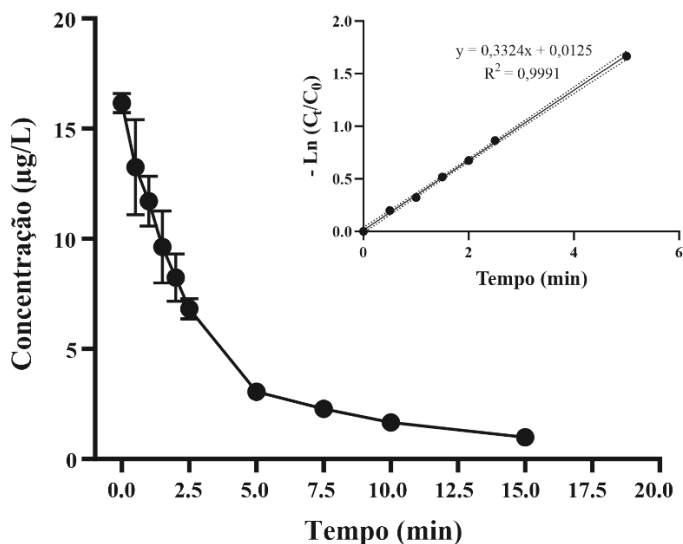
### **5.1.1. Degradação e mineralização do fipronil**

A degradação do fipronil foi realizada para avaliar a sua reatividade quando submetido ao processo de cloração nas condições empregadas neste estudo. Para mensurar a possível contribuição da hidrólise na degradação do fipronil, preparou-se uma solução aquosa do inseticida ( $20 \mu\text{g/L}$ ), a  $\text{pH} = 7,5 \pm 0,2$  (tampão fosfato), a qual foi submetida a agitação constante, na ausência de luz e a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas. Evidenciou-se que hidrólise foi desprezível, corroborando com os dados de estabilidade do fipronil em amostras aquosas disponíveis na literatura. De acordo com U.S. EPA (1996) (apud Lilia, 2003), o fipronil foi estável à hidrólise ácida e básica, no escuro e a  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ , condições em que 80% do inseticida permaneceu inalterado após 100 dias em água levemente ácida a neutra ( $\text{pH} 5 - 7$ ).

Conforme observado na Figura 5.1, fipronil foi rapidamente consumido, mesmo a  $20 \mu\text{g/L}$  e sob concentração de cloro livre tipicamente utilizado em ETAs. Nas condições de reação empregadas, o fipronil teve  $t_{1/2}$  de 2,08 min,  $k'$  de  $0.3324 \text{ min}^{-1}$  e aproximadamente 93% de degradação com 15 min de reação, tempo inferior ao mínimo requerido (30 min) para a desinfecção efetiva por cloração em ETAs (World Health Organization, 2017).

No único estudo encontrado na literatura envolvendo cinética de degradação do fipronil em reações de cloração, Chamberlain *et al.*, (2010) demonstraram que esse inseticida é altamente reativo ao cloro livre. Além disso, o fipronil provou ser mais susceptível à oxidação por cloro em  $\text{pH}$  básico do que ácido, o que contradiz a maior capacidade de oxidação do ácido hipocloroso quando comparado com o íon hipoclorito. Embora não haja comprovação, os autores levantaram a hipótese de que em meio básico pode ter ocorrido o enfraquecimento das interações da molécula do agrotóxico com as moléculas de água, tornando os sítios de reação mais susceptíveis ao ataque dos agentes oxidantes.

Figura 5.1. Degradação do fipronil (20 µg/L) por cloração (2,00 mg/L de cloro livre) a pH 7,5 ± 0,2 e temperatura de 25 ± 1 °C.



Fonte: próprio autor.

A avaliação da mineralização dos agrotóxicos por análise de TOC, proposto no presente estudo, requer concentrações mais altas dos mesmos devido ao limite de quantificação do método utilizado. Devido à menor solubilidade do fipronil, não foi possível mensurar se houve qualquer mineralização do mesmo após 24 h de exposição ao cloro livre.

### 5.1.2. Identificação e elucidação dos DBPs formados pela cloração do fipronil

Visto que o fipronil é uma espécie bastante reativa ao cloro, torna-se importante avaliar a formação de DBPs da degradação oxidativa por cloração. Embora exista estudo avaliando a cinética de degradação desse inseticida em sistemas de cloração, não há avaliação da formação novos DBPs que possam ser preocupantes quando presentes em sistemas de abastecimento público. No estudo proposto por Chamberlain *et al.*, (2010), apenas os produtos de degradação fipronil-sulfona, fipronil-sulfeto e fipronil-dessulfínil foram monitorados, os quais não foram identificados nas soluções cloradas. Além disso, os autores afirmaram que nenhum outro subproduto foi identificado por meio de método baseado em HPLC-MS no modo de varredura (scan).

Posto isto, a utilização de técnicas analíticas sofisticadas e poderosas para a identificação e elucidação estrutural de compostos, mesmo em concentrações muito baixas, representa uma

## Capítulo 5. Cloração do fipronil: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade

importante contribuição para estudos anteriores relacionados à presença do fipronil em sistemas de abastecimento de água. Dessa forma, no presente estudo utilizou-se técnicas baseadas em espectrometria de massas de alta resolução, com análise dos compostos precursores e seus íons fragmentos gerados por dissociação induzida por colisão, para a identificação e elucidação dos DBPs formados.

Os resultados obtidos forneceram dados consistentes, sendo possível propor as fórmulas moleculares para seis subprodutos formados, com erros relativos menores que 0,87 ppm entre  $m/z$  experimentais e teóricas, conforme apresentado na Tabela 5.1. Além disso, utilizou-se o parâmetro Equivalência de Duplas Ligações (*Double Bond Equivalency* - DBE), o qual calcula o número de insaturações presentes na estrutura química, para auxiliar na caracterização estrutural proposta para cada um dos subprodutos identificados. O cálculo do DBE é feito segundo a fórmula apresentada na Equação 5.1.

$$DBE = C + 1 - \frac{H}{2} - \frac{X}{2} + \frac{N}{2} \quad (\text{Equação 5.1})$$

Onde,

C = número de carbonos;

H = número de hidrogênios;

X = número de halogênios;

N = número de nitrogênios.

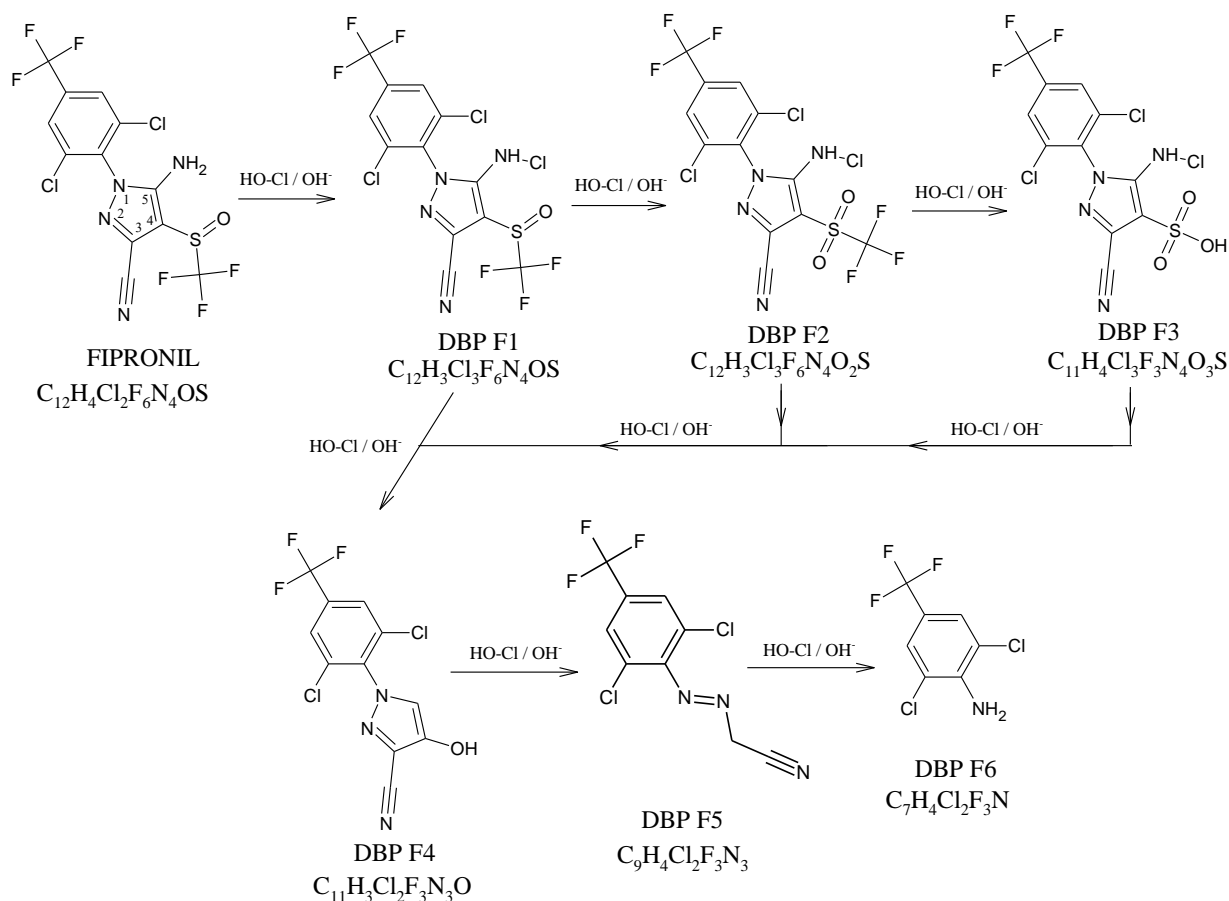
**Tabela 5.1.** Dados obtidos pela análise por UHPLC-HESI-HRMS para fipronil e seus subprodutos. Fórmulas moleculares propostas, massa monoisotópica exata, tempo de retenção, relações  $m/z$  teórica e experimental, o erro calculado (ppm) e DBE para a fórmula iônica.

DBPs	Fórmula Molecular	Massa monoisotópica exata	Tr	ESI no modo negativo			
				$m/z$ teórico	$m/z$ experimental	Erro (ppm)	DBE
FIPRONIL	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> ON <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>6</sub> S	435,93870	7,72	434,93143	434,93109	- 0,34	9,5
DBP F1	C <sub>12</sub> H <sub>3</sub> ON <sub>4</sub> Cl <sub>3</sub> F <sub>6</sub> S	469,89973	8,01	468,89136	468,89218	0,82	9,5
DBP F2	C <sub>12</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> N <sub>4</sub> Cl <sub>3</sub> F <sub>6</sub> S	485,89465	7,67	484,88627	484,88714	0,87	9,5
DBP F3	C <sub>11</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> N <sub>4</sub> Cl <sub>3</sub> F <sub>3</sub> S	433,90218	7,12	432,89380	432,89444	0,64	9,5
DBP F4	C <sub>11</sub> H <sub>4</sub> ON <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>3</sub> S	320,96883	7,13	319,95998	319,96090	- 0,31	9,5
DBP F5	C <sub>9</sub> H <sub>4</sub> N <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>3</sub> S	280,97344	7,72	279,96506	279,96593	0,87	7,5
DBP F6	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> NC <sub>1</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>3</sub> S	228,96729	7,87	227,95892	227,95949	0,57	4,5

## Capítulo 5. Cloração do fipronil: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade

Baseado na Tabela 5.1, nas relações de abundância isotópicas e no perfil de fragmentação obtido por dissociação induzida por colisão (Materiais suplementares – Anexo C), foi possível elucidar as estruturas formadas e propor uma possível rota de formação dos DBPs, conforme observado na Figura 5.2.

**Figura 5.2.** Fórmula estrutural e rota de degradação proposta para a formação dos subprodutos de degradação do fipronil por processos de cloração.



Fonte: próprio autor.

As reações de cloração de compostos orgânicos estão relacionadas ao alto potencial oxidativo e a capacidade de polarização da molécula do ácido hipocloroso, mas também aos sítios reativos disponíveis na estrutura de compostos orgânicos, sendo fortemente dependentes dos átomos vizinhos, a energia de ligação, a densidade eletrônica, entre outros muitos parâmetros. Dessa forma, a alta reatividade do fipronil era esperada uma vez que o enxofre presente na sua estrutura pode ser facilmente oxidado. Além disso, a amina primária, que embora tenha a sua

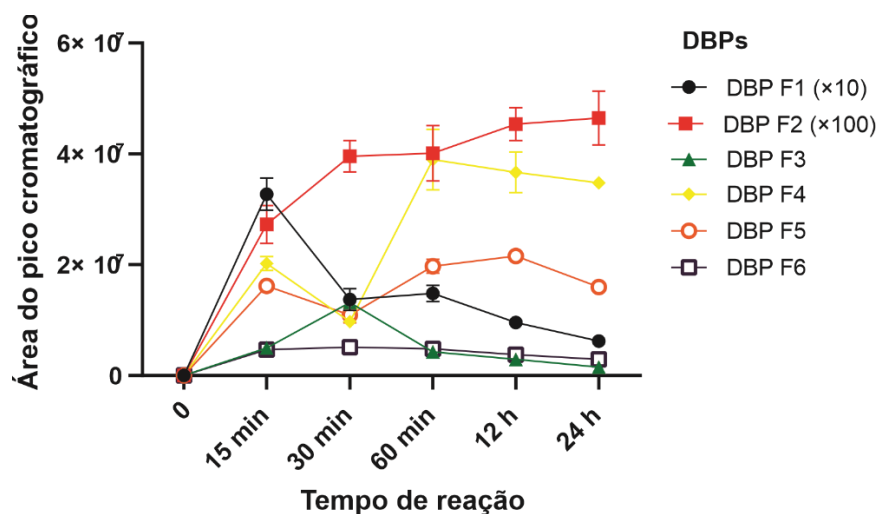
## Capítulo 5. Cloração do fipronil: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade

densidade eletrônica reduzida pelo anel pirazólico substituído com grupos retiradores fortes, também é um sítio bastante susceptível a reação de substituição eletrofílica envolvendo o  $\text{HOCl}_{(\text{aq})}$ .

Corroborando com os dados de Chamberlain *et al.*, (2010), não foram identificados os subprodutos fipronil-desulfínil, fipronil-sulfeto e fipronil-sulfona, típicos da degradação do fipronil via fotólise, fotocatalise, ozonização catalítica ou mesmo metabolismo biológico (Anandan e Wu, 2015; Gomes Júnior *et al.*, 2017; Lilia, 2003; Mianjy e Niknafs, 2013; Ngim, Mabury e Crosby, 2000; Raveton *et al.*, 2006). Entretanto, a ausência desses derivados do fipronil está relacionada a reação de substituição eletrofílica para a cloração da amina primária presente no anel pirazólico, para a formação do DBP F1 (Figura 5.2).

Posteriormente, o DBP F1 sofreu oxidação de enxofre para ser convertido em seus derivados, representados pelas estruturas DBP F2 e DBP F3 propostas na Figura 5.2. A oxidação do enxofre é muito favorável em meio oxidativo, portanto DBP F1 foi rapidamente convertido em DBP F2. Como demonstrado na Figura 5.3, DBP F1 foi consumido rapidamente após 15 min de reação.

**Figura 5.3.** Taxa de formação/consumo dos DBPs em diferentes tempos de cloração do fipronil (0, 15, 30 e 60 min; 12 e 24 h). Os DBP F1 e DBP F2 tiveram as suas áreas cromatográficas divididas para melhor visualização do gráfico. O fator de correção está representado na legenda.



Fonte: próprio autor.

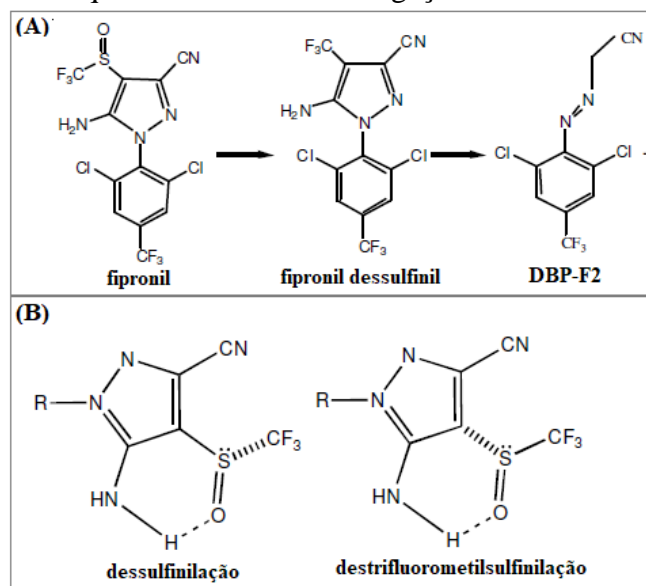
Já o DBP F5 (Figura 5.2) é comumente citado na literatura como produto de degradação do fipronil em processos oxidativos envolvendo outros agentes oxidantes. Esse composto é típico de reações de fotodegradação do fipronil, as quais são caracterizadas pela formação do fipronil

## Capítulo 5. Cloração do fipronil: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade

dessulfinil, seguido da reação de abertura do anel pirazólico para formar o subproduto DBP-F5 (Figura 5.4 (A)). Esse processo de fotoextrusão do grupo sulfonilo parece ser muito próprio desse agrotóxico, haja vista que tal reação não ocorre em análogos onde as cadeias laterais dos grupos amino e carbonitrilo não estão presentes no anel pirazólico. Essa característica específica do fipronil se dá por uma forte interação intramolecular entre o hidrogênio do grupo amino e o oxigênio do grupo sulfonilo, assumindo, por meio de ligação de hidrogênio, uma conformação cíclica. Tal fato, torna as ligações  $\text{SO} - \text{CF}_3$  e  $\text{C} - \text{SOCF}_3$  bastante susceptíveis a quebra homolítica com a incidência de luz, causando os processos de dessulfinação e destrifluorometilsulfinação (Figura 5.4 (B)).

Ainda de acordo com a literatura, após a oxidação do enxofre para a formação do fipronil sulfona (derivado do fipronil), há um comprometimento da interação intramolecular descrita anteriormente e representada na Figura 5.4 (B), fato que mantém a ligação  $\text{C} - \text{SO}_2\text{CF}_3$  mais estável e menos susceptível a degradação para a formação do fipronil dessulfinil (Hainzl e Casida, 1996; Ngim, Mabury e Crosby, 2000).

**Figura 5.4.** Formação do DBP-F2 pela fotólise do fipronil. Em (A) tem-se a rota para a formação do DBP-F2 passando pela reação de formação do fipronil dessulfinil; (B) interação entre os grupos amino e sulfonilo favorecendo a quebra homolítica das ligações.



Fonte: adaptado de Mianjy e Niknafs (2013)



## ***Capítulo 5. Cloração do fipronil: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade***

---

Conforme já descrito, os ensaios foram conduzidos em frascos âmbar e protegidos por papel alumínio para evitar a possível degradação causada pela incidência de luz do ambiente. Além disso, não foram evidenciados subprodutos no ensaio controle (sem cloro ativo) que caracterizasse uma possível interferência de reações induzidas por fotólise. Outra evidência de que a reação possa ter ocorrido por ação do cloro livre está no fato de que o subproduto fipronil dessulfínil, formado majoritariamente em reações envolvendo processos de fotólise (~ 50%), e seu derivado clorado não foram detectados no meio reacional em nenhum dos tempos de exposição ao cloro.

Contudo, o DBP F5 parece ser formado por outros mecanismos em reações de cloração. A hipótese é que ocorreu a oxidação do anel pirazólico para gerar produtos intermediários envolvendo detri-fluorometil-sulfínilação, detri-fluorometil-sulfonação e/ou dessulfonação dos DBP F1, DBP F2 e DBP F3, respectivamente. Depois, esses intermediários podem sofrer clivagem do anel pirazólico para a formação do DBP F5. Se a cloração da amina primária não comprometer a conformação do anel de seis membros das cadeias laterais, como descrito anteriormente, o DBP F1 poderia ser mais suscetível a sofrer a detri-fluorometil-sulfínilação por oxidação do que DBP F2 e DBP F3. A presença do DBP F4 ( $m/z$  319,96090) (Figura 5.2) nas soluções cloradas sugere que essa hipótese pode estar correta, muito embora esse DBP não tenha gerado fragmentos estáveis para a comprovação de sua fórmula estrutural. Além disso, o DBP F4 também foi formado pela desaminação do anel pirazólico, provavelmente levando à formação de cloramina no meio reacional. A estrutura do DBP F4 foi proposta com base na identificação do íon com baixo erro entre a relação  $m/z$  experimental e teórica (-0,17) e nas relações isotópicas condizentes. É importante destacar que essa é uma hipótese para o mecanismo que pode estar relacionado à formação do DBP F5, mas a sua confirmação requer estudos mais aprofundados.

Por fim, o DBP F6 (Figura 5.2), um derivado da anilina, também foi identificado. Os derivados da anilina têm sido descritos como subprodutos da degradação do fipronil em processos oxidativos [21]. A formação do DBP F6 provavelmente ocorreu por modificação dos substituintes do anel pirazólico, levando à sua clivagem e a hidrólise do N da posição 1 do anel.

Os DBPs identificados neste estudo não têm precedentes nos dados da literatura, com exceção do DBP F5 e DBP F6, ambos relatados na literatura para outros processos oxidativos. Ao contrário do que foi observado por (Chamberlain *et al.*, 2010), foi possível identificar e elucidar seis DBPs que podem ser formados pela cloração do fipronil. Os principais DBPs foram formados por meio de cloração por reação em cadeia lateral, como cloração de amina primária e oxidação

## ***Capítulo 5. Cloração do fipronil: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade***

---

de enxofre. A clivagem do anel de pirazol foi outra via de degradação para formar DBPs minoritários. Estudos têm relatado que anéis contendo heteroátomos são mais susceptíveis às reações envolvendo cloro livre (Bull *et al.*, 2006).

### **5.2. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO FIPRONIL PRÉ E PÓS-CLORAÇÃO**

A avaliação da toxicidade foi realizada através de ensaios de toxicidade *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. Os testes objetivaram avaliar os possíveis riscos associados à contaminação da água potável por esses DBPs. Além disso, foi realizado ensaio de toxicidade *in vivo* com uma espécie de microcrustáceo, uma vez que o fipronil é considerado altamente tóxico para diferentes níveis tróficos de organismos aquáticos e o efluente das estações de tratamento de água retornam ao meio ambiente.

Especificamente para os ensaios envolvendo o fipronil, foram selecionadas as soluções do agrotóxico inalterado (0 min), com tempo de cloração de 30 min, mínimo requerido em ETAs, e com 12 e 24 horas para avaliação de maiores tempos de contato com o cloro. Os resultados da toxicidade são descritos e discutidos na sequência.

#### **5.2.1. Toxicidade aguda por *Artemia salina***

A formação de DBPs em processos de cloração caracterizam uma preocupação crescente quanto a toxicidade conferida à água potável, principalmente relacionado ao aspecto de saúde pública, e à possibilidade de impactos causados ao ambiente aquático. Portanto, é necessário que se avalie o potencial tóxico das soluções do agrotóxico antes e após a etapa de desinfecção para organismos aquáticos. Para tal, selecionou-se o teste com *A. salina*, comum para a triagem de compostos a serem avaliados quanto a toxicidade aguda.

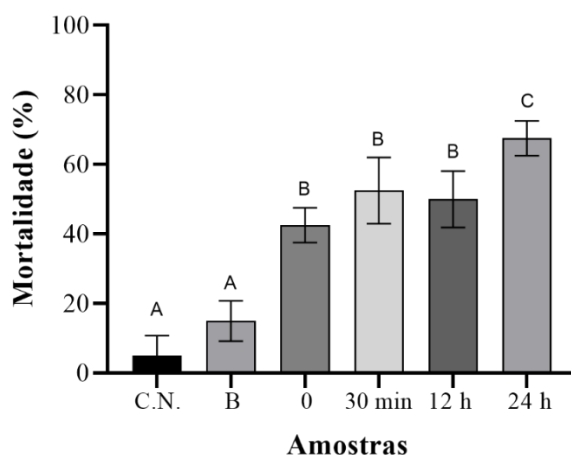
Os testes foram realizados utilizando alíquotas recolhidas nos diferentes tempos de degradação (0, 30 min, 12 h e 24 h) e a taxa de mortalidade foi definida para cada um deles de acordo com a mobilidade dos microcrustáceos em 20 segundos de observação. O teste de controle negativo e o branco do ensaio também foram avaliados (ver detalhes no Capítulo 4, seção 4.3.2). A mortalidade dos náuplios causada pela exposição às soluções nos diferentes tempos de reação foi avaliada em 24 e 48 horas, no entanto, não foram constatados efeitos tóxicos para os ensaios

## Capítulo 5. Cloração do fipronil: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade

de 24 horas. A Figura 5.5 apresenta os resultados obtidos para a porcentagem de mortalidade dos náuplios pela exposição às soluções cloradas na maior concentração de fipronil (aproximadamente 1 mg/L no poço da placa) por 48 horas.

Conforme observado, dentro de 48 horas de exposição foi identificado o aumento da toxicidade aguda do fipronil em todos os tempos de reação quando comparado com a análise do branco. No entanto, não há diferença significativa, de acordo com teste t (95% de confiança), entre as médias dos valores de mortalidade nos tempos de reação 0, 30 min e 12 horas. O aumento da toxicidade do fipronil só se deu no tempo 24 horas de reação de cloração, em que praticamente 70% dos náuplios apresentaram ausência de mobilidade dentro do período de observação

**Figura 5.5.** Porcentagem de mortalidade dos náuplios de *A. salina* pela exposição por 48 horas às soluções de fipronil pré e pós cloração. Foram avaliados o controle negativo (C.N.), o branco (B) e os tempos de reação 0, 30 min, 12 h e 24 h.



Fonte: próprio autor.

. Os resultados demonstram que o próprio fipronil apresenta toxicidade aos microcrustáceos mesmo antes das reações de cloração. Tal fato era esperado, pois, de acordo com dados da literatura, o fipronil é considerado altamente tóxico para organismos aquáticos em diferentes níveis tróficos (produtor – algas; consumidor primário – microcrustáceo; e consumidor secundário – peixes) (Tabela 5.2).

**Tabela 5.2.** Dados experimentais de toxicidade aguda do fipronil para organismos aquáticos em diferentes níveis tróficos.

<b>Agrotóxico</b>	<b>Organismo</b>	<b>Duração</b>	<b>End Point</b>	<b>Resultado</b>
<b>Fipronil</b>	Peixe	96 horas	LC <sub>50</sub>	0,04 - 0.25 mg/L
	<i>Daphnia magna</i>	48 horas	LC <sub>50</sub>	0,1 – 0,19 mg/L
	Green Algae	96 horas	EC <sub>50</sub>	0,07 mg/L

Fonte: de acordo com Lilia, (2003).

Observou-se que com 15 min de cloração houve a degradação de aproximadamente 95% do fipronil, o que indica que seus subprodutos permanecem tóxicos às larvas de *A. salina*. Isso se dá pela formação dos subprodutos descritos anteriormente, os quais podem contribuir conjuntamente para a manutenção da toxicidade aguda. Conforme descrito na literatura, os metabólitos fipronil-sulfona e fipronil-sulfinil demonstraram ser 6 e 1,9 vezes mais tóxicos, respectivamente, que o composto precursor para espécies de invertebrados aquáticos. Portanto, a cloração da amina primária pode não ter sido suficiente para reduzir a toxicidade desses metabólitos. Além disso, DPB F6 (2,6-dicloro-4-trifluorometil anilina) é classificado como altamente tóxico para organismos aquáticos e seu efeito de longo prazo pode causar danos consideráveis ao meio ambiente de acordo com o Regulamento da UE (CE) No 1272/2008. Embora DBP F6 aparentemente seja um subproduto minoritário da cloração do fipronil, não podemos negligenciar uma possível contribuição deste composto na toxicidade observada.

Apesar da tentativa de inferir quanto às substâncias responsáveis pelo aumento da toxicidade, deve-se considerar a presença de subprodutos não identificados, tais como os DBPs voláteis e semi-voláteis regulados, e, ainda, possíveis efeitos sinérgicos que podem ocorrer na mistura desses compostos.

### **5.2.2. Viabilidade celular por ensaio de MTT utilizando célula HepG2**

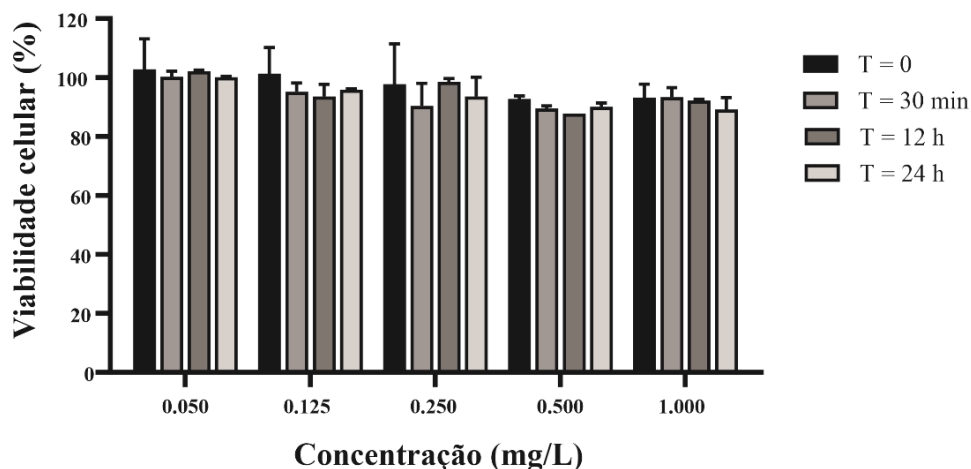
Para a avaliação dos efeitos causados pela cloração do fipronil na viabilidade celular em ensaios com célula de hepatocarcinoma humano (HepG2), avaliou-se a atividade enzimática mitocondrial pelo teste colorimétrico de MTT. Conforme já descrito anteriormente, as células foram submetidas ao contato por 48 horas com as soluções cloradas nos diferentes tempos de reação e em cinco concentrações. Em seguida, adicionou-se o sal de MTT para a avaliação da formação do sal formazan correspondente, e a viabilidade celular foi quantificada pela análise de

## Capítulo 5. Cloração do fipronil: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade

absorbância em 490 nm (referência 620 nm), sendo os ensaios de controle negativo considerados como 100% de viabilidade celular. Todos os critérios de aceitação do teste, descritos no Capítulo 4, seção 4.3.3, foram respeitados e os resultados estão apresentados na Figura 5.6.

Conforme podemos observar, não foram evidenciados efeitos de redução da viabilidade celular em nenhum tempo de reação que pudesse caracterizar um possível efeito tóxico às células de HepG2. Dessa forma, independentemente de passar ou não por processo de desinfecção por cloração, o fipronil não representou potencial tóxico para as células nas concentrações testadas.

**Figura 5.6.** Avaliação da viabilidade de células HepG2 submetidas à exposição de 48 horas ao fipronil em diferentes tempos de cloração.



Fonte: próprio autor.

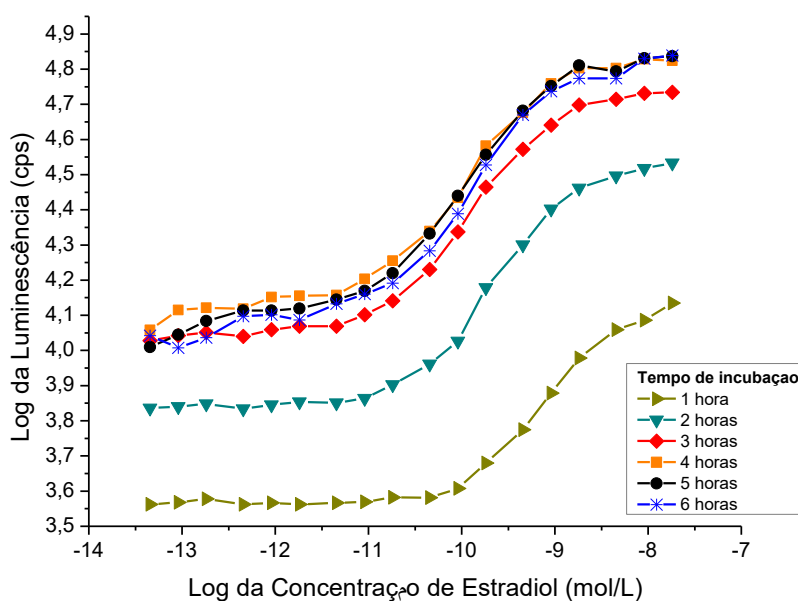
Em estudo recente, Romero et al. (2016) determinaram o efeito tóxico do fipronil em células SH-SY5Y (células de neuroblastoma humano) por meio de ensaio colorimétrico de MTT. Os resultados demonstraram que houve um decréscimo na viabilidade celular de maneira dependente da concentração testada em comparação com o grupo controle, no entanto, as concentrações que apresentaram efeito tóxico significativo foram bastante superiores a testada no presente estudo. De acordo com Romero et al. (2016), somente concentrações superiores a 60  $\mu$ M (26,2 mg/L) demonstraram algum efeito tóxico às células SH-SY5Y, sendo a dose efetiva que causa 50% da redução da viabilidade celular ( $ED_{50}$ ) calculado em 126  $\mu$ M (55,08 mg/L). Tais resultados corroboram com os apresentados no presente estudo, no entanto, não foram encontrados dados referentes à toxicidade de subprodutos da cloração do fipronil para comparação dos resultados dos testes de viabilidade celular.

### 5.2.3. Ensaios de estrogênicidade por levedura BLYES

Previamente à avaliação das amostras dos agrotóxicos, foram estudadas as condições de resposta dos lotes de levedura a exposição ao estradiol, dada a necessidade de determinar as melhores condições de tempo de incubação para a leitura das luminescências, a resposta de EC<sub>50</sub> para o controle positivo, e os possíveis efeitos da matriz utilizada nos ensaios de cloração. A presença de elevadas quantidades de sal ou possíveis contaminantes na matriz poderiam alterar a resposta da estrogênicidade medida para o controle positivo em E2.

Dessa forma, construiu-se a curva de dose/resposta para o E2 em diferentes tempos incubação (1 a 6 horas) da levedura na presença do padrão, conforme pode-se observar na Figura 5.7.

**Figura 5.7.** Curva do padrão E2 para ensaios de estrogênicidade por leveduras BLYES em diferentes tempos de leitura.



Fonte: próprio autor.

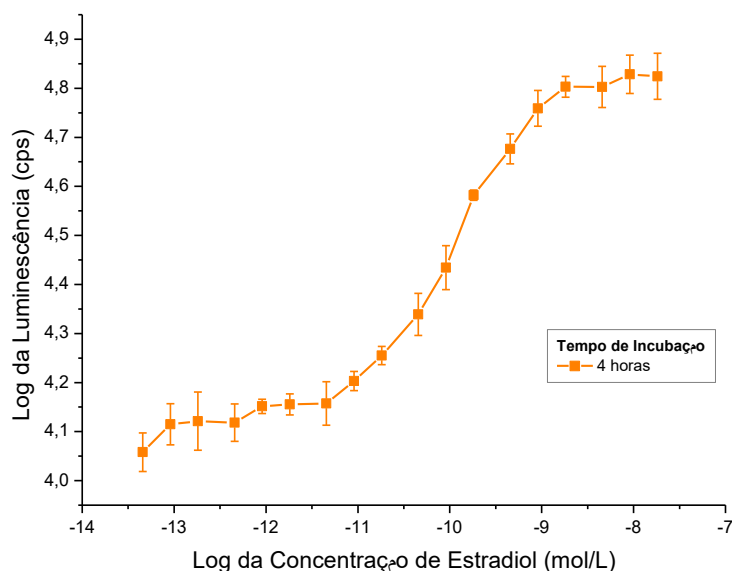
A característica sigmoidal das curvas pode ser observada em todos os tempos de leituras, no entanto, a escolha do tempo deve ser baseada nos maiores valores de luminescência obtidos. Dessa forma, optou-se pela incubação da levedura por 4 horas para posterior leitura no Victor™,

## Capítulo 5. Cloração do fipronil: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade

tendo em vista que tempos superiores não representaram um aumento nas intensidades das respostas.

Definido o tempo ideal de leitura, avaliou-se a precisão dos ensaios envolvendo a construção da curva padrão utilizando a mesma cultura de leveduras. Os ensaios foram conduzidos em quadruplicata, sendo a curva construída com valor médio das respostas de cada ponto e o desvio padrão das mesmas (Figura 5.8).

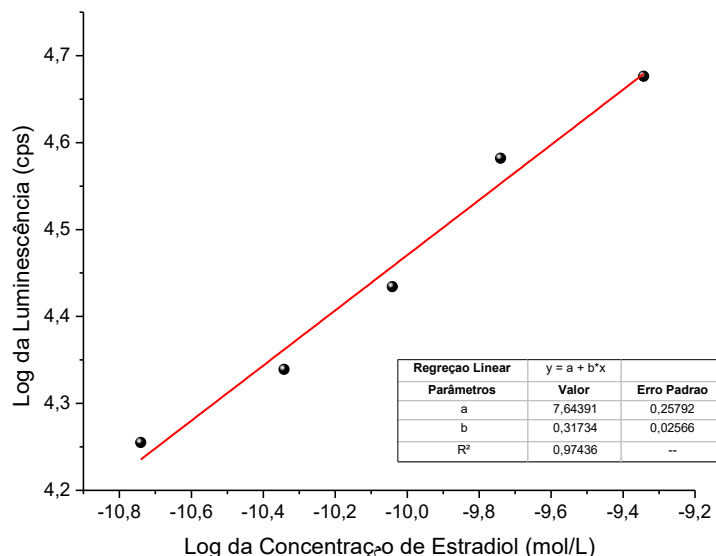
**Figura 5.8.** Quadruplicata da curva do padrão E2 para o ensaio BLYES em 4 horas de exposição.



Fonte: próprio autor.

As respostas de luminescência obtidas nas quadruplicatas apresentaram valores de coeficiente de variação entre 0,71 e 12,6% para todos os pontos da curva, demonstrando, portanto, a reprodutibilidade dos ensaios envolvendo a mesma cultura de leveduras na construção da curva padrão. Para a análise dos dados, plotou-se a porção linear da curva sigmoideal e determinou-se o  $EC_{50}$  pelo cálculo da concentração molar que causou a resposta de luminescência no ponto médio da porção linear da sigmoide. Os resultados obtidos para o ensaio estão representados na Figura 5.9 e na Tabela 5.3, onde podem ser melhor compreendidos os cálculos matemáticos utilizados no tratamento dos dados.

**Figura 5.9.** Porção linear da curva sigmoide utilizada para a determinação do EC50 do E2 após 4 horas de incubação da levedura.



Fonte: próprio autor.

**Tabela 5.3.** Cálculo do valor de EC50 para o padrão de E2 com 4 horas de incubação.

Parâmetro	Definição	Valor
<b>L<sub>0</sub></b>	Media da menor luminescência	11430,67
<b>L<sub>i</sub></b>	Media da maior luminescência	67341,75
<b>L<sub>m</sub></b>	$L_m = (L_i - L_0)/2 + L_0$	39386,21
<b>log L<sub>m</sub> (Valor y)</b>	Ponto médio da regressão linear	4,595344174
<b>B</b>	Inclinação da reta	0,31734
<b>A</b>	Interceptação da reta	7,64391
<b>log EC<sub>50</sub> (valor X)</b>	$\log EC_{50} = (\log L_m - a)/b$	-9,606623263
<b>EC<sub>50</sub> (mol/L)</b>	Concentração de E2 que induz metade da resposta máxima de luminescência	2,47387E-10
<b>Limite detecção (ng/L)</b>	Resposta distinguível da luminescência de background (média dos brancos + 3 × SD)	1,20

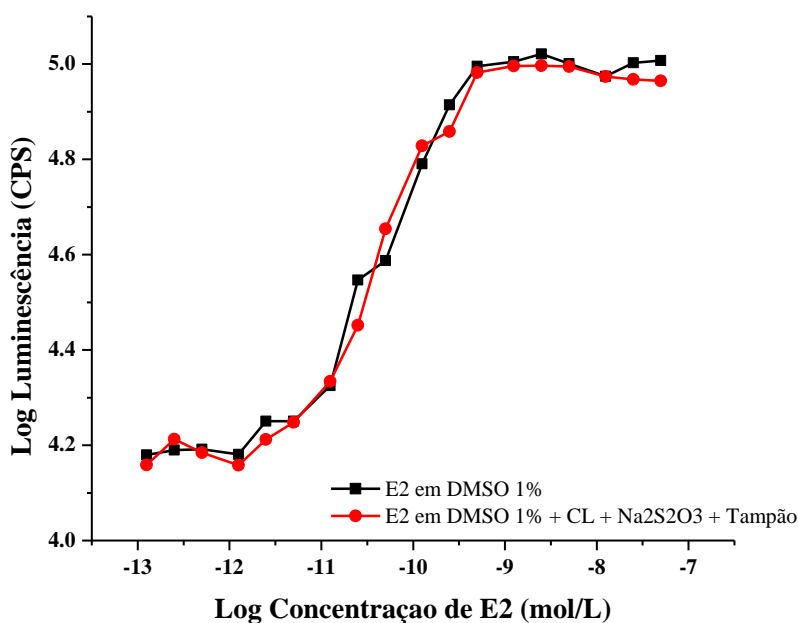
Confirmado a viabilidade das leveduras testadas, avaliou-se a possibilidade de interferência da matriz utilizada nos testes de cloração, a fim de definir possíveis problemas com a elevada concentração de sal e/ou a presença de algum interferente. Conforme observado na Figura 5.10, não houve diferença significativa no perfil das curvas sigmóides e os valores de EC<sub>50</sub>,



## Capítulo 5. Cloração do fipronil: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade

apresentados na Tabela 5.4, mantiveram-se na ordem de  $10^{-10}$  conforme recomendado para a continuidade dos ensaios.

**Figura 5.10.** Curvas do padrão de E2 em DMSO 1% e com adição da matriz utilizada nos ensaios de cloração (DMSO 1% + Cloro Livre (CL) +  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  + tampão fosfato) para avaliação de interferência.



Fonte: próprio autor.

**Tabela 5.4.** Valores de  $\text{EC}_{50}$  e limite de detecção (LD) para as curvas em DMSO 1% e na matriz utilizada nos ensaios de cloração.

Matriz	$\text{EC}_{50}$	Limite de Detecção
DMSO 1%	1.94E-10	1,42 ng/L de E2
DMSO 1% + CL + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ + tampão fosfato	1.01E-10	0,75 ng/L de E2

Os valores determinados para  $\text{EC}_{50}$  foram satisfatórios quando comparados com dados da literatura. Sanseverino *et al.* (2005), por exemplo, determinaram o  $\text{EC}_{50}$  para a curva padrão de  $2,0 (\pm 1,0) \times 10^{-10}$  mol/L, já Bergamasco *et al.* (2011) encontraram valor de  $\text{EC}_{50}$  de  $4,41 \times 10^{-10}$  mol/L. Em um outro estudo de avaliação de estrogênicidade de microcontaminantes orgânicos tais como

## ***Capítulo 5. Cloração do fipronil: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade***

---

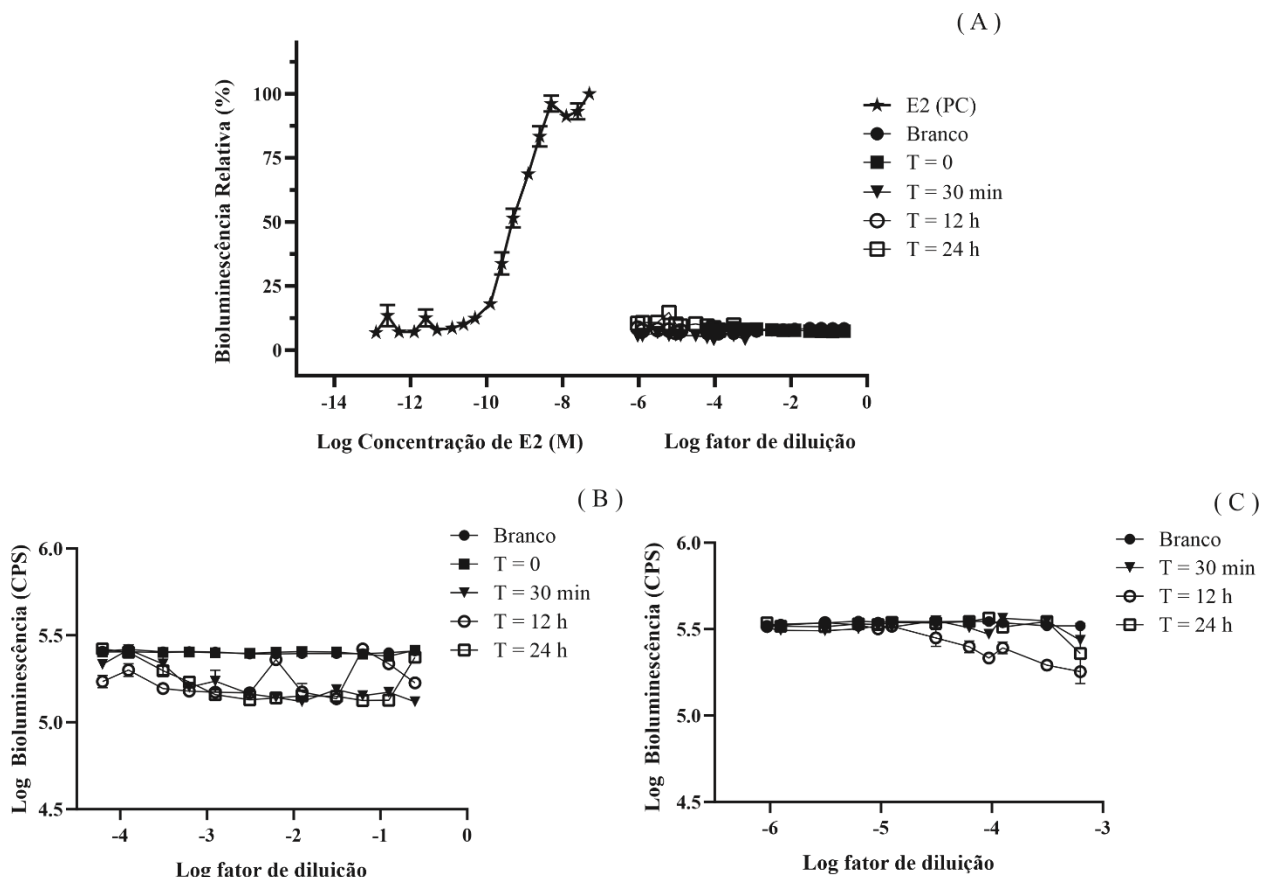
fármacos, agrotóxicos, plastificantes, entre outros, Sanseverino *et al.* (2009) determinaram o EC<sub>50</sub> para o padrão de E2 de  $6,3 (\pm 2,4) \times 10^{-10}$  mol/L.

Evidenciou-se, portanto, que as elevadas quantidades de sais adicionadas nos ensaios não causaram efeito indesejável na análise da estrogênicidade. A *S. cerevisiae* torna-se um modelo interessante para esses estudos *in vitro* por possuir elevada adaptabilidade a situações de estresse, uma vez que elas desenvolvem uma rápida resposta molecular para reparar possíveis danos e proteger estruturas celulares dos efeitos causados por variações ambientais mais bruscas, tais como estresse osmótico (Sant'ana, 2009). Dessa forma, é possível analisar diferentes matrizes ambientais sem que as mesmas possam conduzir a morte da levedura e comprometer a análise de estrogênicidade. É importante destacar que os ensaios de BLYES foram acompanhados dos ensaios BLYR para a avaliação de qualquer toxicidade que as soluções padrões pudessem causar às leveduras, e, como já esperado, não houve redução da luminiscência que caracterizasse qualquer dano a mesmas.

Tendo em vista os resultados sobrescritos, iniciou-se os ensaios BLYES para as amostras geradas no processo de cloração. Foram preparadas, conforme já descrito anteriormente, 12 diluições de cada amostra nos tempos de reação específicos. Além disso, é importante destacar que para cada placa utilizada para o ensaio das amostras foi construída uma nova curva padrão E2, seguindo as mesmas concentrações dos resultados discutidos anteriormente sobre a padronização do ensaio de estrogênicidade. Como observado na Figura 5.11 (A), o ensaio BLYES gerou, na média das respostas entre as placas, uma curva dose resposta típica para E2 com valores médios de EC<sub>50</sub> e LD de  $6,68 (\pm 0,63) \times 10^{-10}$  mol/L e  $5,18 (\pm 0,45)$  ng/L, respectivamente.

Com relação às amostras, podemos perceber que não houve aumento da luminescência emitida pelas leveduras BLYES na análise do fipronil para as soluções submetidas ou não à cloração (Figura 5.11 (A)), não sendo detectado qualquer atividade estrogênica dentro da faixa de concentração estudada. Por outro lado, não foi possível avaliar a estrogênicidade das soluções pós-cloração nas mesmas condições da solução de fipronil inalterado, uma vez que os subprodutos conferiram alta toxicidade às leveduras no ensaio BLYR, conforme apresentado na Figura 5.11 (B). As amostras cloradas mostraram-se altamente tóxicas para a cepa BLYR, enquanto a solução não reagida de fipronil não apresentou toxicidade para nenhuma das concentrações testadas.

**Figura 5.11.** Dados dos ensaios BLYES e BLYR para controle positivo, branco, soluções não reagidas ( $T = 0$ ) e cloradas em diferentes tempos de reação (30 min; 12 e 24 h). A Fig. 3 (A) mostra a curva dose-resposta obtida para os ensaios BLYES. As Fig. 3 (B) e Fig. 3 (C) apresentam as diluições necessárias para que as amostras não fossem tóxicas para as cepas de leveduras.



Fonte: próprio autor.

De acordo com Figura 5.11 (B), pode-se observar que o fipronil incólume ( $T = 0$ ) apresentou a mesma resposta do controle branco do ensaio, sendo ambas as curvas praticamente coincidentes. Para ambas as soluções, os valores de bioluminescência para todas as diluições testadas foram similares ao controle negativo (A: água ultrapura; B: solução de DMSO a 1% em água ultrapura) no ensaio BLYR. Por outro lado, todas as soluções cloradas ( $T = 30$  min; 12 e 24 h) causaram mais de 20% de redução ( $IC_{20}$ ) na bioluminescência emitida para a maioria das diluições testadas (Fig. 3 (B)). A diminuição da bioluminescência no ensaio BLYR pode causar resultados falsos negativos no ensaio BLYES. Nestes casos, níveis de diluição adequados devem ser realizados com a finalidade de reduzir a toxicidade da amostra para, em seguida, medir a atividade estrogênica.

## ***Capítulo 5. Cloração do fipronil: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade***

---

Dessa forma, construiu-se uma nova curva mais diluída para as soluções cloradas que pode ser observado na Figura 5.11 (C). As amostras T = 30 h e T = 24 h foram pelo menos 800 vezes mais tóxicas que a solução de fipronil e, no pior caso (12 h), pelo menos 20.000 vezes. Os dados plotados na Figura 5.11(A) são apenas aquelas diluições que não se mostraram tóxicas para a cepa BLYR. É importante ressaltar que esse efeito não pode ser atribuído ao cloro livre ou ao tiosulfato de sódio, uma vez que as mesmas concentrações de ambos foram adicionadas nas soluções controle, não reagida e clorada. O cloro livre foi previamente consumido pelo tiosulfato para preparar a solução T = 0.

Apenas como forma de comparação, levando-se em conta a concentração inicial de fipronil em todas as soluções e desconsiderando-se as reações, as soluções cloradas foram testadas em concentrações que variaram de 1,25 a 625 ng/L, enquanto o fipronil foi testado em concentrações que variaram de 125 a 500.000 ng/L. O efeito tóxico das amostras cloradas no crescimento de células de levedura causou uma diminuição da confiabilidade do resultado de atividade estrogênica medida. Portanto, é possível afirmar apenas que não foi identificada atividade estrogênica nas concentrações testadas neste estudo para o fipronil e sua solução clorada, mas não há como inferir se houve acréscimo na atividade estrogênica uma vez que as soluções cloradas podem ter sido testadas em concentrações equivalentes de E2 muito inferiores ao limite de detecção do método.

Muito embora o ensaio de estrogenicidade não seja ideal para a discussão de toxicidade, dado o modelo de organismo utilizado, não se pode ignorar o fato de que a cloração do fipronil tenha conferido uma toxicidade muito superior à *S. cerevisiae* quando comparado com o agrotóxico não degradado.

Ressalta-se que os ensaios de bioluminescência à base de levedura são um dos métodos para determinar a atividade hormonal de um composto. Assim, dada a alta sensibilidade das leveduras às concentrações dos DBPs testados, a caracterização detalhada da atividade hormonal deve ser investigada em outros ensaios *in vitro* e *in vivo* para soluções cloradas de fipronil para a obtenção de resultados mais confiáveis acerca dos efeitos estrogênicos dessas soluções.

### **5.2.4. Predição de toxicidade por método Q(SAR)**

Os ensaios de toxicidade *in silico* são uma ferramenta importante na avaliação preliminar de possíveis efeitos tóxicos de substâncias, com a finalidade de reduzir gastos, tempo e,

**Capítulo 5. Cloração do fipronil: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade**

principalmente, a utilização de animais vivos em ensaios biológicos para a avaliação de novos compostos. Portanto, utilizou-se a ferramenta de predição T.E.S.T (U.S. EPA) para a obtenção de resultados preliminares de toxicidade complementares aos obtidos no presente estudo. Uma vez que as análises de toxicidade aguda para organismos aquáticos (*A. salina*), a citotoxicidade para células de hepatoma humano (HepG2), e a estrogênicidade por leveduras gene repórter foram desenvolvidos por métodos tradicionais *in vitro* e *in vivo*, optou-se por avaliar, utilizando a ferramenta computacional, o potencial mutagênico e a toxicidade de desenvolvimento das substâncias geradas no processo de cloração. Os resultados obtidos pelo software T.E.S.T., aplicando-se o método “consensus”, estão apresentados na Tabela 5.5.

**Tabela 5.5.** Predição da toxicidade dos subprodutos de cloração do fipronil via metodologia *in silico* pelo software T.E.S.T. da U.S.EPA.

Compostos	Mutagenicidade (baseado teste Ames)				Toxicidade de desenvolvimento			
	Predição Valor/Resultado	Validação			Predição Valor/Resultado	Validation		
		Conc. <sup>a</sup>	Sens. <sup>b</sup>	Esp. <sup>c</sup>		Conc.	Sens.	Esp.
FIPRONIL	<b>0,56 (positivo)</b>	0,75	0,00	1,00	N/C <sup>d</sup>	1,00	1,00	N/A <sup>e</sup>
DBP F1	<b>0,65 (positivo)</b>	0,75	0,00	1,00	N/C	1,00	1,00	N/A
DBP F2	0,31 (negativo)	0,75	0,60	1,00	<b>0,56 (positivo)</b>	1,00	1,00	N/A
DBP F3	0,21 (negativo)	1,00	1,00	1,00	<b>0,94 (positivo)</b>	1,00	1,00	N/A
DBP F4	0,34 (negativo)	0,90	0,67	1,00	<b>0,75 (positivo)</b>	1,00	1,00	N/A
DBP F5	0,00 (negativo)	1,00	N/A	1,00	<b>0,69 (positivo)</b>	1,00	1,00	N/A
DBP F6	0,04 (negativo)	1,00	N/A	1,00	0,34 (negativo)	0,83	1,00	0,67

<sup>a</sup>Conc: concordância; <sup>b</sup>Sens: sensibilidade; <sup>c</sup>Esp: especificidade;

<sup>d</sup>N/C: não calculado porque há apenas um valor previsto. O método de “consensus” é baseado no valor médio de 2 ou mais valores previstos de diferentes métodos Q (SAR);

<sup>e</sup>N/A: não aplicável porque não há composto ativo (sensibilidade) ou composto inativo (especificidade) semelhante no conjunto de treinamento.

Conforme observado na Tabela 5.5, os valores preditos para mutagenicidade, baseado no método “consensus”, demonstraram efeito positivo para o fipronil e seu DBP F1, indicando, ainda, maior toxicidade do composto formado pela cloração quando comparado com o precursor. Por outro lado, todos os outros compostos formados não apresentaram efeito mutagênico de acordo com a metodologia Q(SAR). De acordo com os parâmetros de validação, as predições demonstraram alto valor de concordância (> 0.75), indicando precisão dos modelos aplicados para o cálculo da toxicidade dos compostos avaliados.

## ***Capítulo 5. Cloração do fipronil: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade***

---

Os dados encontrados na literatura têm demonstrado resultados ambíguos para a mutagenicidade do fipronil (Egorova, Ilyushina e Rakitskii, 2020). De acordo com Lilia, (2003), vários testes biológicos apontaram para a ausência de efeito mutagênico do fipronil, tais como: um ensaio Ames com e sem ativação S-9, um ensaio citogênico *in vitro* utilizando linfócitos humanos, dois ensaios de mutação do gene de hamster chinês, e um teste de micronúcleo em camundongo. Mais recentemente, Egorova, Ilyushina e Rakitskii (2020) também demonstraram que fipronil não foi mutagênico em teste Ames, mas foi mutagênico em ensaios *in vivo*. Girgis e Yassa, (2013) e De Oliveira, *et al.*, (2012) identificaram efeitos mutagênicos e genotóxicos em ratos e camundongos administrados com esse inseticida. Não foram encontrados dados de mutagenicidade para os DBPs formados pela cloração do fipronil.

Com relação a toxicidade de desenvolvimento, o valor predito para o fipronil não foi calculado, uma vez que apenas um dos métodos foi capaz de fazer a predição, sendo positivo para o modelo FDA, com valor predito de 0,97. No entanto, o método “consensus” é baseado na média dos valores preditos de 2 ou mais métodos.

Embora não calculado, fipronil tem sido reportado como composto tóxico para o desenvolvimento em dados encontrados na literatura. De acordo com Šefčíková *et al.* (2018), fipronil impactou negativamente o desenvolvimento embrionário de camundongos em concentrações iguais ou superiores a 1 µM em meio de cultura (ensaio *in vitro*). Já os ensaios *in vivo*, de acordo com o mesmo estudo, demonstraram que o fipronil a 0.9 mg/Kg/dia afetou o desenvolvimento dos embriões de camundongos. Ademais, mesmo na dose de referência aguda (0,009 mg/kg/dia) os blastocistos coletados no quarto dia de gestação exibiram maior incidência de células mortas que no grupo de embriões de mães controle (Šefčíková *et al.*, 2018b).

Estudos envolvendo embriões e larvas de peixe-zebra (Zebrafish - *Danio rerio*) demonstraram que o fipronil aumenta a mortalidade e reduz a proliferação celular, causa edema e altera os batimentos cardíacos, desenvolve problemas neurogênicos no estágio inicial de vida, provoca má formação das vias locomotoras espinhais em peixes, entre outros efeitos adversos (Park *et al.*, 2020; Stehr *et al.*, 2006). Esse modelo animal tem sido extensivamente utilizado para a avaliação de toxicidade de desenvolvimento devido ao curto tempo de embriogênese, fácil manipulação, a transparência do embrião que facilita a observação de alterações no seu desenvolvimento, sequências genéticas altamente desenvolvidas e com alta homologia genética com humanos (cerca de 80%), um sistema de órgãos semelhante aos mamíferos, entre outras

## ***Capítulo 5. Cloração do fipronil: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade***

---

vantagens (Park *et al.*, 2020). Portanto, o ensaio do peixe-zebra pode ser considerado uma ferramenta valiosa para a seleção de compostos que podem causar efeitos tóxicos no desenvolvimento de mamíferos, incluindo humanos.

Por outro lado, não existem estudos envolvendo a avaliação da toxicidade dos DPBs formados pela cloração do fipronil. De acordo com os resultados previstos (Tabela 5.5), os DPBs gerados também podem produzir efeitos tóxicos para o desenvolvimento de animais e humanos. Os DBPs F2, F3, F4 e F5 demonstraram toxicidade para o desenvolvimento de acordo com métodos baseados em Q(SAR). Além disso, os altos valores de “concordância” (> 0,83) obtidos para este endpoint indicam que os resultados são bastante confiáveis. Infelizmente, não foi possível prever se os DBPs formados podem ser mais ou menos tóxicos do que o composto original, uma vez que o valor de toxicidade para o fipronil não foi calculado.

Assim, os resultados previstos demonstraram que a cloração pode produzir um composto mais mutagênico do que o fipronil. Os DBPs gerados também mostraram-se tóxicos para o desenvolvimento, embora não tenha sido possível medir a potência relativa dos DBPs em relação ao composto original. Destaca-se que as metodologias *in silico* são baseadas em cálculos matemáticos e os resultados devem ser avaliados com cautela e com o objetivo principal de serem uma ferramenta importante para a triagem de futuros ensaios *in vitro* e *in vivo*. Vale ressaltar também que a metodologia Q(SAR) não leva em consideração os efeitos sinérgicos desses compostos em misturas complexas. Portanto, esses efeitos adversos devem ser melhor investigados em estudos futuros.

### **5.3. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos revelaram a alta reatividade do fipronil ( $t_{1/2} = 2.08$  min) mesmo em baixas concentrações (20 µg/L) em reações envolvendo a cloração em meio aquoso utilizando hipoclorito de sódio (2 mg/L de cloro livre) como agente químico de desinfecção de águas. A degradação do agrotóxico chegou a 93% dentro de 15 minutos de exposição ao cloro, tempo mínimo de contato recomendado para processos de desinfecção envolvendo cloração em ETAs. Foram identificados, via espectrometria de massas de alta resolução, a formação de 6 subprodutos de degradação, fato que deve ser levado em consideração quando da avaliação de risco ao meio ambiente e, principalmente, à saúde humana.

## ***Capítulo 5. Cloração do fipronil: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade***

---

Nesse sentido, avaliou-se a toxicidade das soluções submetidas à cloração pela aplicação de testes biológicos baseados em métodos *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. Os resultados demonstraram que os subprodutos formados foram tóxicos para *A. salina* em todos os tempos de reação, inclusive para o tempo zero, em que o fipronil se apresentava inalterado. Embora todas as soluções resultantes da cloração tenham apresentado toxicidade aguda a esses microcrustáceos, apenas a exposição ao cloro livre por 24 horas tornou a solução ligeiramente mais tóxica que o composto precursor. Já os testes de viabilidade celular por MTT e estrogenicidade por leveduras BLYES não demonstraram efeitos adversos das soluções pré e pós-cloração para os modelos utilizados nos ensaios. Ressalta-se, no entanto, que os subprodutos formados foram extremamente tóxicos às leveduras aplicadas nos testes de estrogênicidade e, tal fato, pode ter dificultado a detecção de atividade estrogênica, uma vez que os ensaios só foram viabilizados pela diluição das amostras a níveis de concentração inferiores a 1 ppb, se considerado a concentração inicial de fipronil.

De forma complementar, os ensaios *in silico* indicaram que a cloração pode gerar DBPs potencialmente mutagênicos e tóxicos para o desenvolvimento, sendo que, no caso da mutagênicidade, um dos DBPs formados foi mais tóxico que o composto precursor.

Os resultados obtidos, permitem a afirmação de que o fipronil, quando presente em mananciais de abastecimento público, pode gerar DBPs - inclusive não relatados na literatura - que conferem comprovadamente maior toxicidade aos organismos aquáticos e podem ser potencialmente mais perigosos à saúde humana quando comparados com o composto precursor.

O fipronil tem sido amplamente utilizado em muitos países e, embora seja considerado altamente tóxico para os organismos aquáticos, esse inseticida tem sido frequentemente detectado em corpos d'água. Inclusive, no Brasil, onde legislação é mais permissiva quando comparada às de países desenvolvidos, o fipronil nem sequer figura entre os princípios ativos de agrotóxicos que são regulados pela portaria de potabilidade (Brasil, 2017).



#### 5.4. BIBLIOGRAFIA

ANANDAN, S.; WU, J. J. Effective Degradation of Fipronil Using Combined Catalytic Ozonation Processes. **Ozone: Science and Engineering**, v. 37, n. 2, p. 186–190, 2015.

BERGAMASCO, A. M. *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, n. 11, p. 3288–3293, 2011.

CHAMBERLAIN, E. F. *et al.* Oxidative removal and kinetics of fipronil in various oxidation systems for drinking water treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6895–6899, 2010.

EGOROVA, O. V.; ILYUSHINA, N. A.; RAKITSKII, V. N. Mutagenicity evaluation of pesticide analogs using standard and 6-well miniaturized bacterial reverse mutation tests. **Toxicology in Vitro**, v. 69, n. June, p. 105006, 2020.

GIRGIS, S. M.; YASSA, V. F. Evaluation of the Potential Genotoxic and Mutagenic Effects of Fipronil in Rats. **J. Mediterr. Ecol.**, v. 12, p. 46–52, 2013.

GOMES JÚNIOR, O. *et al.* Optimization of fipronil degradation by heterogeneous photocatalysis: Identification of transformation products and toxicity assessment. **Water Research**, v. 110, p. 133–140, mar. 2017.

HAINZL, D.; CASIDA, J. E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 23, p. 12764–12767, 1996.

LILIA, A. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. New York, NY: Springer New York, 2003. v. 176

MIANJY, J. G.; NIKNAFS, B. H. Photodegradation of Fipronil in Natural Water by High Intensity UV Light Under Laboratory Conditions. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 4, p. 2284–2288, 2013.

NGIM, K. K.; MABURY, S. A.; CROSBY, D. G. Elucidation of fipronil photodegradation pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 4661–4665, 2000.

OLIVEIRA, P. R. DE *et al.* Genotoxic and mutagenic effects of fipronil on mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 6, p. 569–573, 2012.

PARK, H. *et al.* Developmental toxicity of fipronil in early development of zebrafish

(*Danio rerio*) larvae: **Disrupted vascular formation with angiogenic failure and inhibited neurogenesis.** [s.l.] Elsevier B.V., 2020. v. 385

RAVETON, M. *et al.* Phototransformation of the insecticide fipronil: Identification of novel photoproducts and evidence for an alternative pathway of photodegradation. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 13, p. 4151–4157, 2006.

SANSEVERINO, J. *et al.* Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES Expressing Bacterial Bioluminescence for Rapid , Sensitive Detection of Estrogenic Compounds Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES Expressing Bacterial Bioluminescence for Rapid , Sensitive Detection of Estrogenic Com. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4455–4460, 2005.

\_\_\_\_. Screening of potentially hormonally active chemicals using bioluminescent yeast bioreporters. **Toxicological Sciences**, v. 107, n. 1, p. 122–134, 2009.

SANT'ANA, G. DOS S. **Resposta ao estresse ácido em *Saccharomyces cerevisiae* e efeito protetor do íon sódio na morte celular induzida por ácido.** 2009. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

ŠEFČÍKOVÁ, Z. *et al.* Fipronil causes toxicity in mouse preimplantation embryos. **Toxicology**, v. 410, n. July, p. 214–221, 2018a.

\_\_\_\_. Fipronil causes toxicity in mouse preimplantation embryos. **Toxicology**, v. 410, n. March, p. 214–221, 2018b.

STEHR, C. M. *et al.* The developmental neurotoxicity of fipronil: Notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. **Toxicological Sciences**, v. 92, n. 1, p. 270–278, 2006.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for Drinking-water Quality.** Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254637/1/9789241549950-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 1 jan. 2017.

YI, Y.; THEIS, T. L.; YOUNG, T. C. The Effect of Chlorination on Organocyanide Compounds. **Water Environment Research**, v. 74, n. 1, p. 51–56, 2002.

***CAPÍTULO 6. CLORAÇÃO DO METRIBUZIN:  
DEGRADAÇÃO, FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS  
E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE***

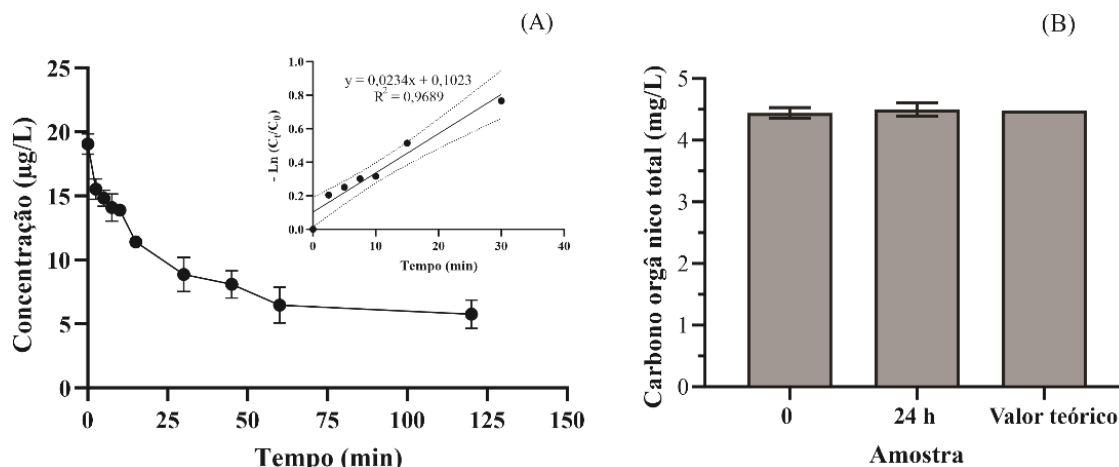
## **6.1. ANÁLISES QUÍMICAS DAS SOLUÇÕES CLORADAS DE METRIBUZIN**

### **6.1.1. Degradação e mineralização do metribuzin**

Os ensaios de degradação do metribuzin foram realizados para avaliar sua reatividade frente às reações de cloração, levando em consideração as baixas concentrações em que este herbicida é encontrado em amostras de água e as concentrações de cloro livre empregadas em ETAs. De acordo com a Figura 6.1 (A), metribuzin demonstrou ser reativo ao cloro com  $k'$  de  $0,0234 \text{ min}^{-1}$ , e  $t_{1/2}$  de 29,5 min, ou seja, 50% de degradação com aproximadamente 30 min de reação, tempo mínimo requerido para a desinfecção efetiva por cloração em ETAs (World Health Organization, 2017). A contribuição da hidrólise sem a presença de cloro e agente de extinção foi negligenciável.

Embora reativo ao cloro livre, os resultados obtidos pela análise de TOC (Figura 6.1 (B)) evidenciaram que não houve mineralização significativa após 24 h de contato entre o metribuzin a 10 mg/L e ao cloro livre em excesso (3 mg de cloro livre para cada mol de carbono presente na solução do agrotóxico), condições essas em que a reação de degradação é ainda mais efetiva dada a alta concentração dos reagentes. É importante destacar que a mineralização é desejável, mas não é o objetivo dos processos de desinfecção em ETAs, embora possa ocorrer. Sistemas de desinfecção envolvendo processos oxidativos avançados (POAs) têm sido a alternativa mais promissora, embora mais cara e ainda muito ausente em ETAs, para a tentativa de reduzir a formação de subprodutos e aumentar, significativamente, a mineralização de compostos orgânicos.

**Figura 6.1.** (A) Degradação do herbicida metribuzin na concentração de 20 µg/L em reação de cloração a 2,0 mg/L de cloro livre. (B) Mineralização do herbicida metribuzin a concentração de 10 mg/L e excesso de cloro livre (3 mg cloro livre/1 mg de C na solução). Valor teórico foi calculado por estequiometria.



Fonte: próprio autor

Em um estudo envolvendo cinética de degradação do metribuzin encontrado na literatura, Hu *et al.* (2017) demonstrou que esse herbicida foi rapidamente degradado e exerceu um rápido consumo do cloro livre durante o tratamento de cloração quando comparado a outros herbicidas. Neste estudo, avaliou-se os efeitos da concentração do agrotóxico e do cloro livre, do pH, da presença de íons brometo e amônio, e da temperatura. Segundo Hu *et al.* (2017), a taxa de degradação aumenta com a concentração do herbicida, do cloro livre e do íon brometo, com o acréscimo de temperatura e em pH ácido; e reduz com a concentração de íon amônio e em pH básico. No entanto, a concentração utilizada do metribuzin foi bastante superior (1 mg/L) às encontradas em amostras de água reais.

Em outro estudo, Chamberlain *et al.*, (2012) avaliaram a degradação do metribuzim em amostras de água de torneira do laboratório, em concentrações entre 1 e 3 µg/L, com a concentração de Cl<sub>2</sub> entre 2 e 5 mg/L. Os valores de concentração cloro x tempo de contato (CT) variaram entre 107 e 173 mg·min/L. De acordo com os resultados obtidos, o metribuzin mostrou-se pelo menos moderadamente reativo ao cloro (degradação de 20 a 50%) em condições levemente ácidas (pH 6,5) e mais recalcitrante em condições básicas (pH 8.5).

Os resultados obtidos no presente estudo para degradação e mineralização do metribuzin mostraram que esse herbicida é reativo em reações de cloração, mas sua mineralização foi desprezível mesmo em concentrações muito superiores às encontradas em amostras de água reais.

Portanto, é importante que sejam estudados os compostos gerados pela cloração desse composto e as questões envolvendo a toxicidade dos mesmos.

### **6.1.2. Identificação e elucidação dos DBPs formados pela cloração do metribuzin**

Apesar da reconhecida contaminação de fontes de água por metribuzin, existem poucos estudos relacionados a sua degradação por cloro em sistemas de abastecimento público. O comportamento desse herbicida, em processos de desinfecção por cloro, é ainda mais desconhecido quando envolve a identificação e elucidação de DBPs formados pela cloração. O único estudo envolvendo a avaliação de DBPs foi publicado por Hu et al. (2017), em que compostos halogenados voláteis, em sua maioria regulados pelas portarias de padrão de potabilidade de água, foram monitorados em reações de cloração desse herbicida.

Dessa forma, a utilização de técnicas analíticas para a elucidação de compostos não alvo, tais como a espectrometria de massas de alta resolução, tornam-se importantes para a investigação mais aprofundada a respeito das reações e subprodutos envolvidos na cloração do metribuzim.

No presente estudo, a utilização de UHPLC-HESI-HRMS forneceu dados consistentes para a identificação e elucidação de 17 subprodutos de cloração do metribuzin. As fórmulas moleculares e estruturais foram propostas com base na massa monoisotópica exata, abundância relativa de isótopos, equivalência de duplas ligações (DBE) e, quando possível, pelo perfil de fragmentação dos íons precursores ( $MS^2$ ) na célula de colisão (Material suplementar - Anexo D). Além disso, realizou-se a comparação do espectro de massa obtidos para as amostras cloradas e com soluções não reagidas e branco. A Tabela 6.1 apresenta as fórmulas moleculares propostas, as relações  $m/z$  teórica e experimental e o erro calculado. Conforme observado, os erros entre as relações  $m/z$  teóricas e experimentais foram inferiores a 1,2 ppm e os compostos, em sua maioria, foram ionizáveis tanto no modo positivo quanto no negativo. Outro parâmetro importante para a proposição das estruturas foi a Equivalência de Duplas Ligações, discutido anteriormente no Capítulo 5, seção 5.1.

**Capítulo 6. Cloração do metribuzin: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade.**

**Tabela 6.1.** Dados obtidos pela análise por UHPLC-HESI-HRMS para o metribuzin e seus subprodutos. Fórmulas moleculares propostas, massa monoisotópica exata, tempo de retenção, relações m/z teórica e experimental, o erro calculado (ppm) e o DBE da formula iônica.

Compostos	Fórmula Molecular	MM <sup>a</sup>	ESI modo negativo				ESI modo positivo				RT <sup>b</sup> (min)
			m/z Teórica	m/z Experimental	Erro (ppm)	DBE	m/z Teórica	m/z Experimental	Erro (ppm)	DBE	
METRIBUZIN	C8H14N4OS	214,08883	213,08155	213,08109	- 0,46	4,5	215,09611	215,09593	- 0,18	3,5	6,57
DBP M1	C8H14N4O4S	262,07358	261,06629	261,06613	- 0,16	4,5	263,08085	263,08087	0,02	3,5	5,63
DBP M2	C7H12N4O4S	248,05792	247,05065	247,05040	- 0,25	4,5					4,43
DBP M3	C7H12N4O4S	248,05792	247,05065	247,05040	- 0,25	4,5					4,80
DBP M4	C8H13N3O4S	247,06268	246,05539	246,05514	- 0,25	4,5	248,06995	248,06992	- 0,03	3,5	5,97
DBP M5	C8H14N4O3S	246,07886	245,07138	245,07102	- 0,36	4,5	247,08594	247,08596	0,02	3,5	5,31
DBP M6	C7H11N3O4S	233,04702	232,03975	232,03991	0,16	4,5	234,05430	234,05413	- 0,17	3,5	4,86
DBP M7	C8H13N3O3S	231,27212	230,06048	230,05971	- 0,77	4,5	232,07504	232,07481	- 0,23	3,5	5,15
DBP M8	C8H13N3O2S	215,07285	214,06557	214,06476	- 0,81	4,5	216,08012	216,07992	- 0,20	3,5	5,40
DBP M9	C7H14N4OS	202,08883	201,08155	201,08090	- 0,65	3,5	203,09611	203,09588	- 0,23	2,5	3,27
DBP M10	C7H11N3O2S	201,05719	200,04992	200,04924	- 0,68	4,5	202,06447	202,06440	- 0,07	3,5	5,65
DBP M11	C7H12N4OS	200,26138	199,06590	199,06494	- 0,96	4,5	201,08046	201,08028	- 0,18	3,5	5,96
DBP M12	C8H13N3OS	199,27332	198,07066	198,06989	- 0,77	4,5	200,08521	200,08532	0,11	3,5	6,04
DBP M13	C7H12N2O2S	188,06195					189,06923	189,06890	- 0,33	2,5	4,35
DBP M14	C7H11N3OS	185,06228	184,05501	184,05423	- 0,78	4,5					6,05
DBP M15	C7H12N4O2	184,09603	183,08875	183,08780	- 0,95	4,5	185,10330	185,10331	0,01	3,5	5,33
DBP M16	C7H11N3O2	169,08513	168,07785	168,07711	- 0,74	4,5	170,09240	170,09226	- 0,14	3,5	5,72
DBP M17	C6H10O3	130,06299	129,05572	129,05452	- 1,20	2,5					2,73

<sup>a</sup>Massa molecular monoisotópica exata; <sup>b</sup>Tempo de retenção obtido pela cromatografia.

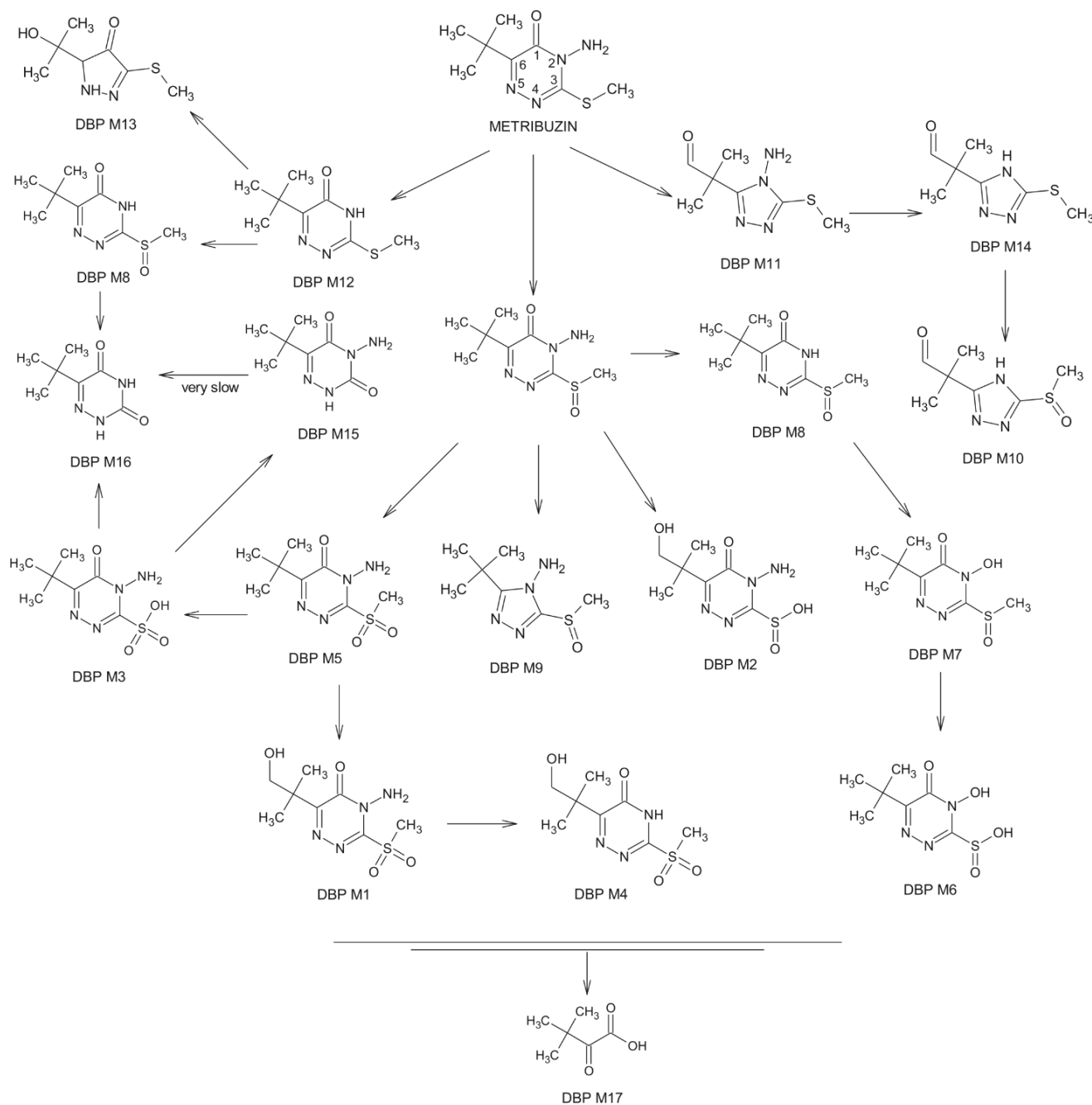
Embora o metribuzin contenha sítios nucleofílicos, o átomo de cloro não foi detectado na estrutura química dos subprodutos. Esperava-se que com a polarização do HOCl ( $Cl^{\delta+} - OH^{\delta-}$ ), ocorreriam reações de substituição eletrofílica em sítios nucleofílicos, principalmente na amina primária, gerando DBPs clorados. No entanto, os compostos identificados foram formados, predominantemente, pela oxidação do enxofre, desaminação da amina primária e, em menor proporção, pela clivagem do anel contendo heteroátomos.

Baseados nos dados da Tabela 6.1, nas relações isotópicas e nos dados de fragmentação por dissociação induzida por colisão (Materiais suplementares, Anexo D), foi possível elucidar as estruturas químicas e propor uma suposta rota de degradação do metribuzin em reações envolvendo à cloração (Figura 6.2). Devido ao elevado número de DBPs e às diversas vias de

## Capítulo 6. Cloração do metribuzin: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade.

degradação que podem ocorrer na cloração do metribuzin, optou-se por ordenar os DBPs de acordo com a suas massas moleculares de forma decrescente, não devendo, portanto, ser interpretado como a ordem em que eles são formados.

**Figura 6.2.** Estruturas químicas dos DBPs formados e suposta rota de degradação do metribuzin em reações de cloração. As setas representam reações envolvendo HOCl e OCl<sup>-</sup> em meio aquoso (presença de H<sup>+</sup>, OH<sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O).



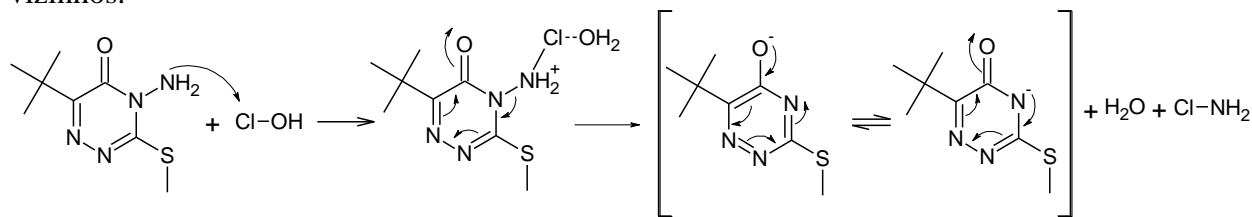
Fonte: próprio autor.



Os DBPs M12, M15 e M16, comumente descritos na literatura, são identificados como desamino-metribuzin (DA), diceto-metribuzin (DK) e desaminodiceto-metribuzin (DADK), respectivamente. Essa rota de degradação é especialmente importante para as questões envolvendo a presença do metribuzin no meio ambiente, uma vez que leva à redução da sua atividade herbicida (Raschke *et al.*, 1998 (b)). Embora ainda existam lacunas a serem discutidas no mecanismo que envolve a formação do DA no meio ambiente, acredita-se que ele seja formado pelo processo chamado de desaminação por fotólise. De acordo com Raschke *et al.*, (1998(a)), a desaminação por fotólise de 1,2,4-triazinonas e -tionas, amino substituídas na posição 4, ocorre somente sob a condição de uma ligação simples ou dupla com enxofre na posição 3 do anel, como observado para o metribuzin (Figura 6.2). Além disso, essa reação também foi condicionada à presença de solventes doadores de prótons, de acordo com estudos prévios (Raschke *et al.*, 1998(a)). As condições acima mencionadas também podem ser decisivas para a desaminação por meio do processo de cloração, embora o mecanismo provavelmente seja diferente.

A hipótese levantada é que a desaminação ocorreu via ataque eletrofílico envolvendo o N da amina primária e cloro livre. A susceptibilidade à clivagem da ligação N–NH<sub>2</sub> pode ter levado à desaminação simultânea após a substituição do cloro na amina primária, liberando cloramina no meio. A rápida desaminação do metribuzin gera compostos mais estáveis devido, principalmente, à estabilização do anel por equilíbrio tautomérico (Figura 6.3).

**Figura 6.3.** Proposta de mecanismo para a desaminação do metribuzin por cloração. Ressalta-se que em meio aquoso as estruturas tautoméricas trocam prótons entre o oxigênio e o nitrogênio vizinhos.



Fonte: próprio autor.

É importante destacar que as reações foram feitas em concentrações elevadas tanto do herbicida quanto do cloro, o que pode ter influenciado na não detecção do intermediário clorado na amina primária. Conforme mencionado anteriormente, o agente de extinção da reação

tiosulfato pode reduzir intermediários clorados, especialmente em amins primárias, para seus respectivos compostos precursores (Dodd e Huang, 2004). No entanto, foram realizados testes utilizando cloreto de amônia como agente de extinção e não foram identificadas diferenças entre os subprodutos formados. Isso reforça nossa hipótese com relação ao mecanismo de desaminação do metribuzin nas condições empregadas nesse estudo.

Seguindo com a rota de degradação do metribuzin, o DBP M12 (DA) em meio oxidativo é rapidamente convertido nos seus derivados da oxidação do enxofre, gerando DBP M8, que em seguida é oxidado para a formação do DBP M16 (DADK). Conforme observado na Figura 6.4, o DBP M12 é rapidamente consumido após 15 min de reação, onde provavelmente a sua taxa de formação passa a ser menor que o seu consumo para a formação dos DBPs M8 e M16.

O DBP M15 (DK) é formado pela oxidação do enxofre sem que ocorra o processo de desaminação. As reações de oxidação do enxofre na molécula do metribuzin levam à formação dos DBP M5 e DBP M3, seguido da dessulfurização da molécula do metribuzin. O DBP M15 (DK) pode ainda sofrer desaminação para formar o DBP M16 (DADK). No entanto, se as condições para esse mecanismo forem as mesmas requeridas para a desaminação por fotólise, como descritas por Raschke *et al.*, (1998(a)), a formação do DBP M16 via DBP M15 provavelmente é bastante lenta. De acordo com Raschke *et al.*, (1998(a)), a desaminação por fotólise é muito lenta quando o enxofre é substituído por outro grupo substituinte, neste caso, o oxigênio. Portanto, o DBP M16 deve ter sido formado, predominantemente, pela desaminação seguida da oxidação do enxofre até o processo de dessulfurização da molécula, obrigatoriamente nessa ordem.

Outra via de degradação identificada foi a hidroxilação do nitrogênio da amida (posição 2) do DBP M8 para a formação do DBP M7. A posição da hidroxilação pode ser confirmada baseada na fragmentação do íon precursor ( $MS^2$ ) com a formação dos íons fragmentos  $m/z$  118,99135 ( $C_2H_3N_2O_2S^-$ ) e 168,07729 ( $C_7H_{10}N_3O_2^-$ ) (Materiais Suplementares, Anexo D). A hidroxilação nessa posição é favorecida pela presença de grupos retiradores de elétrons vizinhos ao nitrogênio, o qual assume carga parcial positiva devido à distorção da nuvem eletrônica, favorecendo, portanto, os ataques nucleofílicos de hidroxilas. Embora não seja possível quantificar os compostos gerados, o DBP M7 possui a maior área cromatográfica entre os DBPs analisados, conforme observado na Figura 6.4. Na sequência, o DBP M7 pode ter seu enxofre oxidado para a formação da DBP M6.

Reações de hidroxilação também ocorreram no grupo substituinte terc-butila para formar os DBP M1, DBP M2 e DBP M4. As reações de hidroxilação nesse grupo substituinte específico são menos favoráveis em clorações sem a presença de radicais hidroxila no meio, onde as reações são pouco específicas e mais desordenadas. No entanto, a distorção da nuvem eletrônica da molécula do ácido hipocloroso torna a hidroxila da molécula um nucleófilo mais reativo frente às reações de substituição nucleofílicas. Esses DBPs são, provavelmente, minoritários nas reações envolvendo a cloração e foram favorecidos pelas condições envolvendo elevadas concentrações do agrotóxico e do agente oxidante empregadas no presente estudo.

Além das reações nas cadeias laterais, foram identificadas reações de clivagem do anel para a formação dos DBP M9, DBP M10, DBP M11, DBP M13, DBP M14 e DPP M17. De acordo com Bull *et al.* (2006), anéis com a presença de heteroátomos são mais susceptíveis às reações envolvendo a oxidação por compostos de cloro (NaOCl, Ca(OCl)<sub>2</sub>, Cl<sub>2</sub>). O DBP M11 é formado pela oxidação da carbonila do anel seguida por um rearranjo da estrutura química para formar um anel aromático de cinco membros altamente estável. Além disso, o grupo terc-butil sofre uma reação de oxidação para formar um aldeído. De acordo com a Fig. 6.4., DBP M11 é rapidamente consumido devido à reação de desaminação, seguida por oxidação do enxofre para formar DBP M14 e DBP M10, respectivamente.

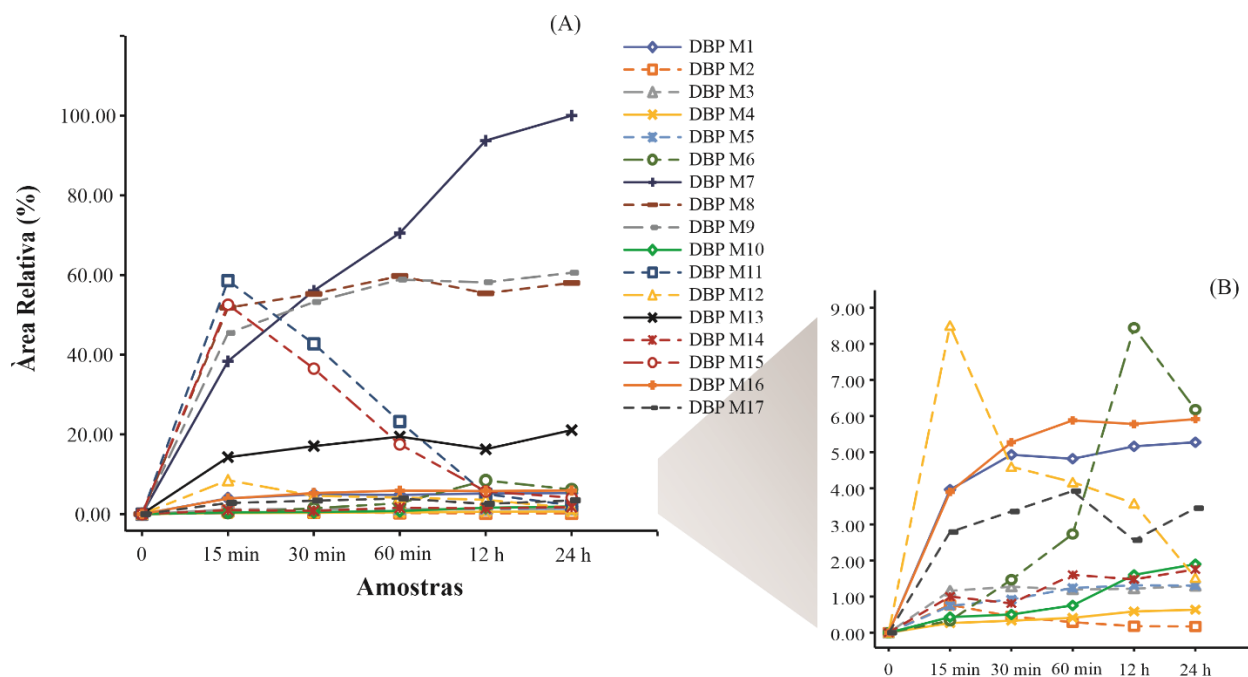
O DBP M13 é formado pelo rearranjo do anel e substituição no grupo terc-butila, provavelmente causado pela oxidação completa de um grupo metila, gerando um álcool terciário. O DBP M13 foi proposto com base nos seguintes íons fragmentos:  $m/z$  143,08214 (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>) e 125,07143 (C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup>) (Materiais suplementares, Anexo D).

O DBP M17 é conhecido como ácido trimetilpirúvico (ácido cetocarboxílico), um insumo importante para a indústria de síntese química. O DBP M17 pode ter sido formado a partir da clivagem do anel de muitos DBPs identificados nesse estudo, não sendo possível definir qual é a rota de formação desse composto. Raschke, *et al.* (1998(b)) também identificou a presença de ácidos cetocarboxílicos, além de ácidos mono e dicarboxílicos, em reações envolvendo a oxidação do metribuzin via fotólise catalítica.

Ressalta-se que intermediários e DBPs contendo átomo de cloro devem ser formados na cloração do metribuzin, visto que Hu *et al.* (2017) evidenciou a formação de DBPs halogenados, tais como: dicloroacetoneitrila, 1,1-dicloro-2-propanona, 1,1-tricloro-2-propanona, tricloronitrometano e, majoritariamente, clorofórmio. Existem muitas possibilidades para a

formação de intermediários clorados, como reações de clivagem de anel e a perda do grupo metila da ligação S-CH<sub>3</sub>, por exemplo. Entretanto, os DBPs identificados neste estudo são aqueles que podem ser analisados pela técnica analítica empregada. Limitações, principalmente relacionadas à capacidade de ionização de alguns compostos via fontes de eletrospray, podem comprometer a identificação de outros compostos de interesse.

**Figura 6.4.** (A) Formação/consumo dos DBPs formados a partir da cloração do metribuzin em diferentes tempos de exposição ao cloro. Figura (B) é a ampliação de uma porção da Figura (A) para examinar, em detalhes, os DBPs detectados em baixa intensidade (área relativa < 10%).



Fonte: próprio autor.

## 6.2. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO METRIBUZIN PRÉ E PÓS-CLORAÇÃO

O metribuzin é um princípio ativo bastante utilizado no mundo principalmente pela sua eficiência herbicida, mas também devido à suposta segurança para o meio ambiente e para a saúde humana. No entanto, não há estudos avaliando a presença e a toxicidade de seus subprodutos de degradação via reações de cloração em ETAs. Dessa forma, a avaliação da toxicidade desses compostos foi realizada através de ensaios de toxicidade *in vitro*, *in vivo* e *in silico*, com o objetivo de identificar os possíveis riscos associados à contaminação da água potável por esses DBPs.

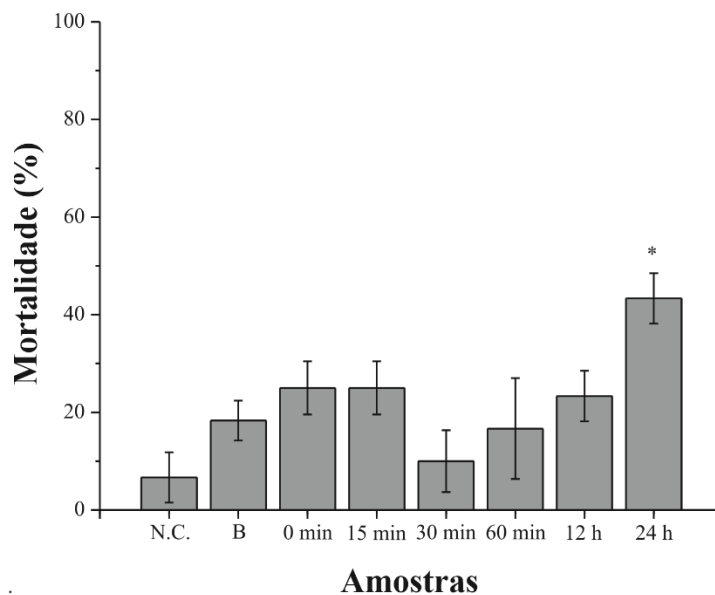
Para os ensaios envolvendo o metribuzin, foram selecionadas as soluções do agrotóxico inalterado (0 min) e após a cloração com 15, 30 e 60 min, 12 e 24 horas de exposição ao cloro. Os resultados da toxicidade são descritos e discutidos na sequência.

### **6.2.1. Toxicidade aguda por *Artemia salina***

No presente estudo, a proposta de utilização de náuplios de *Artemia salina* teve como objetivo identificar alterações significativas de toxicidade aguda do metribuzin e de seus subprodutos de cloração para esse microcrustáceo.

Baseado nos resultados apresentados na Figura 6.5, não houve aumento significativo (teste Tukey a 95% de confiança) na toxicidade das soluções de tempo 15, 30, 60 min e 12 horas quando comparadas com o branco do ensaio. Por outro lado, a solução submetida a 24 h de cloração apresentou aumento significativo de toxicidade (em torno de 20% em relação ao branco) para os náuplios após 48 h de exposição. Embora não tenha sido possível quantificar a contribuição relativa de cada DBP na toxicidade total da mistura, os subprodutos DBP M1, M9, M10, M13 e M14 foram os únicos a apresentar um aumento em sua intensidade entre os tempos de 12 e 24 h. Assim, esses compostos podem ter uma maior contribuição na toxicidade em comparação com os outros avaliados nesse estudo. No entanto, a presença de DPBs não identificados e o efeito sinérgico na mistura devem ser considerados.

**Figura 6.5.** Mortalidade (%) dos náuplios de *Artemia salina* após 48 h de exposição às soluções de metribuzin antes (0) e após (15, 30 e 60 min, 12 e 24 h) a etapa de cloração. N.C. foram os experimentos de controle negativo e B o branco do ensaio químico.



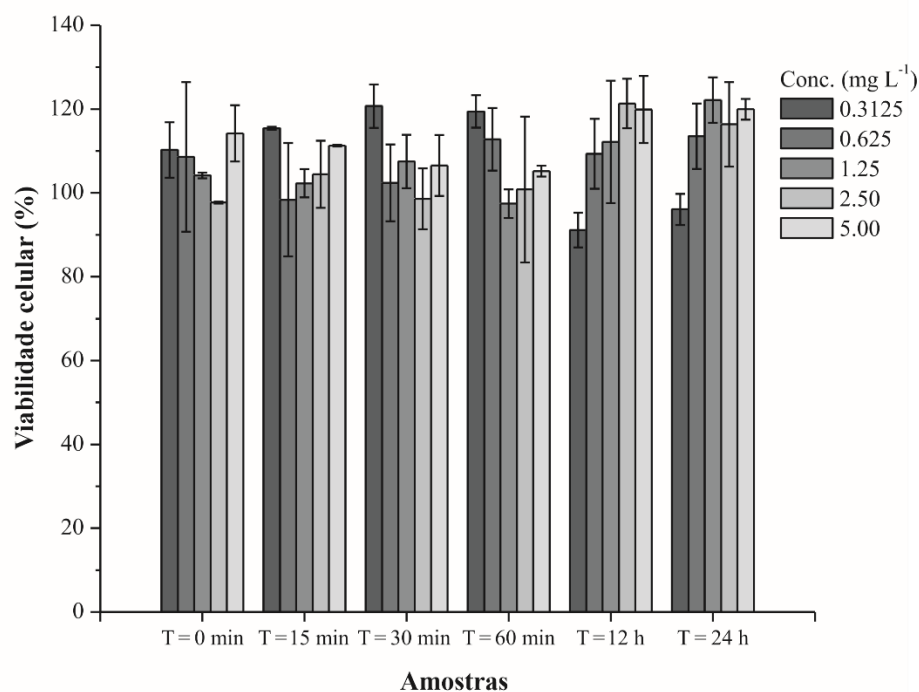
Fonte: próprio autor.

Em estudos de ecotoxicidade aquática, o metribuzin mostrou-se praticamente não tóxico ou levemente tóxico para peixes e invertebrados de água doce ou marinhos/estuarinos. Os efeitos adversos ao meio ambiente estão relacionados a sua alta toxicidade às espécies de plantas aquáticas não alvos (EPA, 1998). Com os resultados obtidos, acredita-se que os DBPs formados possam aumentar os riscos ao meio ambiente, uma vez que a *A. salina* é considerada uma espécie muito mais resistente à contaminação quando comparada a outros modelos experimentais de invertebrados aquáticos, como a *Daphnia magna* por exemplo. É importante destacar que o metribuzin é encontrado em baixas concentrações no meio ambiente, na ordem de ng/L a µg/L, e que, devido ao efeito de diluição dos efluentes de ETAs em ambientes aquáticos, os DBPs formados por esse herbicida certamente estarão em concentrações ainda menores. No entanto, a avaliação da toxicidade aguda para *A. salina* é importante para entender o comportamento desses contaminantes e para futuros estudos a respeito da toxicidade aguda e crônica para espécies ainda mais sensíveis, determinando assim, se essas concentrações muito baixas, que podem estar presentes em ambientes aquáticos, são completamente seguras.

### 6.2.2. Viabilidade celular por ensaio de MTT utilizando células HepG2

Os efeitos das soluções de metribuzin na viabilidade celular foram avaliados pela medição da atividade da desidrogenase mitocondrial de células viáveis, usando ensaio colorimétrico de MTT. As células de hepatocarcinoma humano (HepG2) foram submetidas a 48 h de exposição às soluções cloradas de metribuzin em diferentes tempos de contato com o cloro (0, 15, 30 e 60 min, 12 e 24 h) e à 5 níveis de concentração (0.3125 a 5,0 mg/L). A porcentagem de células viáveis foi calculada em função da absorbância média das réplicas do controle negativo (meio de cultura e PBS). De acordo com a Figura 6.6, não foi evidenciada redução da viabilidade celular, mesmo após 48 h de exposição às soluções, que representasse efeitos tóxicos nas células nas condições descritas no presente estudo.

**Figura 6.6.** Viabilidade celular de células HepG2 após 48 h de exposição às soluções de metribuzin pré e pós etapa de cloração.



Fonte: próprio autor.

Testes de viabilidade celular para o metribuzin não foram encontrados na literatura, no entanto, este herbicida foi descrito como leve a moderadamente tóxico para animais e humanos

em ensaios *in vivo* baseados em exposição aguda e crônica/subcrônica. Os subprodutos DA, DK e DADK-metribuzin foram considerados 2 a 3 vezes mais tóxicos que o composto precursor em testes de toxicidade aguda via exposição oral, mas existem poucas informações toxicológicas para esses derivados do metribuzin (Chiali *et al.*, 2013; EPA, 1998, 2003).

Embora não tenha sido possível concluir sobre a citotoxicidade de cada DBP formado no processo de cloração, os resultados indicam que não houve aumento da toxicidade das soluções cloradas nas condições empregadas neste teste de viabilidade celular.

### **6.2.3. Ensaio de estrogênicidade utilizando leveduras BLYES**

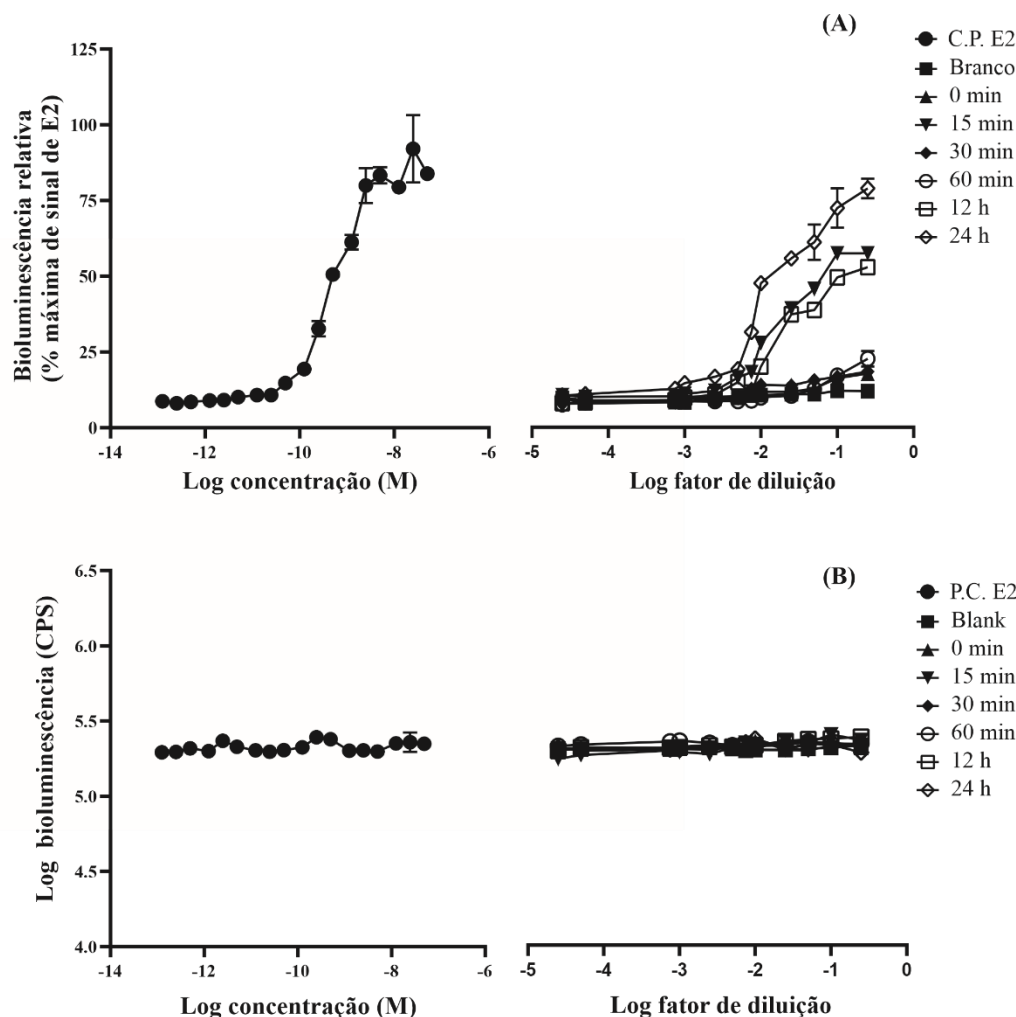
Previamente à análise de estrogênicidade das soluções de metribuzin, foram avaliadas a viabilidade das leveduras, a resposta ao padrão E2, os melhores tempos de incubação do ensaio e a possível interferência dos sais da matriz na cultura de leveduras. Os resultados foram discutidos no Capítulo 5, seção 5.3.2, e valem para a avaliação da estrogênicidade do metribuzin.

Conforme já mencionado, as amostras do agrotóxico não reagido e clorado, em diferentes tempos de contato, foram diluídas em 12 níveis de diluição. Os dados das amostras foram plotados em função da resposta máxima de bioluminescência de E2 (Bioluminescência relativa (%)) versus o log da concentração de E2 ou log do fator de diluição das amostras (Figura 6.7 (A)). Para os ensaios de BLYR, os quais controlam possíveis efeitos tóxicos das amostras para as leveduras, os dados foram plotados em escala logarítmica para ambos os eixos: bioluminescência versus concentração de E2 ou fator de diluição das amostras (Figura 6.7 (B)).

Ressalta-se que uma curva padrão foi construída para cada placa de 96 poços, sendo os cálculos de equivalente de E2 para cada amostra referentes à curva padrão da respectiva placa. No entanto, os resultados de estrogênicidade dos padrões E2 para as leveduras BLYES foram plotados considerando a média e o desvio padrão das respostas de todas as placas. De acordo com os resultados do controle positivo E2, o ensaio BLYES mostrou sensibilidade similar ao E2 quando comparado a outros estudos encontrados na literatura (Bergamasco, *et al.*, 2011; Sanseverino *et al.*, 2009). O valor médio de EC<sub>50</sub> e LD obtidos para o padrão E2 foram  $5,35 \pm 1,92 \times 10^{-10}$  mol/L e  $5,47 \pm 1,70$  ng/L, respectivamente.



Figura 6.7. Dados do ensaio BLYES (A) e BLYR (B) para o controle positivo E2, branco, soluções de metribuzin antes e após a cloração.



Fonte: próprio autor.

Conforme observado na Figura 6.7 (A), as amostras obtidas após 15 min, 60 min, 12 h e 24 h de reação apresentaram uma curva dose-resposta bastante característica. Por outro lado, as soluções do metribuzin incólume e após 30 min de reação mostraram uma tendência ao aumento da resposta de bioluminescência, mas não foi possível calcular o valor de equivalente de E2 para ambas. A solução de T = 0 apresentou aumento da bioluminescência apenas nos dois pontos mais concentrados, não sendo possível traçar uma reta para o cálculo de EC<sub>50</sub> ou EC<sub>20</sub>. Já para a solução T = 30 min, foi possível traçar a reta, mas o valor de equivalente de E2 foi menor que o limite de quantificação do método (LQ), descrito como 3,3 vezes o LD.

De acordo com a Figura 6.7 (B), não houve efeito tóxico ( $IC_{20}$ ) das soluções testadas para as leveduras no ensaio de estrogénicidade. A bioluminescência no ensaio BLYR, para qualquer concentração das amostras testadas, foi a mesma das soluções de controle negativo (A: água ultrapura; B: solução DMSO 1% em água ultrapura). Portanto, o gráfico com os dados do ensaio BLYR (Figura 6.7 (B)) gerou curvas sobrepostas com a mesma resposta de bioluminescência para qualquer concentração testada. A diminuição da bioluminescência no ensaio BLYR levaria à exclusão do ponto por causar resultados falsos negativos no ensaio BLYES.

Baseados nos resultados obtidos, calculou-se os valores de equivalente de E2 dividindo-se  $EC_{50}$  do padrão E2 pelo  $EC_{50}$  da amostra, ou  $EC_{20}$  do padrão E2 pelo  $EC_{20}$  da amostra nos casos em que a bioluminescência máxima da amostra não superou a bioluminescência de  $EC_{50}$  do padrão, evitando assim os cálculos por extrapolação. Os valores de equivalente de E2 para as amostras estão expressos na Tabela 6.2.

**Tabela 6.2.** Resultados de atividade estrogénica, expressa em equivalente de 17- $\beta$ -estradiol, para todas as amostras submetidas ao ensaio BLYES.

Soluções	Equivalente de 17- $\beta$ -estradiol	
	mol/L	$\mu$ g/L
Metribuzin T = 0	< LD	<LD
Metribuzin T = 15 min	$2,20 \times 10^{-9}$	0,600
Metribuzin T = 30 min	<LQ	<LQ
Metribuzin T = 60 min	$2,20 \times 10^{-10}$	0,061
Metribuzin T = 12 h	$6,10 \times 10^{-9}$	1,66
Metribuzin T = 24 h	$2,46 \times 10^{-8}$	6,71

Os resultados obtidos mostraram que as soluções cloradas apresentaram maior atividade estrogénica do que a solução não clorada, todas na mesma concentração inicial de metribuzin. Dessa forma, é possível afirmar que os processos de cloração nas ETAs podem aumentar o risco associado à presença do metribuzin em água de abastecimento público. De acordo com a Tabela 6.2, os valores de equivalente de E2 para soluções cloradas de metribuzin variaram de 0,06 a 6,71  $\mu$ g/L para diferentes tempos de contato com cloro livre.



É possível notar na Figura 6.8 que as variáveis Equivalente E2, DBP M7 e DBP M6 estão mais agrupadas no terceiro quadrante, sugerindo que as amostras localizadas nesse quadrante são mais influenciadas por essas três variáveis.

Embora tenhamos um número bastante reduzido de amostras, o que prejudica a interpretação dos dados por PCA, os resultados foram usados como um indicativo da possível influência dos DBPs na estrogenicidade das amostras. A hipótese é que a hidroxilação do anel, relativamente abundante em densidade eletrônica, torna as moléculas desses DBPs mais susceptíveis às interações com o receptor estrogênico humano. Vale lembrar que os compostos estrogênicos mais potentes são caracterizados pela presença de hidroxilas ligadas à anéis aromáticos, tais como etinilestradiol, estradiol, estrona, estriol, entre outros. Com o intuito de confirmar a hipótese levantada, diversas metodologias *in silico* foram utilizadas para a identificação dos DBPs estrogênicos via relação atividade estrogênica-estrutura química. No entanto, os resultados obtidos não foram conclusivos, uma vez que a grande maioria dos DBPs identificados estavam fora do domínio de aplicabilidade dos modelos.

De forma geral, os resultados de estrogenicidade demonstram que o metribuzin, se presente em águas de abastecimento, pode contribuir para o aumento da resposta estrogênica de amostras em ETAs, uma vez que esse herbicida não pode ser removido nas etapas que antecedem a cloração (coagulação/floculação, decantação e filtração)(Hu *et al.*, 2017). De acordo com dados da literatura, o metribuzin provoca efeitos significativos no sistema hormonal de ratos, alterando os níveis de tiroxina e somatotropina após semanas de exposição à altas concentrações de desse herbicida (Mnif *et al.*, 2011; Porter *et al.*, 1993). No entanto, não foram encontrados dados referentes à estrogenicidade de DBPs gerados pela cloração desse composto.

A interpretação dos dados deve ser tratada com cautela, uma vez que o metribuzin foi clorado em altas concentrações e sem a presença de interferentes (matéria orgânica natural, por exemplo). A estrogenicidade detectada nas soluções cloradas desse herbicida deve ser um alerta para a necessidade de futuros estudos envolvendo a avaliação de risco da presença desse composto em águas de abastecimento, especialmente relacionados aos efeitos estrogênicos da exposição crônica a esses contaminantes.

### 6.2.4. Predição de toxicidade via método Q(SAR)

Para a avaliação de mutagenicidade e toxicidade de desenvolvimento dos DBPs formados, utilizou-se a ferramenta de predição T.E.S.T (U.S. EPA) para a obtenção de resultados complementares aos obtidos via métodos tradicionais *in vitro* e *in vivo*. Os resultados obtidos pelo software, aplicando-se o método “consensus”, estão apresentados na Tabela 6.3. Os valores de validação são importantes para aumentar a confiança nos resultados preditos, no entanto, para alguns DBPs não foi possível calculá-los devido à ausência de compostos semelhantes (similaridade > 0,5) no conjunto de treinamento. Isso significa que a predição foi realizada por extrapolação do modelo e, portanto, não são confiáveis.

**Tabela 6.3.** Predição da toxicidade dos subprodutos de cloração do metribuzin via metodologia in silico pelo software T.E.S.T. da U.S.EPA.

Compostos	Mutagenicidade (teste Ames)				Toxicidade de desenvolvimento			
	Predição Valor/Resultado	Validação			Predição Valor/Resultado	Validação		
		Conc. <sup>a</sup>	Sens. <sup>b</sup>	Esp. <sup>c</sup>		Conc.	Sens.	Esp.
Metribuzin	0,50 (negativo)	0,00	0,00	0,00	0,30 (negativo)	Sem compostos similares no conjunto de treinamento		
DBP M1	0,69 (positivo)	Sem compostos similares no conjunto de treinamento			0,87 (positivo)	Sem compostos similares no conjunto de treinamento		
DBP M2	0,19 (negativo)	0,83	0,00	1,00	0,87 (positivo)	Sem compostos similares no conjunto de treinamento		
DBP M3	0,36 (negativo)	Sem compostos similares no conjunto de treinamento			0,91 (positivo)	Sem compostos similares no conjunto de treinamento		
DBP M4	0,49 (negativo)	1,00	1,00	N/A <sup>d</sup>	1,03 (positivo)	Sem compostos similares no conjunto de treinamento		
DBP M5	1,01 (positivo)	Sem compostos similares no conjunto de treinamento			0,77 (positivo)	Sem compostos similares no conjunto de treinamento		
DBP M6	0,10 (negativo)	0,83	0,00	1,00	0,66 (positivo)	Sem compostos similares no conjunto de treinamento		
DBP M7	0,11 (negativo)	1,00	N/A	1,00	0,99 (positivo)	Sem compostos similares no conjunto de treinamento		
DBP M8	0,06 (negativo)	1,00	N/A	1,00	0,78 (positivo)	Sem compostos similares no conjunto de treinamento		
DBP M9	0,48 (negativo)	0,75	0,00	1,00	0,72 (positivo)	Sem compostos similares no conjunto de treinamento		
DBP M10	0,19 (negativo)	0,75	0,00	1,00	0,99 (positivo)	Sem compostos similares no conjunto de treinamento		
DBP M11	<b>0,90 (positivo)</b>	1,00	1,00	N/A	0,90 (positivo)	Sem compostos similares no conjunto de treinamento		
DBP M12	0,27 (negativo)	1,00	1,00	1,00	0,74 (positivo)	<b>0,86</b>	1,00	0,00
DBP M13	0,35 (negativo)	0,90	1,00	0,80	0,82 (positivo)	<b>1,00</b>	1,00	N/A
DBP M14	0,49 (negativo)	1,00	1,00	N/A	0,65 (positivo)	Sem compostos similares no conjunto de treinamento		
DBP M15	<b>0,51 (positivo)</b>	0,40	0,43	0,33	0,95 (positivo)	<b>1,0</b>	1,0	N/A
DBP M16	0,19 (negativo)	0,83	1,00	0,80	0,87 (positivo)	<b>0,70</b>	0,86	0,33
DBP M17	0,01 (negativo)	1,00	N/A	1,00	0,91 (positivo)	<b>0,70</b>	0,78	0,00

<sup>a</sup>Conc: concordância; <sup>b</sup>Sens: sensibilidade; <sup>c</sup>Esp: especificidade;

<sup>d</sup>N/A: não aplicável porque não há composto ativo (sensibilidade) ou composto inativo (especificidade) semelhante no conjunto de treinamento

De forma geral, os parâmetros de validação para as predições de mutagenicidade, baseados no método “consensus”, apresentaram altos valores de concordância, o que indica maior precisão nas predições de toxicidade. A maioria dos DBPs avaliados não apresentou efeitos mutagênicos segundo o método Q(SAR). No entanto, o DBP M11 e DBP M15 podem ser mutagênicos em testes Ames, principalmente em relação ao DBP M11, o qual apresentou uma previsão altamente confiável segundo os parâmetros de validação obtidos. Os DBPs M1 e M5, embora positivos para mutagenicidade, não tiveram os resultados confiáveis, visto que a predição foi feita por extrapolação do modelo. Os parâmetros de validação para o valor de mutagenicidade do metribuzin não foram satisfatórios (concordância = 0,00), no entanto, de acordo com a EPA, esse herbicida não apresentou efeito mutagênico em testes *in vitro* e *in vivo* (EPA, 2003), indicando que a predição do modelo foi correta.

Com relação às predições de toxicidade de desenvolvimento, a maioria dos DBPs analisados tiveram suas predições feitas por extrapolação do modelo. Embora todos os DBPs tenham apresentado toxicidade positiva para esse “endpoint”, a maioria das predições não foi confiável. Apesar disso, os resultados sugerem que os DBPs formados podem ser consideravelmente mais tóxicos para o desenvolvimento de animais e humanos que o composto precursor. Os DBPs M12, M13, M15, M16 e M17 foram considerados tóxicos pelo método Q(SAR), com moderada a alta confiabilidade de acordo com os parâmetros de validação (concordância > 0,7). Dados da literatura indicam que o metribuzin não é tóxico para o desenvolvimento de humanos e animais (EPA, 1998), o que confirma a previsão obtida por método Q(SAR) para esse composto.

Os resultados indicaram que os DBPs identificados podem ser mais tóxicos do que o metribuzin, especialmente para o “endpoint” de toxicidade do desenvolvimento. Assim, é possível que o processo de cloração aumente significativamente a toxicidade do metribuzin na água potável. Esses resultados de toxicidade devem ser tratados com cautela, visto que são baseados em cálculos matemáticos. Portanto, esses efeitos adversos devem ser investigados mais detalhadamente.

### **6.3. CONCLUSÃO**

A reação de cloração provou-se eficiente para a degradação do metribuzin mesmo em baixa concentração (20 µg/L) e dosagem de cloro livre similar à aplicada em estações de tratamento de

## ***Capítulo 6. Cloração do metribuzin: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade.***

---

água (2 mg/L com no mínimo 30 min de contato). Nas condições experimentais utilizadas nesse estudo, o metribuzin teve tempo meia vida de 29,5 min, mas sua mineralização foi negligenciável mesmo após 24 h de exposição ao cloro. Foram identificados e elucidados, via espectrometria de massas de alta resolução, 17 subprodutos de desinfecção e a possível rota de degradação foi proposta com base nos resultados obtidos.

Os ensaios de toxicidade demonstraram que as soluções cloradas podem ser mais tóxicas que o composto precursor, principalmente em relação à estrogenicidade. Após clorado, o metribuzin apresentou estrogenicidade relativamente alta. Além disso, os ensaios de toxicidade *in silico* indicaram que, diferentemente do metribuzin, alguns subprodutos têm potencial para serem mutagênicos e tóxicos para o desenvolvimento de animais e humanos. O teste de *Artemia salina* também indicou que os subprodutos podem ser ligeiramente mais tóxicos que o metribuzin para esses microcrustáceos após ser submetido a 24 horas de cloração. No Brasil, onde legislação é mais permissiva quando comparada às de países desenvolvidos, o metribuzin não foi incluído na lista de princípios ativos de agrotóxicos que são regulados pela portaria de potabilidade (Brasil, 2017).

#### **6.4. BIBLIOGRAFIA**

BILA, D. *et al.* Estrogenic activity removal of 17 $\beta$ -estradiol by ozonation and identification of by-products. **Chemosphere**, v. 69, n. 5, p. 736–746, 2007.

CHAMBERLAIN, E. *et al.* Comprehensive screening study of pesticide degradation via oxidation and hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 354–363, 2012.

CHIALI, F. Z. *et al.* Chronic low level metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 106, n. 1–2, p. 38–44, 2013.

DEA BERGAMASCO, A. M. DI *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, n. 11, p. 3288–3293, 2011.

DODD, M. C.; HUANG, C. H. Transformation of the antibacterial agent sulfamethoxazole in reactions with chlorine: Kinetics, mechanisms, and pathways. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 21, p. 5607–5615, 2004.

EPA. R.E.D Facts Metribuzin. **Prevention, Pesticides and Toxic Substances**, p. 1–7, 1998.

\_\_\_\_. Health effects support document for Metribuzin. **EPA 822-R-03-005, Office of Water, Health and Ecological Criteria Division, Washington, DC.**, p. Available online at <http://www.epa.gov/safewater/>, 2003.

HU, C. Y. *et al.* Degradation kinetics and DBP formation during chlorination of metribuzin. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 2017.

HU, J. Y. *et al.* Effect of chlorination on estrogenicity in chlorinated treated effluent. **Water Science and Technology: Water Supply**, v. 6, n. 2, p. 185–191, 2006.

MNIF, W. *et al.* Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 6, p. 2265–2303, 2011.

PORTER, W. P. *et al.* Groundwater pesticides: Interactive effects of low concentrations of carbamates aldicarb and methomyl and the triazine metribuzin on thyroxine and somatotropin levels in white rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 40, n. 1, p. 15–34, 1993.

RASCHKE, U *et al.* Photodecomposition of 4-amino-1,2,4-triazin-3,5-diones and -thiones



in oxygenated aqueous solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 115, p. 191–197, 1998(a).

RASCHKE, U. *et al.* Photolysis of metribuzin in oxygenated aqueous solutions. **Chemosphere**, v. 36, n. 8, p. 1745–1758, 1998(b).

SANSEVERINO, J. *et al.* Screening of potentially hormonally active chemicals using bioluminescent yeast bioreporters. **Toxicological Sciences**, v. 107, n. 1, p. 122–134, 2009.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for Drinking-water Quality**. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254637/1/9789241549950-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 1 jan. 2017.

***CAPÍTULO 7. CLORAÇÃO DO BENTAZONE:  
DEGRADAÇÃO, FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS  
E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE.***

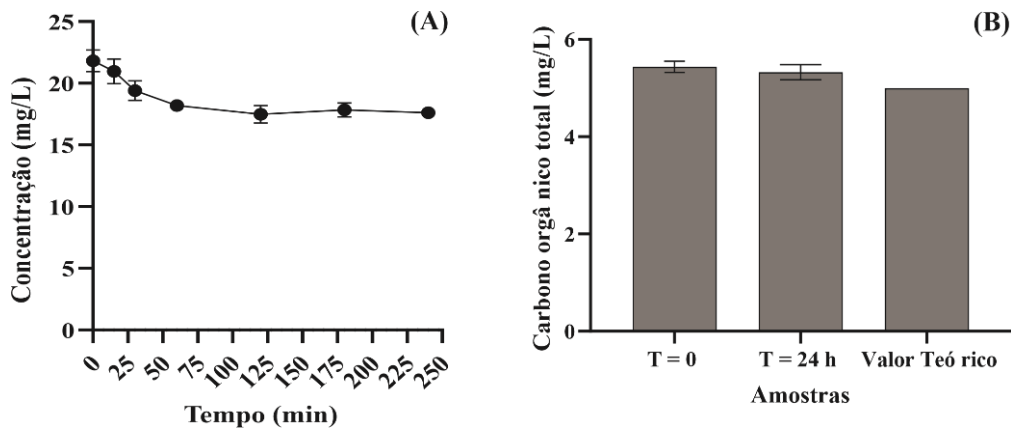
## **7.1. ANÁLISE QUÍMICA DAS SOLUÇÕES CLORADAS DE BENTAZONE**

### **7.1.1. Degradação e mineralização do bentazone**

A degradação do herbicida bentazone em sistemas de cloração é ainda desconhecida, muito embora a sua detecção em compartimentos aquáticos venha sendo relatada na literatura. Dessa forma, o presente estudo avaliou o comportamento desse agrotóxico frente aos processos de cloração. Para tal, uma solução de bentazone a 20 µg/L foi submetida à cloração nas seguintes condições: concentração de 2 mg/L de cloro livre, pH 7,5, e temperatura ambiente (25 °C ± 1). Além disso, avaliou-se a possível mineralização do bentazone em reações de cloração, mas nesse caso, em concentrações elevadas tanto do herbicida (10 mg/L) quanto do cloro livre (3 mg cloro livre/1 mg de C presente na solução).

Apesar de possuir grupos susceptíveis às reações de substituição eletrofílica envolvendo o cloro livre, como o anel aromático e uma amina secundária em um anel com heteroátomos, o bentazone mostrou-se pouco reativo ao processo de cloração, não sendo possível avaliar os parâmetros de constante de velocidade e tempo de meia vida da reação. Conforme observado, houve uma degradação de aproximadamente 20% do bentazone, mesmo após 4 horas de reação. Dentro de 30 min, tempo mínimo de contato com o cloro requerido em ETAs, observou-se apenas 15% de degradação. Os ensaios de TOC, como esperado, também demonstraram que não houve mineralização do bentazone mesmo após 24 horas de exposição ao cloro (Figura 7.1 (B)).

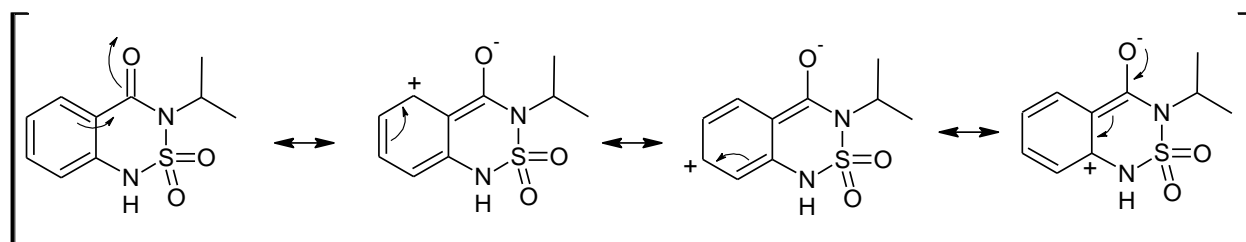
**Figura 7.1.** (A) Degradação do herbicida bentazone na concentração de 20 µg/L em reação de cloração a 2,0 mg/L de cloro livre. (B) Mineralização do herbicida bentazone na concentração de 10 mg/L e excesso de cloro livre (3 mg cloro livre/1 mg de C na solução). Valor teórico foi calculado por estequiometria.



Fonte: próprio autor.

A baixa reatividade desse herbicida está relacionada à redução da densidade eletrônica dos seus sítios reativos ao cloro por efeito indutivo e de ressonância da vizinhança. A amina secundária, por exemplo, tem característica bastante ácida devido ao efeito retirador de elétrons do grupo  $-\text{SO}_2$  vizinho. Já o anel aromático tem sua densidade eletrônica reduzida por efeito de ressonância que pode ser observado na Figura 7.2.

**Figura 7.2.** Estruturas de ressonância para a molécula do bentazone.



Fonte: próprio autor.

Efeito similar ao descrito na Figura 7.2 pode ocorrer com a amina secundária, porém, com efeito doador de elétrons. No entanto, a densidade eletrônica do nitrogênio é comprometida pelo forte grupo retirador de elétrons vizinho ( $\text{SO}_2$ ). Dessa forma, acredita-se que o efeito de desativação do anel se sobressai ao efeito de ativação que poderia ocorrer com o par não ligante

do N da amina secundária. A desativação do anel, principalmente nas posições *orto* e *para*, reduz a possibilidade de substituições eletrofílicas nesses sítios de ligação. Dessa forma, a baixa degradação do bentazone, certamente está relacionada a esses efeitos retiradores de elétrons.

Em estudo envolvendo a oxidação por dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>), a degradação do bentazone variou de 44,45% a 95,63%, dependendo da concentração de oxidante aplicada (5 e 10 mg/L), o pH da amostra (3, 7 e 9), condições de iluminação natural e concentração de ácidos húmicos. As condições mais favoráveis para a degradação foram: 10 mg/L ClO<sub>2</sub>, pH neutro, presença de luz natural, e menores concentrações de ácidos húmicos. As taxas de degradação foram avaliadas entre 30 min e 24 horas, sendo observada pequena diferença entre a degradação do menor para o maior tempo de contato nas mesmas condições experimentais (Pergal *et al.*, 2020). De acordo com Song *et al.* (2019), em experimentos de fotólise, o tempo de meia vida do bentazone variou entre 2,3 a 7,5 horas em diferentes condições de pH, concentração de Fe<sup>3+</sup>, temperatura e sob irradiação de lâmpadas de mercúrio e de arco xenônio. De acordo com Peschka *et al.* (2007), o bentazone foi removido por fotodegradação, simulando-se a incidência de luz solar. Foram identificados 3 subprodutos da degradação, sendo dois deles isômeros de posição.

Dessa forma, para obter-se uma maior degradação desse herbicida em sistemas de tratamento de água, processos oxidativos alternativos ao hipoclorito devem ser aplicados, principalmente envolvendo espécies mais oxidativas, como radicais hidroxila, por exemplo. Embora tenha sido pouco degradado nas reações de cloração (< 20%), foram avaliados os possíveis subprodutos que podem ser formados pela cloração, os quais serão discutidos na sequência.

### **7.1.2. Identificação e elucidação dos DBPs formados pela cloração do bentazone**

Os ensaios para a identificação e elucidação dos DBPs formados pela cloração do bentazone foram conduzidos em altas concentrações tanto do herbicida, quanto do cloro livre. Nessas condições, observou-se uma degradação de 95%, o que garantiu a identificação dos possíveis DBPs formados a partir desse herbicida.

Por meio da utilização de UHPLC-HESI-HRMS, foram obtidos dados consistentes para a identificação e elucidação de quatro subprodutos de desinfecção. As fórmulas moleculares e estruturais foram propostas com base na massa monoisotópica exata, abundância relativa de isótopos, equivalência de duplas ligações (DBE) e, quando possível, pelo perfil de fragmentação

*Capítulo 7. Cloração do bentazone: Degradação, formação de subprodutos e avaliação de toxicidade.*

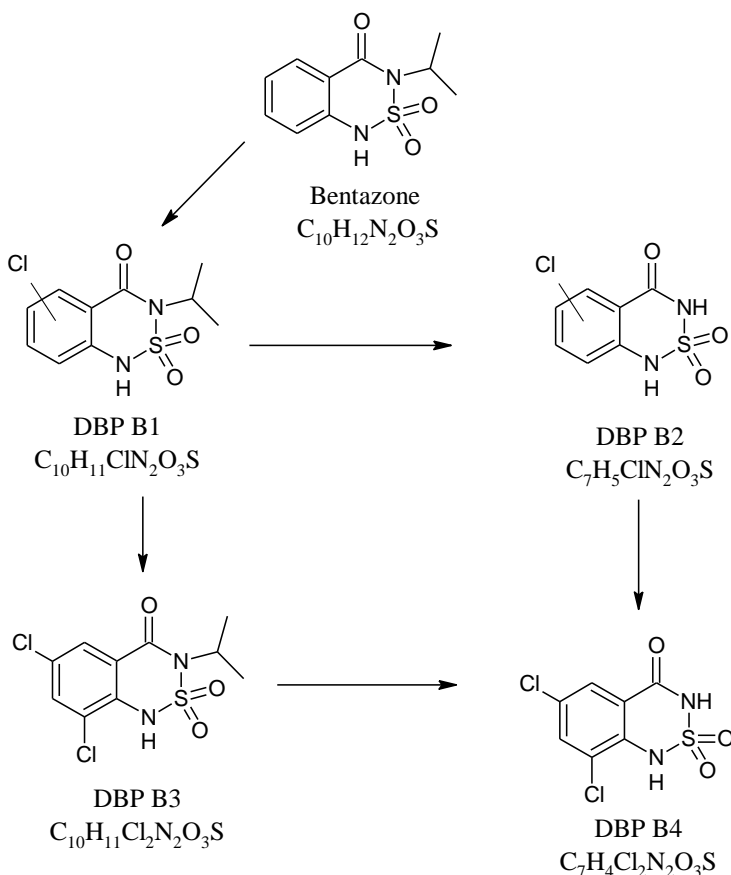
dos íons precursores ( $MS^2$ ) na célula de colisão (Materiais suplementares - Anexo E). Além disso, realizou-se a comparação do espectro de massa obtidos para as amostras cloradas e com soluções não reagidas e branco. A Tabela 7.1 apresenta as fórmulas moleculares propostas, as relações  $m/z$  teórica e experimental, o erro calculado e o parâmetro de DBE. Conforme observado, os erros entre as relações  $m/z$  teóricas e experimentais foram inferiores a 1,10 ppm.

**Tabela 7.1.** Dados obtidos pela análise por UHPLC-HESI-HRMS para o bentazone e seus subprodutos. Fórmulas moleculares propostas, massa monoisotópica exata, tempo de retenção, relações  $m/z$  teórica e experimental, e o erro calculado (ppm).

DBPs	Fórmula Molecular	Massa monoisotópica exata	$T_R$	ESI no modo negativo			DBE
				$m/z$ teórico	$m/z$ experimental	Erro (ppm)	
BENTAZONE	$C_{10}H_{12}N_2O_3S$	240,05686	5,83	239,04904	239,04900	-0,04	6,5
DBP B1	$C_{10}H_{11}ClN_2O_3S$	274,01789	6,39	273,00952	273,01035	1.10	6,5
DBP B2	$C_7H_5ClN_2O_3S$	231,97094	6,40	230,96257	230,96299	0,42	6,5
DBP B3	$C_{10}H_{10}Cl_2N_2O_3S$	307,97892	7,42	306,97054	306,97141	0,87	6,5
DBP B4	$C_7H_4Cl_2N_2O_3S$	265,93197	6,61	264,92359	264,92441	0.82	6,5

Portanto, baseado nos dados da Tabela 7.1, as relações isotópicas bastante características para compostos clorados, e os dados de fragmentação ( $MS^2$ ) na célula de colisão (Materiais suplementares, Anexo E), foi possível elucidar as estruturas dos DBPs e a propor uma suposta rota de degradação, conforme apresentado na Figura 7.3.

**Figura 7.3.** Formação de DBPs e a suposta rota de degradação do herbicida bentazone submetido às reações de cloração. As setas representam reações envolvendo cloro livre (HOCl/OCl<sup>-</sup>) em meio aquoso (H<sup>+</sup>, OH<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O).



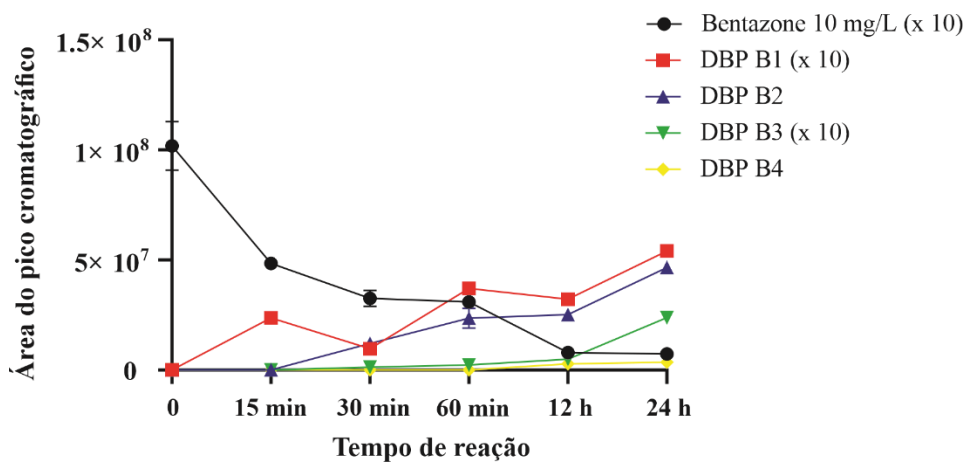
Fonte: próprio autor.

Conforme observado, a formação do DBP B1 ocorreu por reação de substituição eletrofílica no anel aromático. Embora não seja possível definir a posição em que ocorreu a substituição por Cl, acredita-se que ela tenha ocorrido majoritariamente em uma das posições *meta* ao grupo carbonila devido ao efeito de ressonância que desativa o anel, principalmente nas posições *orto* e *para* (Figura 7.2). O DBP B2 é formado pela cloração da estrutura do bentazone somado a perda da cadeia lateral isopropil, no entanto, não foi possível determinar, por meio de dos dados de fragmentação, onde ocorreu a substituição por cloro. No entanto, dada a baixa reatividade do nitrogênio da amida frente às reações de substituição eletrofílica envolvendo o cloro livre, sabe-se que o ataque eletrofílico a esse sítio reativo é muito pouco provável e, portanto, a

perda do grupo isopropílico tenha ocorrido por reação de hidrólise, fenômeno já descrito na literatura para a fotodegradação desse herbicida em meio aquoso (Peschka et al. 2007).

A formação do DBP B3 ocorre com um segundo ataque do cloro ao anel aromático, produzindo uma estrutura substituída, majoritariamente, nas duas posições meta ao grupo carbonila. Por fim, identificou-se a presença do DBP B4, com relação  $m/z$  264,92300, que pode estar relacionado a mais uma cloração do DBP B2 ou apenas a perda do radical isopropil do DBP B3. No entanto, esse íon foi identificado apenas após 12 h de exposição ao cloro e em muito baixa intensidade (Figura 7.4), não sendo possível determinar seus fragmentos gerados pela dissociação induzida por colisão. Ressalta-se que o DBP B4 foi proposto pelo baixo erro entre suas relações  $m/z$  teórica e experimental, além de sua relação isotópica típica de compostos clorados.

**Figura 7.4.** Taxa de formação/consumo dos DBPs em diferentes tempos de cloração do bentazone (0, 15, 30 e 60 min; 12 e 24 h). O bentazone e os DBPs B1 e B3 tiveram as suas áreas cromatográficas divididas para melhor visualização do gráfico. O fator de correção está representado na legenda.



Embora seja pouco degradado pela cloração em baixas concentrações, parte do bentazone pode ser convertido em subprodutos. A degradação de 20% desse herbicida passa, certamente, pela formação de um ou mais subprodutos discutidos nesse estudo.



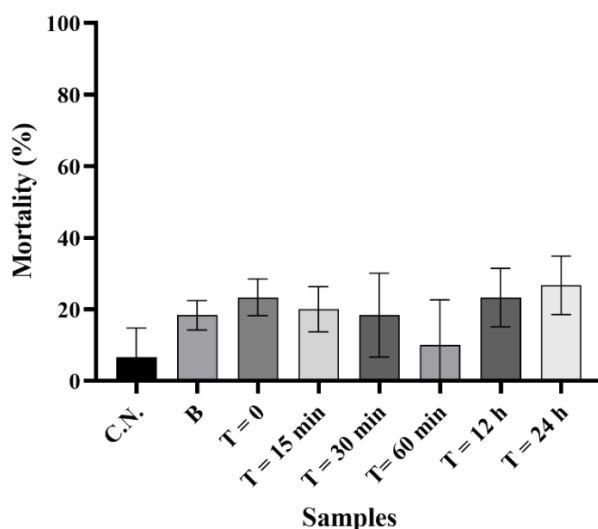
## 7.2. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO BENTAZONE PRÉ E PÓS-CLORAÇÃO

Assim como para os outros agrotóxicos, avaliou-se a toxicidade dos DBPs formados pela cloração do bentazone por meio de ensaios *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. No entanto, a degradação do bentazone em condições de baixa concentração foi de 20%, diferentemente das soluções testadas para toxicidade que tiveram até 95% de degradação. Sendo assim, deve-se considerar a baixa reatividade do herbicida na interpretação da toxicidade de seus subprodutos, quando em situação real de cloração em ETAs.

### 7.2.1. Toxicidade aguda para *Artemia salina*

Para a avaliação da toxicidade das soluções de bentazone, os náuplios de *Artemia salina* foram submetidos, por 48 h, ao contato com as soluções do bentazone antes e após as reações de cloração, além do controle negativo (água salina e PBS) e branco do ensaio químico. Conforme observado na Figura 7.5, não foi identificado um aumento na mortalidade dos náuplius em nenhuma das soluções testadas.

**Figura 7.5.** Mortalidade dos náuplios de *Artemia salina* após 48 h de exposição às soluções de bentazone pré e pós reação de cloração. Os dados foram comparados com o controle negativo (C.N.) e o branco do ensaio químico (B).



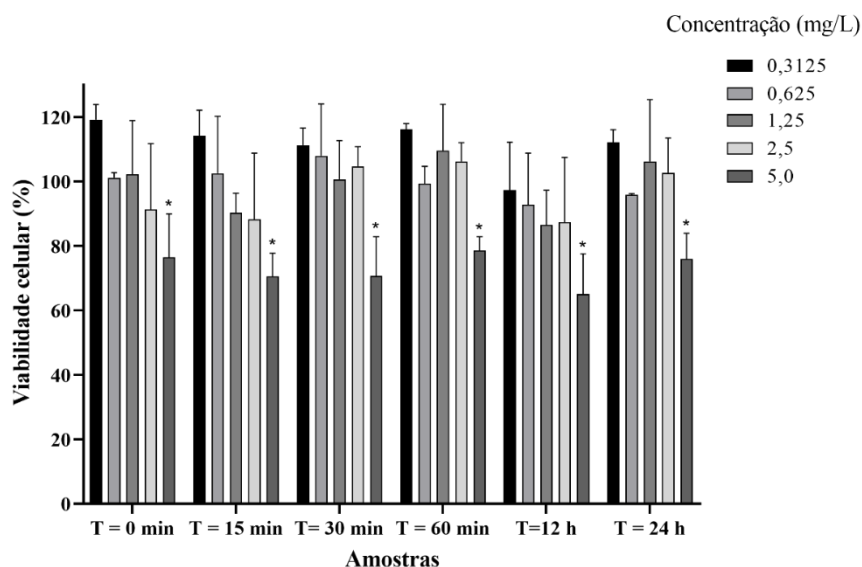
Fonte: Próprio autor.

De acordo com dados da literatura, o metribuzin é reconhecidamente pouco tóxico para espécies de peixes e invertebrados aquáticas, embora possa causar desequilíbrios ambientais pela sua alta toxicidade para plantas aquáticas não alvo (European Food Safety Authority, 2015). Portanto, os resultados obtidos no ensaio de *Artemia salina* estão de acordo com os estudos disponíveis na literatura e, ainda, demonstram que a possível cloração desse herbicida não gera compostos mais tóxicos para esse modelo experimental.

### **7.2.2. Viabilidade celular por ensaio de MTT utilizando células HepG2**

Os efeitos das soluções na viabilidade celular foram avaliados pelo método colorimétrico de MTT em células de hepatocarcinoma humano (HepG2). O método baseia-se na atividade mitocondrial de células viáveis na redução do sal MTT (amarelo) para o composto formazan (violáceo). Para isso, as células de HepG2 foram submetidas a 48 h de exposição às soluções cloradas de bentazone. Os ensaios foram conduzidos em cinco níveis de concentração variando de 0.3125 a 5,0 mg/L, considerando-se a concentração inicial de bentazone em cada solução clorada. A porcentagem de células viáveis foi calculada em função da absorbância média das réplicas do controle negativo (meio de cultura e PBS). Como observado na Figura 7.6, houve uma redução significativa da viabilidade celular (teste Tukey com 95% de confiança) para todas as soluções testadas no maior nível de concentração (5,0 mg/L) quando comparado com o controle negativo.

**Figura 7.6.** Viabilidade celular de células HepG2 após 48 h de exposição às soluções de bentazone pré e pós etapa de cloração.



Fonte: próprio autor.

Apesar da aparente toxicidade às células de HepG2, todas as soluções cloradas apresentaram efeito tóxico similar à solução de bentazone íntegra, não havendo diferença significativa na redução da viabilidade celular entre elas no maior nível de concentração. Portanto, acredita-se que os subprodutos formados pela cloração do bentazone não alteram a sua toxicidade às células expostas.

Não foram encontrados estudos na literatura sobre os efeitos do bentazone em testes *in vitro* com células humanas, mas é sabido que esse herbicida causa necrose em células do fígado em testes com animais. Embora não seja possível comparar os ensaios, uma vez que os testes *in vivo* levam consideração a absorção, distribuição, metabolismo e excreção do composto no organismo, pode-se afirmar que os ensaios *in vitro* apresentaram efeitos tóxicos às células de fígado humano, assim como ocorreu nos ensaios subcrônicos envolvendo animais (European Food Safety Authority, 2015).

Deve-se lembrar que os ensaios envolveram altas concentrações de bentazone e, ainda, com degradação superior quando comparada à que pode ser obtida em ETAs. Por outro lado, não se deve negligenciar os efeitos causados pelo herbicida incólume e seus possíveis subprodutos de

degradação, uma vez que as consequências da exposição de longo prazo à baixas concentrações desses compostos são pouco conhecidas.

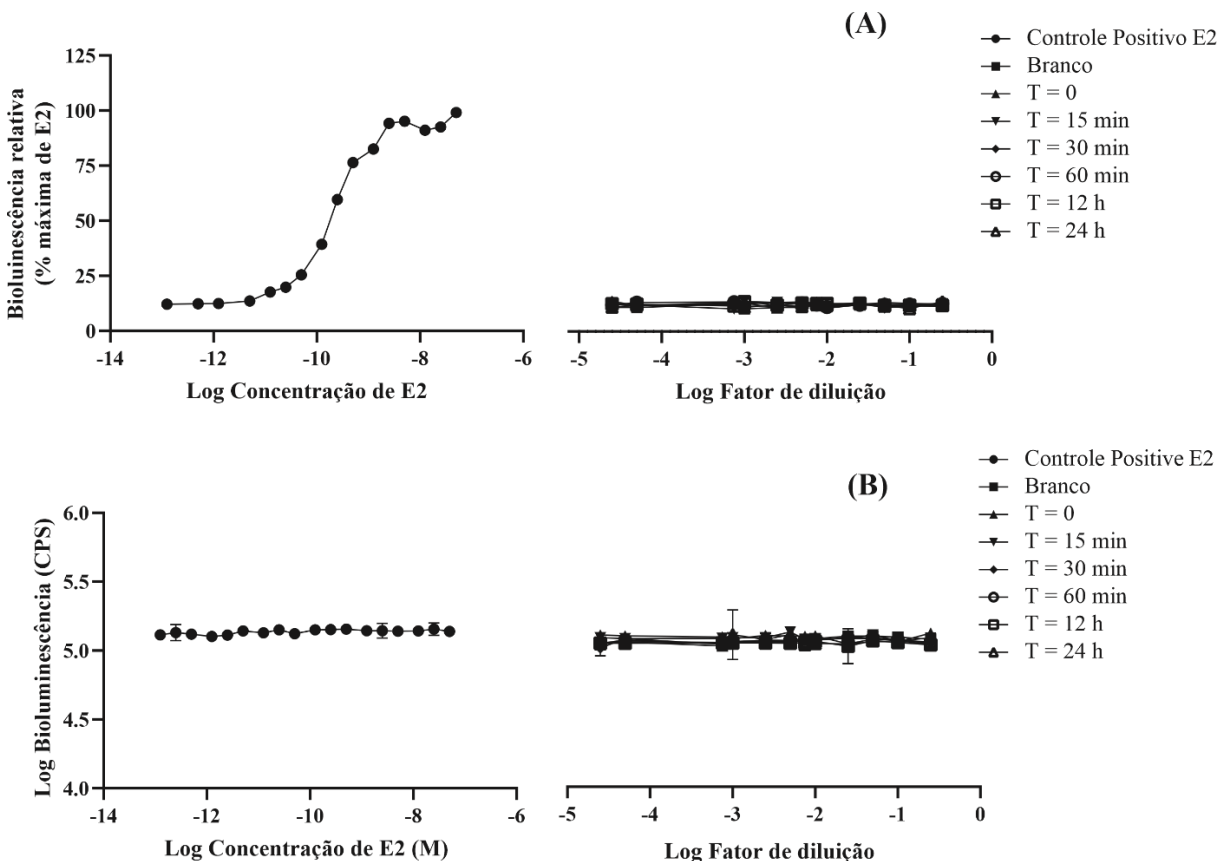
### **7.2.3. Avaliação de estrogenicidade por leveduras BLYES**

Para a análise da estrogênicidade das soluções do herbicida bentazone, avaliou-se inicialmente a viabilidade das leveduras, a resposta ao padrão E2, os melhores tempos de incubação do ensaio e a possível interferência dos sais da matriz na cultura de leveduras, sendo os resultados apresentados no Capítulo 5, seção 5.3.2.

Dessa forma, preparou-se 12 diluições de cada solução do herbicida pré (tempo 0) e pós (15, 30 e 60 min; 12 e 24 h) reação de cloração. Ressalta-se que uma curva padrão foi construída para cada placa de 96 poços, sendo os resultados de estrogênicidade dos padrões E2 para as leveduras BLYES plotados na Figura 7.7 (A). De acordo com os resultados do controle positivo E2, o ensaio BLYES mostrou sensibilidade similar ao E2 quando comparado a outros estudos encontrados na literatura (Bergamasco, *et al.*, 2011; Sanseverino *et al.*, 2009). O valor médio de EC<sub>50</sub> e LD obtidos para o padrão E2 foram  $2,41 \pm 0,05 \times 10^{-10}$  mol/L e  $2,39 \pm 0,26$  ng/L, respectivamente. Ainda na Figura 7.7 (A), é possível observar que não houve aumento da bioluminescência emitida pela levedura em nenhuma das amostras testadas, sendo, portanto, consideradas não estrogênicas nas condições experimentais do presente estudo.

Os resultados são confirmados pelo ensaio de BLYR, representado na Figura 7.7 (B), que exclui a possibilidade de falsos negativos por influência da toxicidade das amostras para as cepas de leveduras. A bioluminescência no ensaio BLYR, para qualquer concentração das amostras testadas, foi a mesma das soluções de controle negativo (A: água ultrapura; B: solução DMSO 1% em água ultrapura). Portanto, o gráfico com os dados do ensaio BLYR (Figura 7.7 (B)) gerou curvas sobrepostas com a mesma resposta de bioluminescência para qualquer concentração testada.

Figura 7.7. Dados do ensaio BLYES (A) e BLYR (B) para o controle positivo E2, branco e soluções de bentazone antes e após a cloração.



Fonte: próprio autor.

De acordo com os resultados descritos na literatura, o bentazone é considerado não estrogênico, embora existam poucos estudos relacionados a esse efeito adverso e os resultados sejam considerados provisórios (European Food Safety Authority, 2015; Word Health Organization, 2004). Com relação aos resultados obtidos, pode-se afirmar que o bentazone e seus subprodutos não tem capacidade de se ligar ao receptor estrogênico humano em ensaios envolvendo leveduras geneticamente modificadas do tipo BLYES. No entanto, existem diversos ensaios que avaliam outros mecanismos de desregulação endócrina que podem ser avaliados em outros testes biológicos.

#### 7.2.4. Predição de toxicidade utilizando método Q(SAR)

Para a avaliação de mutagenicidade e toxicidade de desenvolvimento dos DBPs formados, utilizou-se a ferramenta de predição T.E.S.T (U.S. EPA) para a obtenção de resultados complementares aos obtidos via métodos tradicionais *in vitro* e *in vivo*. No entanto, no caso do bentazone, a predição de mutagenicidade não foi possível, uma vez que a sua estrutura e de todos os seus possíveis subprodutos se encontravam fora do domínio de aplicabilidade dos modelos aplicados.

Para a obtenção das predições de toxicidade de desenvolvimento dos DBPs inconclusivos (DBP B2 e DBP B4), foram avaliadas todas as possíveis estruturas formadas, sendo considerada aquela que apresentou maior efeito tóxico de acordo com o método utilizado. Os resultados obtidos pelo software, aplicando-se o método “consensus”, estão apresentados na Tabela 7.2.

**Tabela 7.2.** Predição da toxicidade dos subprodutos de cloração do bentazone via metodologia *in silico* pelo software T.E.S.T. da U.S.EPA.

Compostos	Toxicidade de desenvolvimento			
	Predição Valor/Resultado	Validação		
		Conc. <sup>a</sup>	Sens. <sup>b</sup>	Esp. <sup>c</sup>
BENTAZONE	<b>0,95 (positivo)</b>	0,50	0,50	N/A
DBP B1	<b>0,98 (positivo)</b>	1,00	1,00	N/A
DBP B2	<b>0,94 (positivo)</b>	0,70	0,83	0,5
DBP B3	<b>1,12 (positivo)</b>	1,00	1,00	N/A
DBP B4	<b>0,99 (positivo)</b>	0,70	0,71	0,67

<sup>a</sup>Conc: Concordância; <sup>b</sup>Senc: sensibilidade; <sup>c</sup>Esp: especificidade.

<sup>d</sup>N/A: não aplicável porque não há composto ativo (sensibilidade) ou composto inativo (especificidade) semelhante no conjunto de treinamento

Conforme observado na Tabela 7.2, os parâmetros de validação para as predições de toxicidade de desenvolvimento, baseados no método “consensus”, apresentaram altos valores de concordância, o que indica maior confiabilidade nas predições obtidas. A exceção deu-se apenas para o bentazone, com valor de 0,5 para a concordância. No entanto, esse herbicida causou efeitos tóxicos para o desenvolvimento, tais como o aumento da perda pós-implantação do embrião, número reduzido de fetos vivos e retardo no desenvolvimento fetal, o que o levou a ser classificado

como “suspeito de causar danos ao feto”, confirmando, desse modo, a predição feita pelo método Q(SAR) aplicado (European Food Safety Authority, 2015).

Os resultados das predições para os DBPs formados mostram que a cloração, provavelmente, não altera a capacidade de causar efeitos deletérios ao desenvolvimento de animais e humanos. Deve-se destacar que, mesmo para os DBPs com fórmulas estruturais inconclusivas, todas as possibilidades propostas foram positivas para esse “endpoint”.

### **7.3. CONCLUSÃO**

O herbicida bentazone, quando em baixa concentração, mostrou-se pouco reativo frente aos processos de cloração com a aplicação de hipoclorito como agente oxidante. Nas condições aplicadas nesse estudo, apenas 20% desse herbicida foi degradado mesmo após 4 horas de reação, sendo esse valor reduzido para 15% em 30 min contato, tempo mínimo requerido em ETAs. Por meio de espectrometria de massas de alta resolução, foi possível identificar e elucidar quatro possíveis subprodutos formados pela cloração do bentazone e propor uma suposta rota de degradação para o mesmo.

Os ensaios de toxicidade demonstraram que esse herbicida e seus subprodutos de degradação não foram tóxicos para *Artemia salina* e não apresentaram efeitos estrogênicos em ensaios gene-repórter aplicando leveduras geneticamente modificadas. Por outro lado, tanto a solução do bentazone inalterado quanto submetido à cloração apresentaram resultados similares de redução de viabilidade celular em culturas de células de hepatocarcinoma humano. Além disso, os ensaios de toxicidade *in silico* indicaram que tanto o bentazone quanto as estruturas propostas como seus subprodutos de degradação foram potencialmente tóxicos para o desenvolvimento de animais e humanos. No caso do herbicida incólume, os dados experimentais confirmam essa predição dos modelos matemáticos.

Entende-se que a presença do bentazone em mananciais de abastecimento, por si só, pode representar um risco ao consumo de água potável e a sua possível degradação por cloração, provavelmente, não reduz seu efeito tóxico ao desenvolvimento. Apesar de detectado em baixas concentrações em águas superficiais e subterrâneas, não é razoável negligenciar seus efeitos após longos períodos de exposição. No Brasil, o bentazone não foi incluído na lista de princípios ativos

de agrotóxicos que são regulados pela portaria de potabilidade (Brasil, 2017), mesmo sendo comprovadamente tóxico ao desenvolvimento.



#### **7.4. BIBLIOGRAFIA**

DEA BERGAMASCO, A. M. DI *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, n. 11, p. 3288–3293, 2011.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance bentazone. **EFSA Journal**, v. 13, n. 4, 2015.

PERGAL, M. V. *et al.* Oxidative degradation and mineralization of bentazone from water. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2020.

PESCHKA, M. *et al.* Determination of two phototransformation products of bentazone using quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 5–6, p. 1227–1234, 2007.

SANSEVERINO, J. *et al.* Screening of potentially hormonally active chemicals using bioluminescent yeast bioreporters. **Toxicological Sciences**, v. 107, n. 1, p. 122–134, 2009.

SONG, S. *et al.* Hydrolysis and photolysis of bentazone in aqueous abiotic solutions and identification of its degradation products using quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 10, p. 10127–10135, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Pesticide residues in food**. Rome, Italy: 2014.

## ***CAPÍTULO 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS***

Os resultados apresentados neste estudo demonstraram que os agrotóxicos fipronil, metribuzin e bentazone podem reagir na presença de cloro, embora o último seja mais recalcitrante. Foram identificados diversos subprodutos de desinfecção, os quais, até então, não haviam sido relatados na literatura. Baseado nos compostos formados, foram propostas possíveis rotas de degradação dos agrotóxicos frente às reações de cloração. De forma geral, as soluções cloradas ou as estruturas dos DBPs apresentaram toxicidade similar ou maior que os compostos originais, destacando-se os efeitos estrogênicos das soluções de metribuzim em ensaios envolvendo receptor humano de estrogênio, o que certamente deve servir de alerta para a necessidade de novos estudos. Também foram detectados efeitos tóxicos no ensaio de *Artêmia salina*, com destaque para o fipronil que, tanto inalterado quanto clorado, apresentou altos valores de mortalidade para esses microcrustáceos. Já o bentazone mostrou-se citotóxico para células de hepatocarcinoma humano em ensaios de MTT e a sua cloração não causou qualquer alteração no seu efeito tóxico sobre as culturas celulares. Os ensaios *in silico* indicaram que a cloração de todos os agrotóxicos pode formar DBPs mutagênicos e tóxicos para o desenvolvimento, destacando-se o bentazone que apresentou toxicidade para o desenvolvimento tanto inalterado como para todos os seus subprodutos de degradação, sendo que não houve, segundo os cálculos matemáticos, diferença considerável entre o potencial tóxico das estruturas.

A preocupação com a presença dos agrotóxicos em águas superficiais, subterrânea e potável tem levado a intensos esforços no sentido de alcançar um maior conhecimento a respeito dos seus efeitos adversos para o meio ambiente e para a saúde humana. Os resultados desse estudo certamente darão uma importante contribuição nesse sentido. Atualmente, a legislação que regulamenta os limites máximos de agrotóxicos em águas potáveis no Brasil não leva em consideração a toxicidade dos subprodutos de cloração de agrotóxicos, mas baseia-se na toxicidade do composto original para definir se ele entra ou não na portaria de potabilidade, e em que concentração ele será permitido. Os dados aqui apresentados servem de questionamento para esse tipo de abordagem.

Por fim, entende-se que a questão da contaminação de águas de abastecimento por agrotóxicos deve ser amplamente discutida, traçando-se estratégias para conciliar a utilização desses insumos, de suma importância para a produtividade agrícola, com a segurança para o meio ambiente e a saúde humana. O uso consciente e coordenado de princípios ativos menos tóxicos, legislações mais rígidas para a liberação desses compostos e uma política intensa de proteção dos

mananciais de abastecimento público parecem ser um futuro a se buscar para a minimização desses problemas.

## **MATERIAIS SUPLEMENTARES**

## ANEXO A

### PREPARO DE MEIOS PARA O ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

#### *Reagentes PBS*

- Água destilada..... 1000 mL
- Cloreto de Sódio Cristal P.A .....8,768 g
- Fosfato de Potássio Monobásico P.A .....0,272 g
- Fosfato de Sódio Bibásico P.A ACS.....0,568 g

O pH foi ajustado para  $7,2 \pm 0,2$  usando soluções de HCl e NaOH. A solução foi autoclavada por 20 min a 121°C.

#### *Reagentes Tripsina*

- Cloreto de Sódio .....40 g
- Cloreto de Potássio .....2 g
- Glicose .....5 g
- Bicarbonato de Sódio .....2,9 g
- Tripsina .....2,5 g
- Etilenodiamina Tetracetato Dissódico EDTA .....1 g
- Solução Vermelho de Fenol 1% .....2,25 mL
- Água ultrapura .....5000 mL

A solução foi filtrada em capela de fluxo laminar através de membrana filtrante de 0,22 µm e as alíquotas mantidas em freezer a -20 °C.

#### *Soro Fetal Bovino (SBF)*

- O estoque de SBF foi descongelado em banho maria a 37° C, homogeneizado e aliquoteado no volume de 10 mL para tubos Falcon novos e estéreis, os quais são imediatamente levados ao freezer a -20°C para o uso futuro. O processo de distribuição do SBF é feito em capela de fluxo laminar previamente descontaminada.

#### *Solução de Penicilina – Estreptomicina*

- A solução penicilina 10 U/mL com estreptomicina 10 mg/mL é alicotada no volume de 1 mL em eppendorf novos e estéreis, os quais são levados ao freezer a -20 °C. A distribuição

da solução de eppendorf foi realizada em capela de fluxo laminar previamente descontaminada.

#### ***Solução de Anfotericina B***

- Água ultrapura (Milli-Q®)..... 50 mL
- Anfotericina B (Cultilab®)..... 50 mg

Após a solubilização a solução foi alíquotada para microtubos estéreis na concentração final de 2,5 µg/mL.

#### ***Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM***

- Água ultrapura (Milli-Q®)..... 1 L
- Bicarbonato de Sódio (Synth®).....3,7 g
- DEMEM (Cultilab®).....16,65 g

O meio foi filtrado em membrana filtrante de 0,22µm e armazenado a 4°C.

#### ***DEMEM suplementado com 5% de SBF para manutenção das células em microplasma***

- DEMEM..... 200 mL
- Solução de Anfotericina B ..... 100 µL
- Solução de Penicilina e Estreptomicina ..... 2 mL
- SBF ..... 10 mL

As soluções de antibióticos, soro fetal bovino e anfotericina B foram adicionadas em capela de fluxo laminar posteriormente ao preparo do meio DEMEM.

#### ***DEMEM suplementado com 1% de SBF para manutenção das células em microplasma***

- DEMEM..... 200 mL
- Solução de Anfotericina B ..... 100 µL
- Solução de Penicilina e Estreptomicina ..... 2 mL
- SBF ..... 2 mL

As soluções de antibióticos, soro fetal bovino e anfotericina B foram adicionadas em capela de fluxo laminar posteriormente ao preparo do meio DEMEM.

## ANEXO B

### PREPARO DE MEIOS PARA O ENSAIO ESTROGENICIDADE

Inicialmente preparou-se o meio base para as culturas de levedura *S. cerevisiae* (BLYES e BLYR) em balão volumétrico previamente lavado. A solubilização deve ser feita seguindo a ordem de adição dos reagentes, conforme a Tabela A. O meio YMM deve ser autoclavado por 20 min a 121°C.

**Tabela B1.** Reagentes e quantidades utilizadas para o preparo de um litro de meio base YMM.

Ordem	Reagentes	Quantidade
1	Sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,980 g
2	Sulfato de magnésio - $\text{MgSO}_4$	0,200 g
3	Fosfato de potássio monobásico - $\text{KH}_2\text{PO}_4$	13,61 g
4	Hidróxido de potássio - $\text{KOH}$	4,200 g
5	Solução de sulfato ferroso - $\text{FeSO}_{4(\text{aq})}$	1,00 mL
6	L-histidina	0,050 g
7	Adenina	0,050 g
8	L-arginina-HCl	0,020 g
9	L-metionina	0,020 g
10	L-tirosina	0,030 g
11	L-isoleucina	0,030 g
12	L-lisina-HCl	0,030 g
13	L-fenilalanina	0,025 g
14	L-ácido glutâmico	0,100 g
15	L-valina	0,150 g
16	L-serina	0,375 g

Para produção de um litro de meio completo YMMG, utilizado no cultivo das leveduras, adicionou-se, conforme a Tabela A2, as soluções de vitamina, glicose, ácido L-aspártico, L-treonina e sulfato de cobre.

**Tabela B2.** Preparo do meio completo YMMG para o cultivo das leveduras.

Ordem	Reagentes	Quantidade (mL)
1	Meio base YMM	854,5
2	Solução de vitamina*	10,0
3	Solução de glicose*	100,0



4	Solução ácido L-aspartico*	25,0
5	Solução de L-treonina*	8,0
6	Solução de sulfato de cobre (II)*	2,5

As soluções utilizadas para a produção do meio completo YMMG foram preparadas conforme a Tabela A3. As soluções foram previamente filtradas em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  e manipuladas sempre em capela de fluxo laminar descontaminada.

**Tabela B3.** Soluções utilizadas para a produção do meio completo YMMG.

Solução	Procedimento
vitamina	Tiamina (40 mg), piridoxina (40 mg), ácido pantotênico (40 mg), inositol (200 mg) e 100 mL de solução de biotina (2 mg/100 mL) para o volume final de 1 L.
glicose	Em água ultrapura preparar a 20% v/v, e autoclavar por 10 minutos.
ácido aspártico	Em água ultrapura preparar 4 mg/mL, e autoclavar por 10 minutos.
treonina	Em água ultrapura preparar a 24 mg/mL, e autoclavar por 10 minutos.
sulfato de cobre (II)	Em água ultrapura preparar a 20 mM e esterilizar filtrando em filtro 0,2 $\mu\text{m}$ em garrafa estéril.

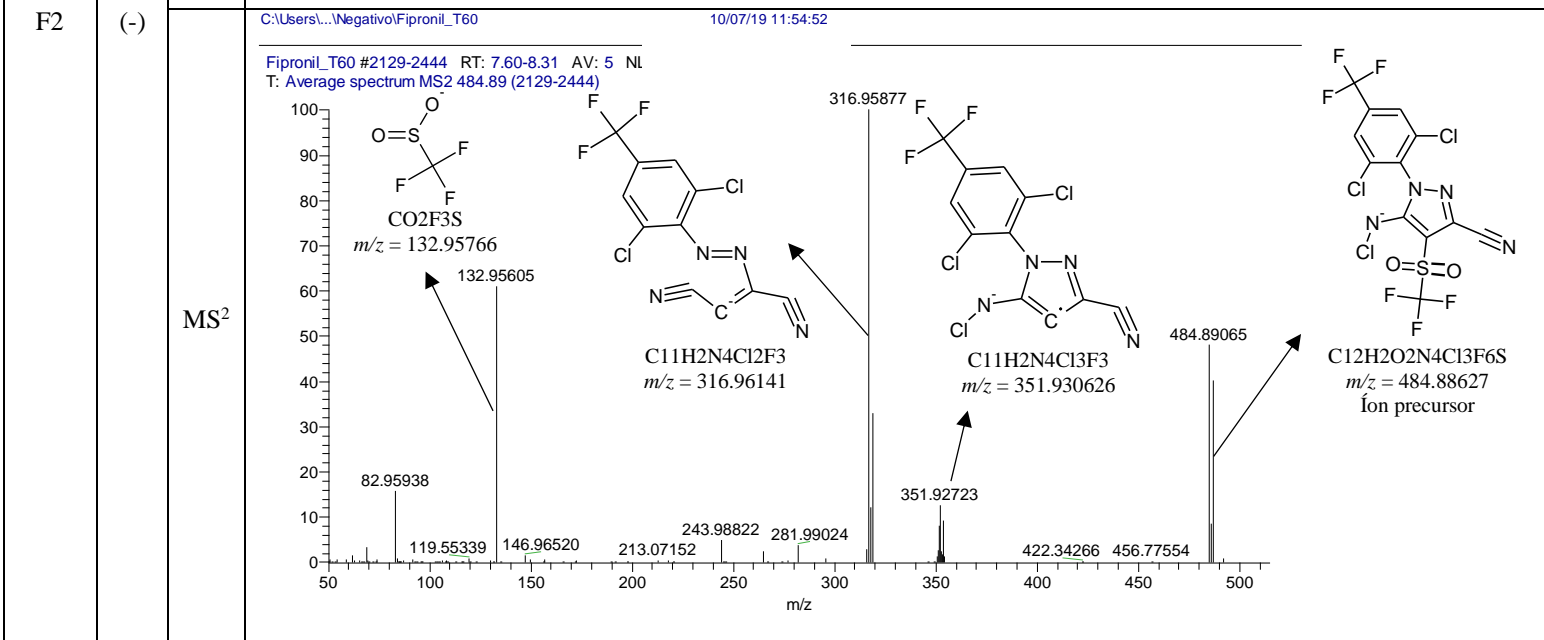
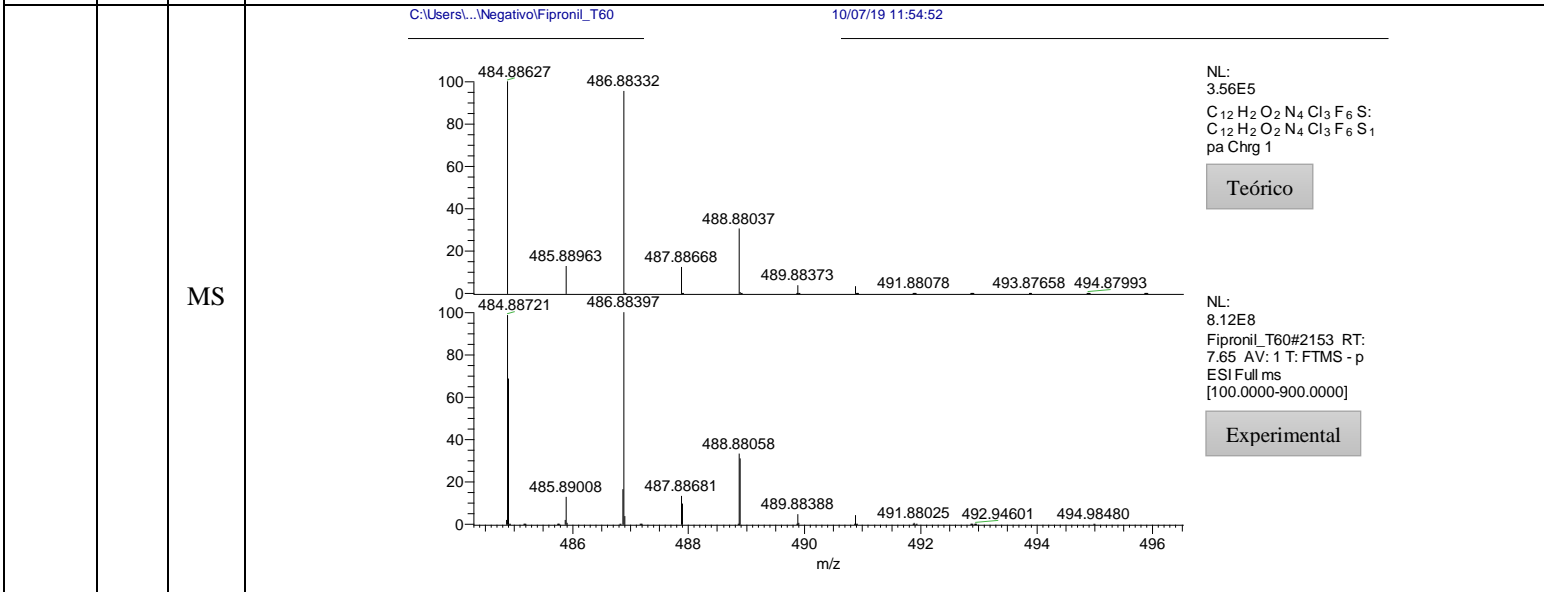
Obs.: Deve-se manter as soluções de vitamina, glicose e treonina em geladeira a aproximadamente 4°C e o ácido aspártico e sulfato de cobre em temperatura ambiente.

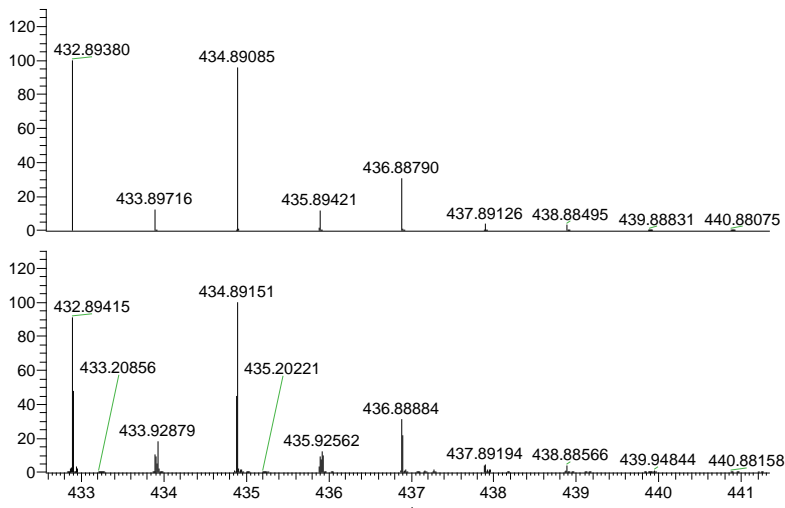
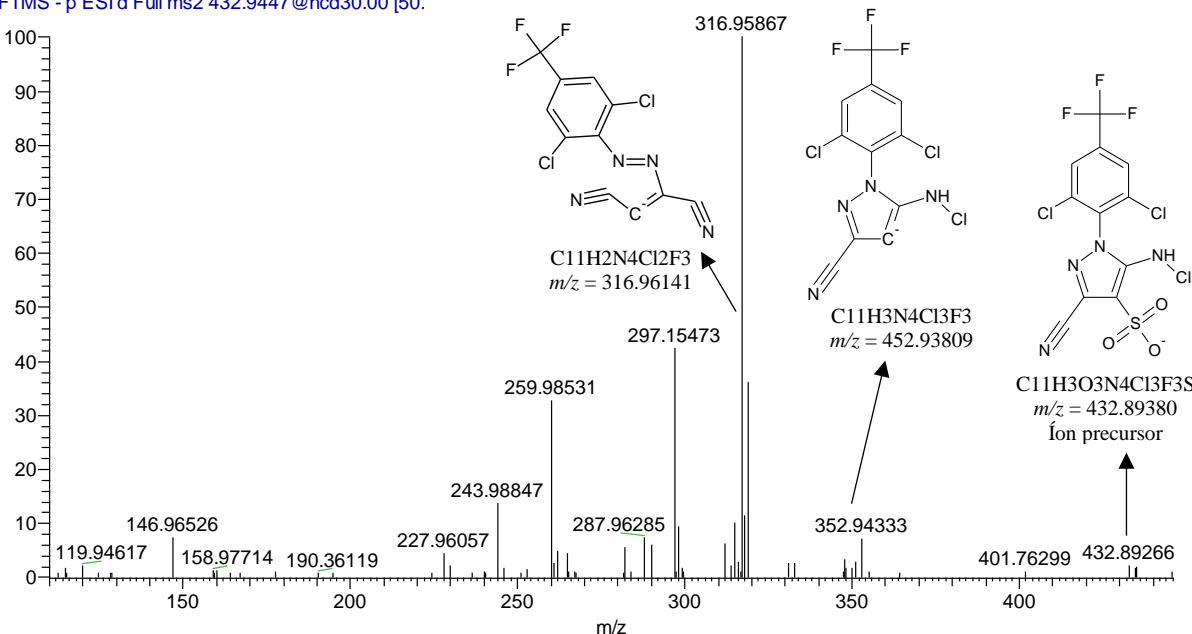
# ANEXO C – Dados de MS e MS<sup>2</sup> do Fipronil

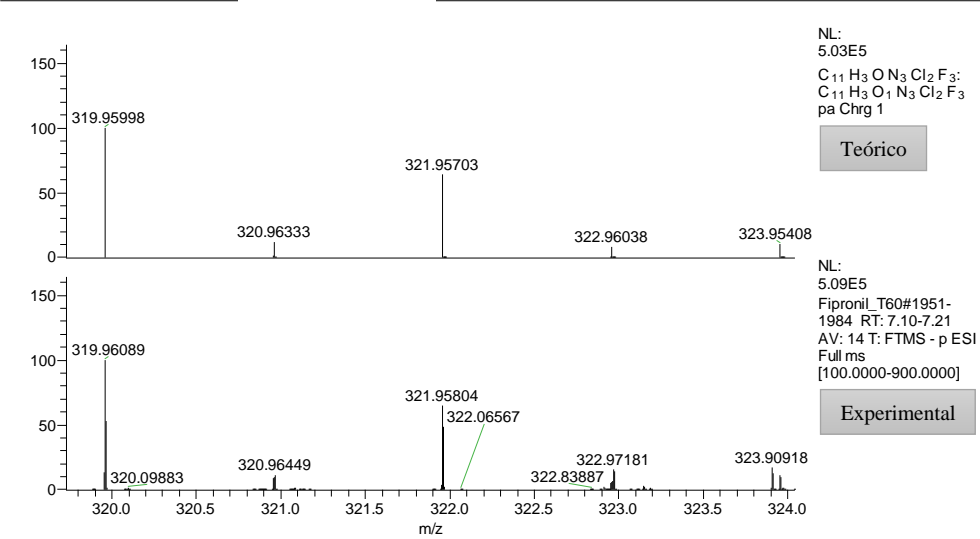
**Tabela C1.** Relações isotópicas do íon precursor de cada DBP formado e seu respectivo espectro de fragmentação na célula de colisão (MS<sup>2</sup>).

DBPs	ESI	Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS <sup>2</sup>
F1		<p>C:\Users\...\Negativo\Fipronil_T15 10/07/19 11:30:00</p> <p><b>MS</b></p> <p>NL: 3.57E5            C<sub>12</sub> H<sub>2</sub> O N<sub>4</sub> Cl<sub>3</sub> F<sub>6</sub> S:            C<sub>12</sub> H<sub>2</sub> O<sub>1</sub> N<sub>4</sub> Cl<sub>3</sub> F<sub>6</sub> S<sub>1</sub>            pa Chrg 1</p> <p>Teórico</p> <p>NL: 3.63E7            Fipronil_T15#2289-2347            RT: 8.00-8.11 AV: 12 T:            FTMS - p ESI Full ms            [100.0000-900.0000]</p> <p>Experimental</p>
	(-)	<p>C:\Users\...\Negativo\Fipronil_T60 10/07/19 11:54:52</p> <p>Fipronil_T60 #205-2453 RT: 0.47-8.34 AV: 4 NL:            T: Average spectrum MS2 468.81 (205-2453)</p> <p><b>MS<sup>2</sup></b></p> <p>96.96792</p> <p>78.95750 129.97522 146.96488 186.94759 214.89174 232.90075 243.98815 316.95876 332.81581 364.92538 399.89832 449.60162</p> <p><chem>C11H2N4Cl2F3</chem> <math>m/z = 316.96141</math></p> <p><chem>C11H2ON4Cl2F3S</chem> <math>m/z = 364.92839</math></p> <p><chem>C11H2ON4Cl3F3S</chem> <math>m/z = 399.89725</math></p> <p><chem>C12H2ON4Cl3F6S</chem> <math>m/z = 468.89218</math> Íon precursor</p>

**DBPs ESI** **Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS<sup>2</sup>**



DBPs	ESI	Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS <sup>2</sup>	
		MS	<p>C:\Users\...\Negativo\Fipronil_T60 10/07/19 11:54:52</p>  <p>NL: 3.59E5 C<sub>11</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>N<sub>4</sub>Cl<sub>3</sub>F<sub>3</sub>S; C<sub>11</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>N<sub>4</sub>Cl<sub>3</sub>F<sub>3</sub>S; pa Chrg 1</p> <p><b>Teórico</b></p> <p>NL: 3.88E5 Fipronil_T60#1935-1986 RT: 7.05-7.21 AV: 22 SB: 193 3.77-5.09 T: FTMS - p ESI Full ms [100.0000-900.0000]</p> <p><b>Experimental</b></p>
F3	(-)	MS <sup>2</sup>	<p>C:\Users\...\Negativo\Fipronil_T60 10/07/19 11:54:52</p> <p>Fipronil_T60 #1912-2713 RT: 6.97-8.96 AV: 3 NL T: FTMS - p ESI d Full ms2 432.9447@hcd30.00 [50.</p>  <p> <chem>C1=NC(=C(C=C1)C(F)(F)F)N=N/C#N/C#N</chem>  C<sub>11</sub>H<sub>2</sub>N<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>  m/z = 316.96141 </p> <p> <chem>C1=NC(=C(C=C1)C(F)(F)F)N=C(N)C#N</chem>  C<sub>11</sub>H<sub>3</sub>N<sub>4</sub>Cl<sub>3</sub>F<sub>3</sub>  m/z = 452.93809 </p> <p> <chem>C1=NC(=C(C=C1)C(F)(F)F)N=C(N)C#N</chem>  C<sub>11</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>N<sub>4</sub>Cl<sub>3</sub>F<sub>3</sub>S  m/z = 432.89380  Íon precursor </p>

DBPs	ESI	Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS <sup>2</sup>	
F4	(-)	MS	<p data-bbox="435 237 971 258">C:\Users\...\Negativo\Fipronil_T60 10/07/19 11:54:52</p>  <p data-bbox="1247 300 1409 394">NL: 5.03E5 C<sub>11</sub> H<sub>3</sub> O N<sub>3</sub> Cl<sub>2</sub> F<sub>3</sub>: C<sub>11</sub> H<sub>3</sub> O<sub>1</sub> N<sub>3</sub> Cl<sub>2</sub> F<sub>3</sub> pa Chrg 1</p> <p data-bbox="1263 405 1356 436">Teórico</p> <p data-bbox="1247 531 1409 657">NL: 5.09E5 Fipronil_T60#1951- 1984 RT: 7.10-7.21 AV: 14 T: FTMS - p ESI Full ms [100.0000-900.0000]</p> <p data-bbox="1263 667 1388 699">Experimental</p>
		MS <sup>2</sup>	<p data-bbox="289 846 1568 961">Nenhum íon fragmento estável do ion precursor m/z 319,96089 foi identificado. A estrutura proposta pelos autores foi a mais provável a partir da cloração do fipronil com base na razão isotópica, massa monoisotópica e DBE. No entanto, é importante destacar que a estrutura não foi elucidada com base no seu perfil de fragmentação.</p>

DBPs	ESI	Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS <sup>2</sup>	
		MS	<p>C:\Users\...\Negativo\Fipronil_T60 10/07/19 11:54:52</p> <p>NL: 5.15E5  C<sub>9</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>:  C<sub>9</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>  pa Chrg 1  Teórico</p> <p>NL: 1.22E6  Fipronil_T60#2155-  2268 RT: 7.66-7.88  AV: 22 T: FTMS - p ESI  Full ms  [100.0000-900.0000]  Experimental</p>
F5	(-)	MS <sup>2</sup>	<p>C:\Users\...\Negativo\Fipronil_T60 10/07/19 11:54:52</p> <p>Fipronil_T60 #1531-2259 RT: 5.44-7.87 AV: 4 NL  T: Average spectrum MS2 279.97 (1531-2259)</p> <p>300 250 200 150 100 50 0</p> <p>80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280</p> <p>m/z</p> <p>87.58104 110.97473 151.28818 169.41582 196.02495 212.94757 227.96035 243.98822* 251.96128 279.96587</p> <p>C<sub>7</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>  m/z = 212.94911</p> <p>C<sub>9</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub>ClF<sub>3</sub>  m/z = 243.98948</p> <p>C<sub>9</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>  m/z = 279.96506  Precursor</p> <p>*m/z 243.98822 é um fragmento típico para esse composto descrito na literatura. A proposta de Gomes Junior et al. 2017 é a ocorrência de duas espécies radicalares neutras. Esse fragmento foi observado nos espectros de MS<sup>2</sup> para o DBP F1, DBP F2, DBP F3, dicutidos acima.</p>

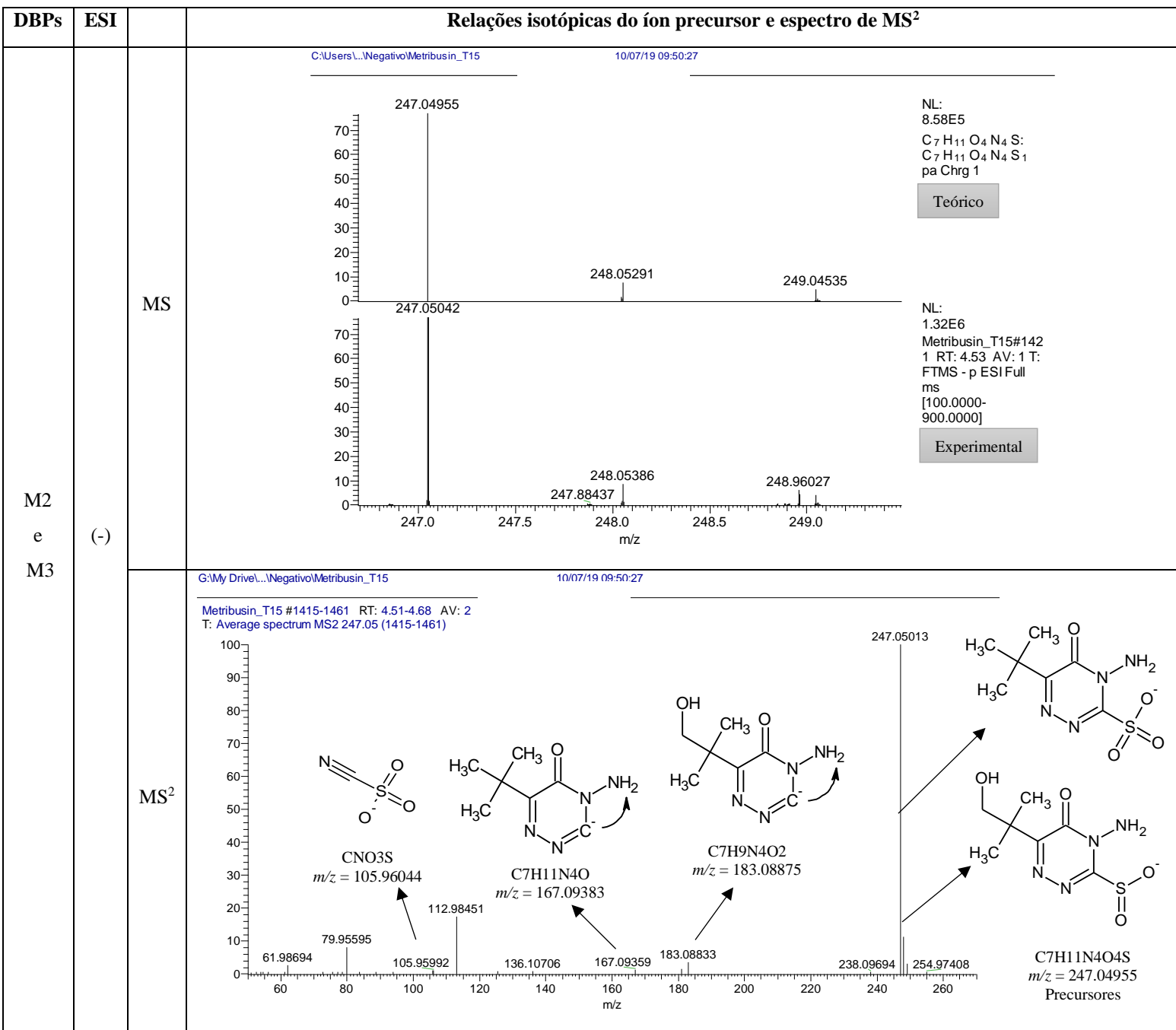
DBPs	ESI	Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS <sup>2</sup>
F6	(-)	<p>C:\Users\...\Negativo\Fipronil_T60 10/07/19 11:54:52</p> <p>NL: 5.30E5 C<sub>7</sub>H<sub>3</sub>NCl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>: C<sub>7</sub>H<sub>3</sub>N<sub>1</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub> pa Chrg 1 <b>Teórico</b></p> <p>NL: 3.24E5 Fipronil_T60#2249-2343 RT: 7.84-8.05 AV: 22 T: FTMS - p ESI Full ms [100.0000-900.0000] <b>Experimental</b></p>
F6	(-)	<p>C:\Users\...\Negativo\Fipronil_T15 10/07/19 11:30:00</p> <p>Fipronil_T15 #1490-2231 RT: 5.38-7.87 AV: 2 NL T: Average spectrum MS2 227.99 (1490-2231)</p> <p>227.96039</p> <p>207.95300 <b>Perda de HF</b></p> <p>C<sub>7</sub>H<sub>2</sub>NCl<sub>2</sub>F<sub>2</sub> m/z = 207.95378</p> <p>C<sub>7</sub>H<sub>3</sub>NCl<sub>2</sub>F<sub>3</sub> m/z = 227.95892 Precursor</p> <p>92.92624 109.06483 115.91880 130.98191 139.11221 158.97765 181.89780 197.99294</p>

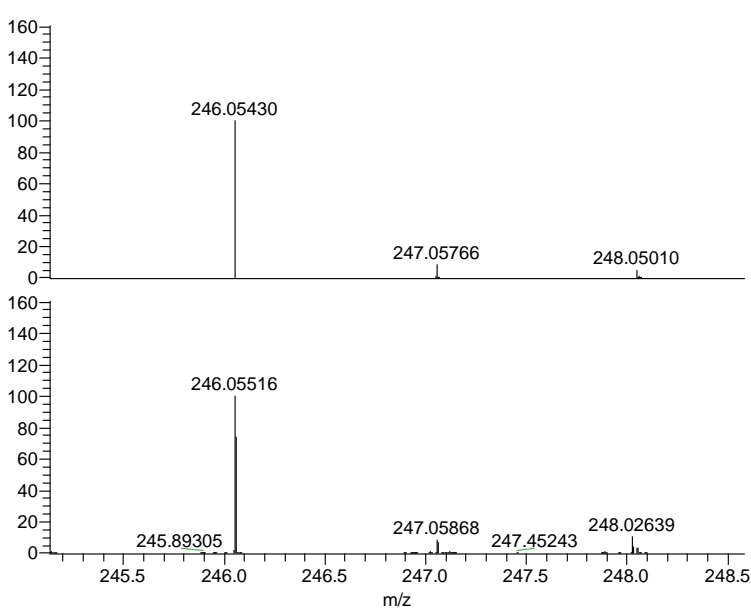
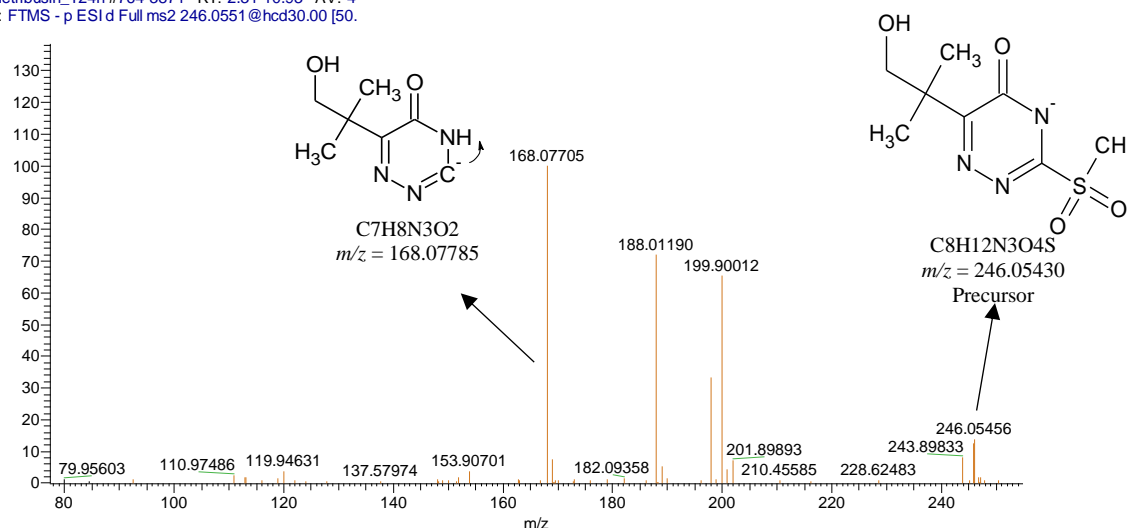
# ANEXO D – Dados de MS e MS<sup>2</sup> para os DBPs do metribuzim

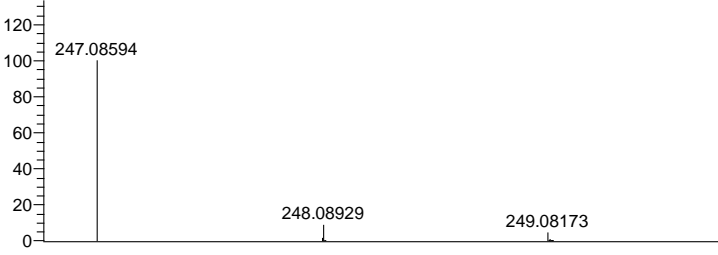
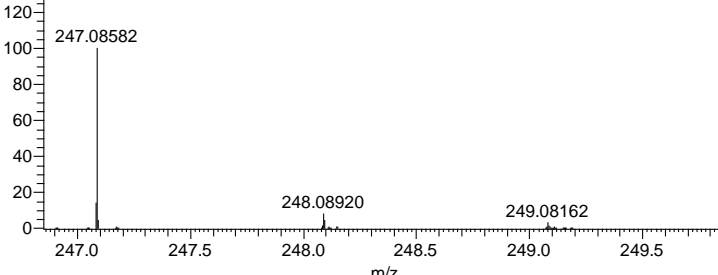
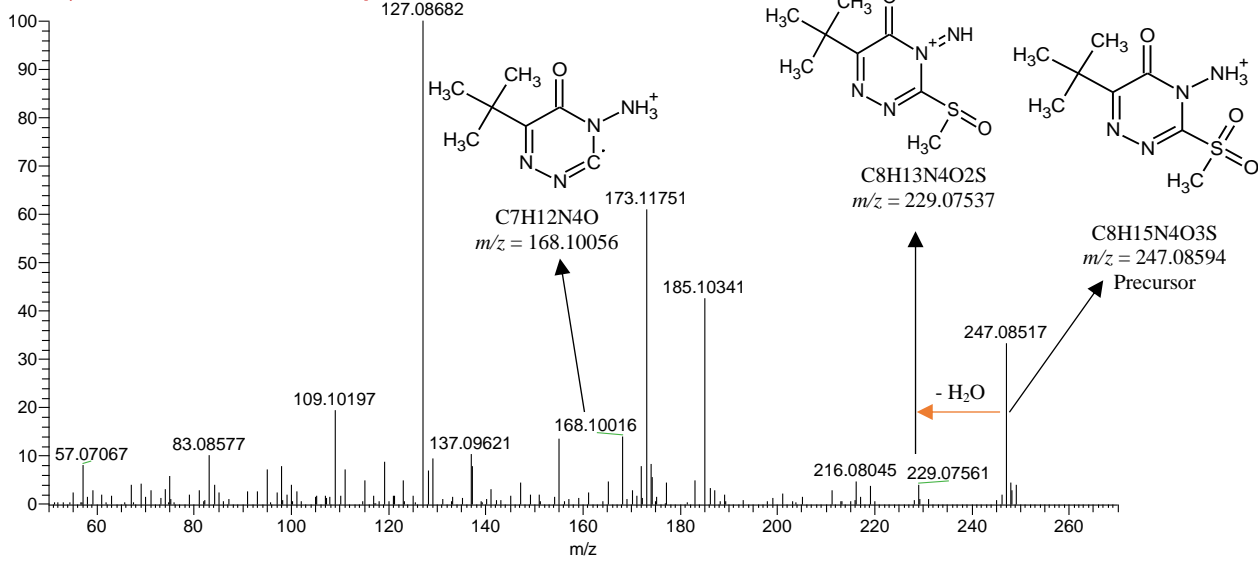
**Tabela D1.** Relações isotópicas do íon precursor de cada DBP formado e seu respectivo espectro de fragmentação na célula de colisão (MS<sup>2</sup>).

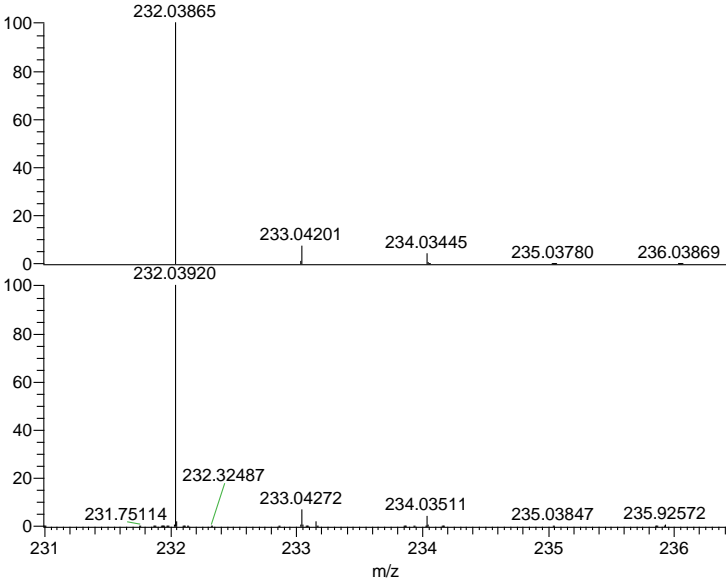
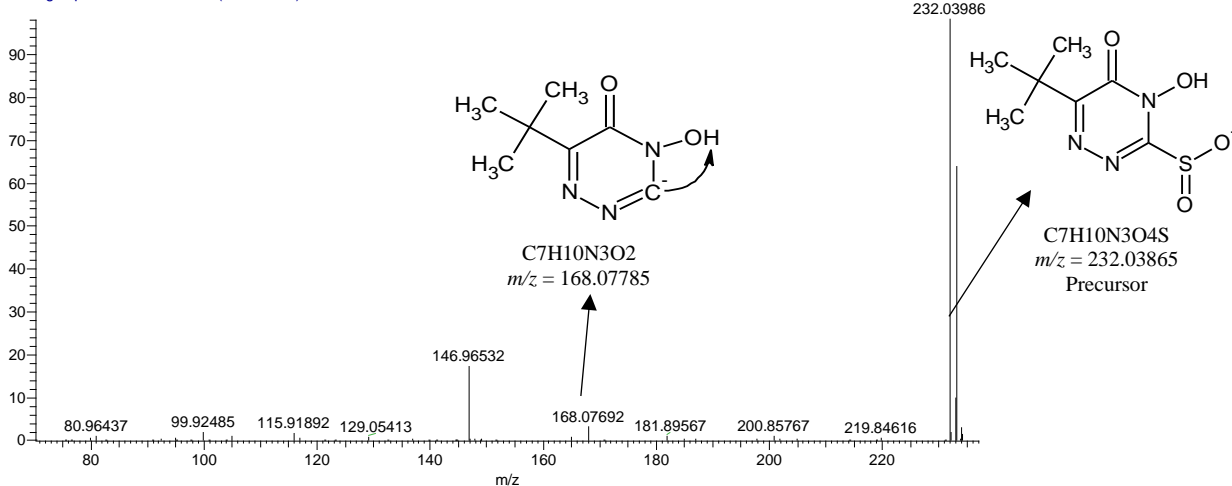
DBPs	ESI	Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS <sup>2</sup>
M1	(-)	<p>C:\Users\L...\NegativoMetribusin_T15 10/07/19 09:50:27</p> <p>NL: 8.49E5 C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>S: C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>S<sub>1</sub> pa Chrg 1</p> <p>Teórico</p> <p>NL: 2.93E6 Metribusin_T15#1784-1869 RT: 5.68-5.97 AV: 37 T: FTMS - p ESI Full ms [100.0000-900.0000]</p> <p>Experimental</p>
		<p>G:\My Drive\...\NegativoMetribusin_T15 10/07/19 09:50:27</p> <p>Metribusin_T15 #1786-1840 RT: 5.69-5.86 AV: 2 T: Average spectrum MS2 261.07 (1786-1840)</p> <p>CH<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S m/z = 78.98592</p> <p>C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> m/z = 154.07477</p> <p>C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> m/z = 183.08875</p> <p>C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S m/z = 261.06520 Precursor</p>

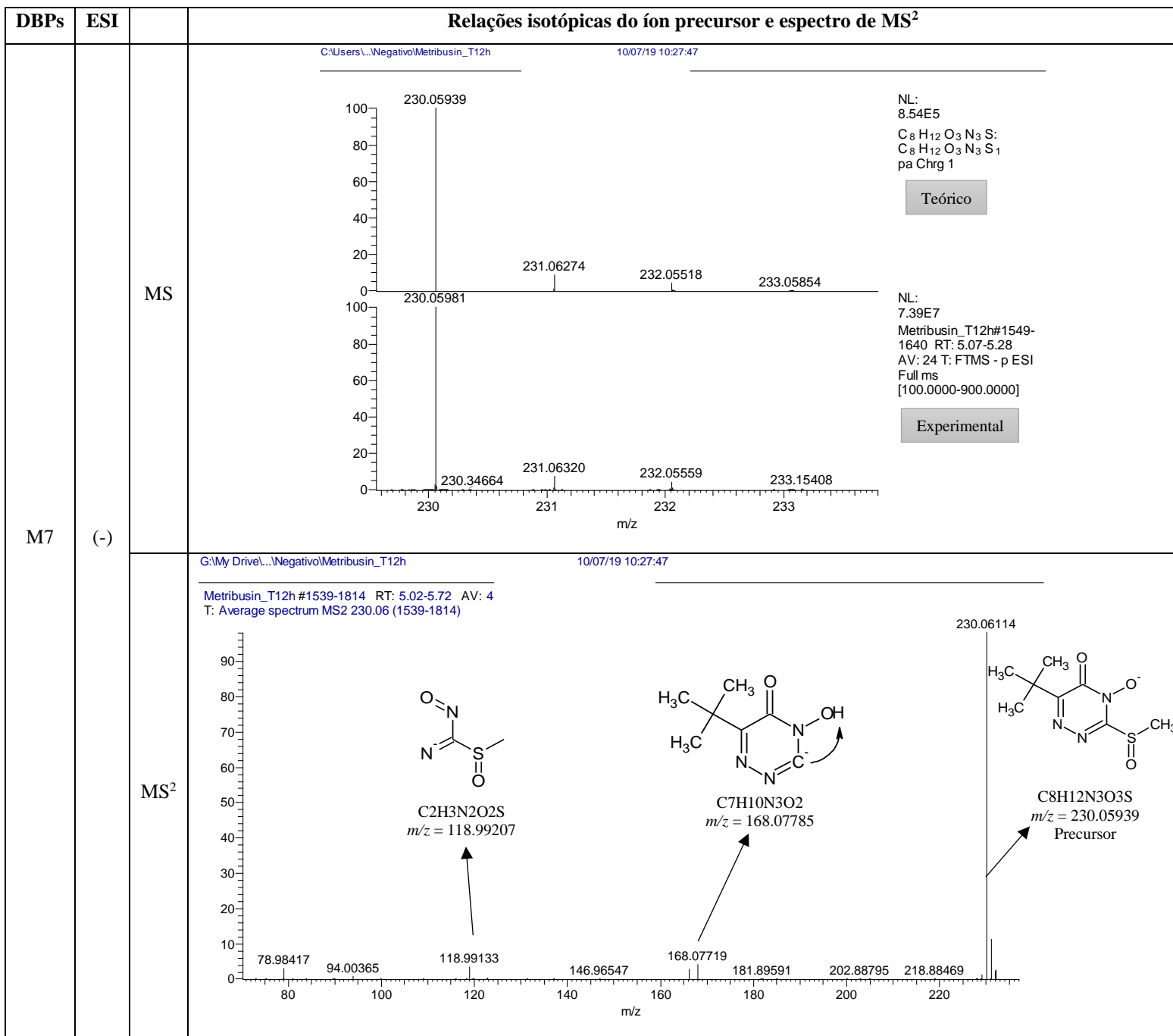


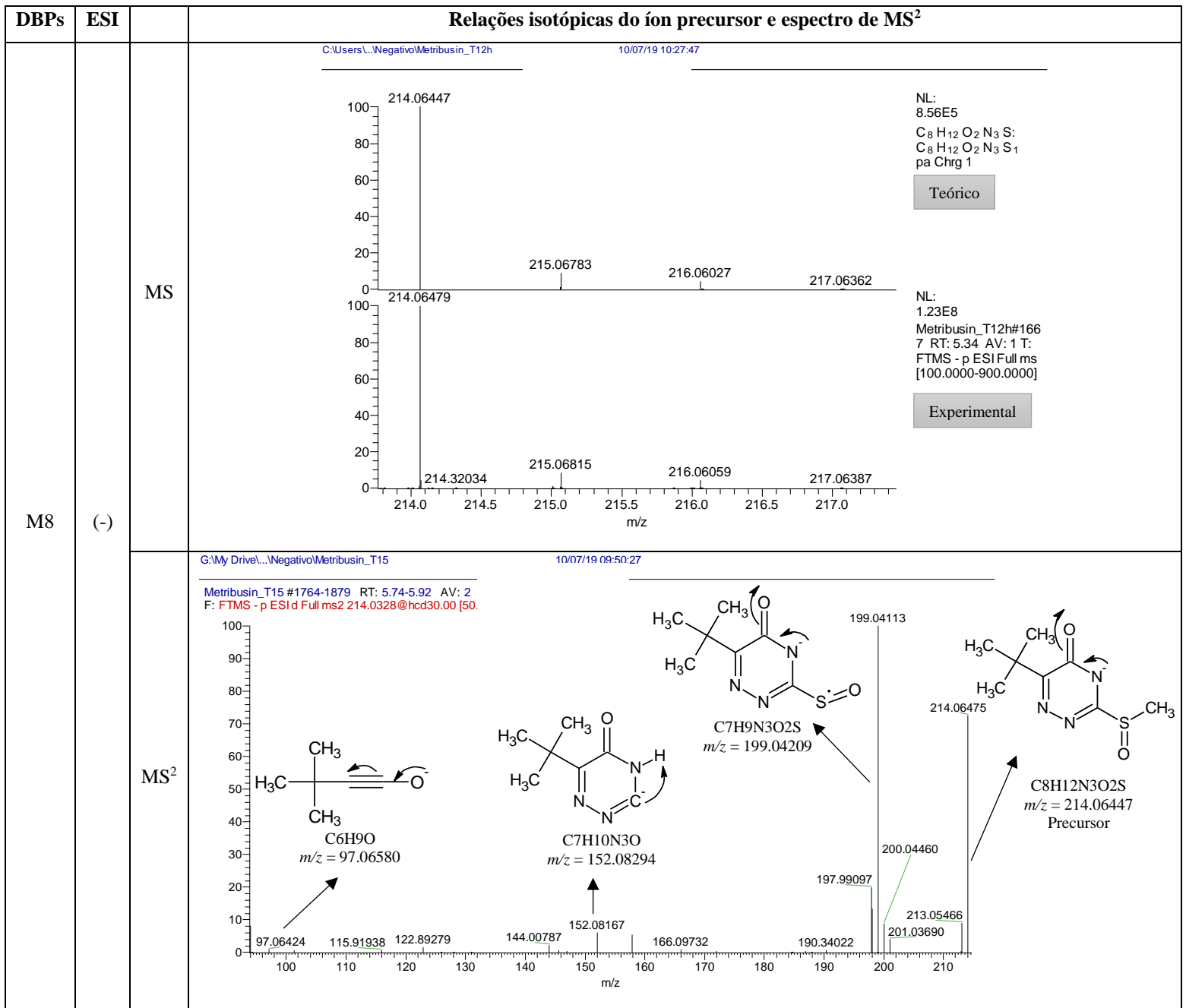


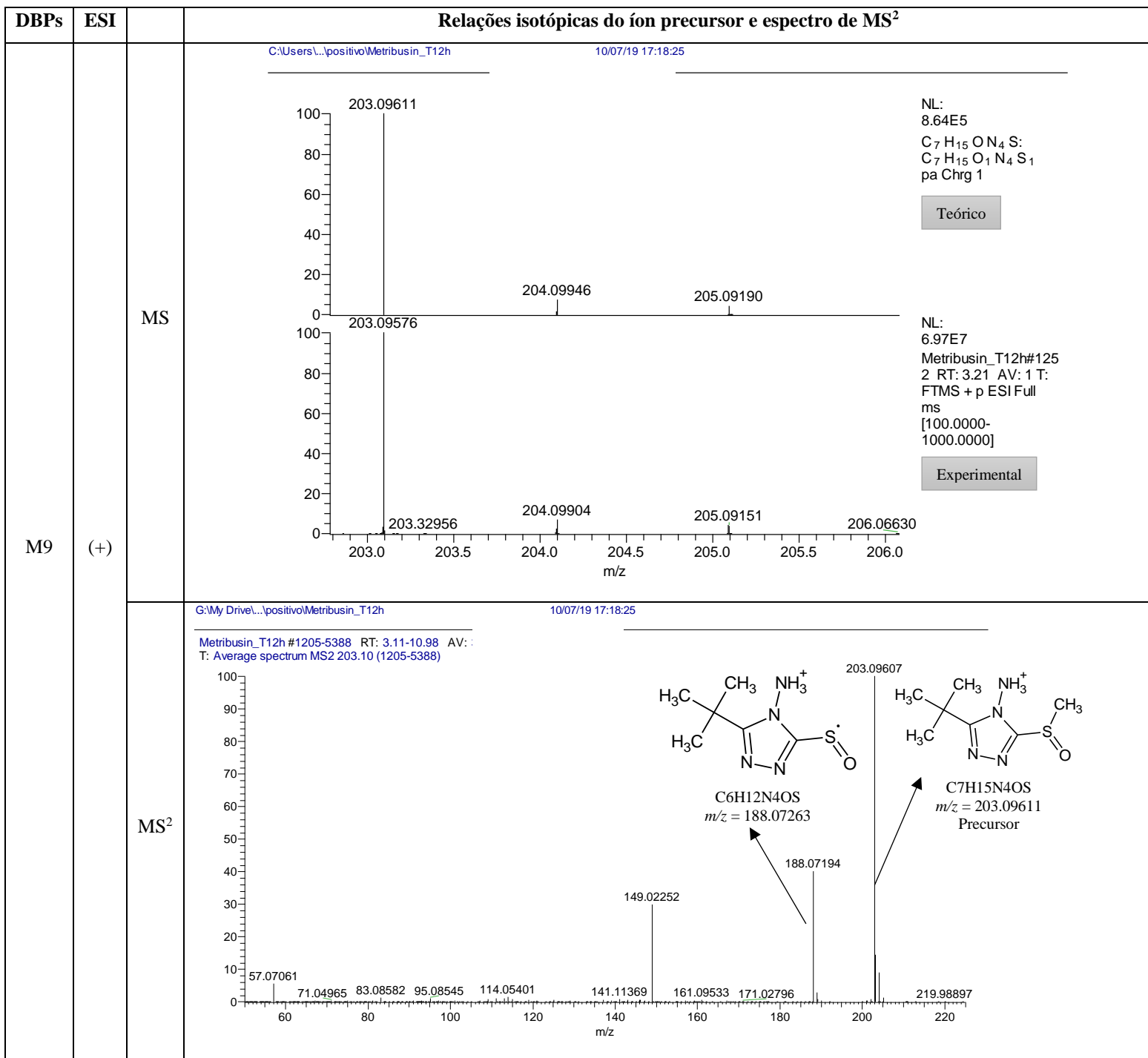
DBPs	ESI	Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS <sup>2</sup>	
M4	(-)	MS	<p>C:\Users\...\Negativo\Metribusin_T24h 10/07/19 10:40:14</p>  <p>NL: 8.52E5 C<sub>8</sub> H<sub>12</sub> O<sub>4</sub> N<sub>3</sub> S: C<sub>8</sub> H<sub>12</sub> O<sub>4</sub> N<sub>3</sub> S<sub>1</sub> pa Chrg 1</p> <p>Teórico</p> <p>NL: 4.47E5 Metribusin_T24h#1883-1966 RT: 5.92-6.20 AV: 36 T: FTMS - p ESI Full ms [100.0000-900.0000]</p> <p>Experimental</p>
		MS <sup>2</sup>	<p>G:\My Drive\...\Negativo\Metribusin_T24h 10/07/19 10:40:14</p> <p>Metribusin_T24h #764-3871 RT: 2.31-10.93 AV: 4 T: FTMS - p ESI d Full ms2 246.0551@hcd30.00 [50.</p>  <p>C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> m/z = 168.07785</p> <p>C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S m/z = 246.05430 Precursor</p>

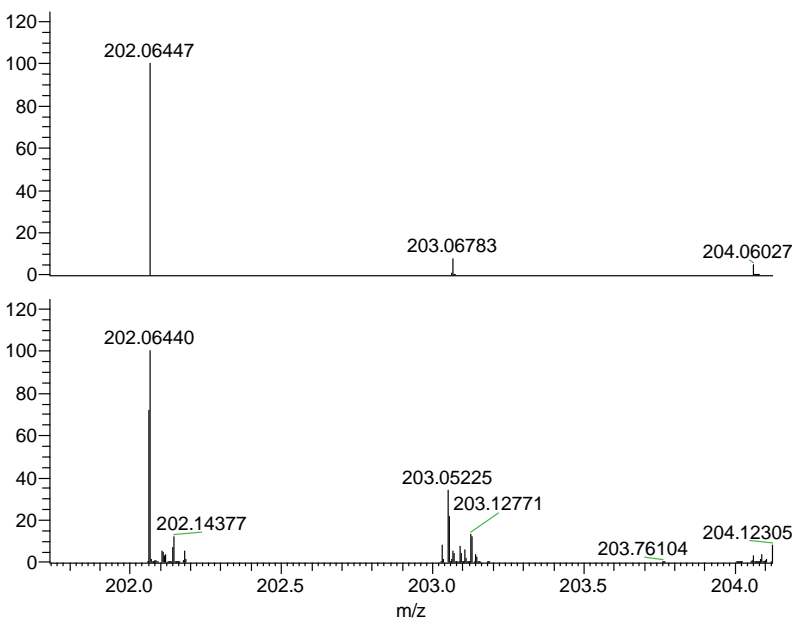
DBPs	ESI	Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS <sup>2</sup>	
M5	(+) MS	<p>C:\Users\...positivo\Metribusin_T12h</p>  <p>NL: 8.51E5 C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>N<sub>4</sub>S: C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>N<sub>4</sub>S<sub>1</sub> pa Chrg 1</p> <p>Teórico</p>	<p>10/07/19 17:18:25</p>  <p>NL: 3.24E6 Metribusin_T12h#190 6 RT: 4.55 AV: 1 T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1000.0000]</p> <p>Experimental</p>
	(+) MS <sup>2</sup>	<p>G:\My Drive\...positivo\Metribusin_T12h</p> <p>10/07/19 17:18:25</p> <p>Metribusin_T12h #1881-3108 RT: 4.50-6.79 AV: 4 F: FTMS + p ESI d Full ms2 247.0858@hcd30.00 [50</p>  <p>127.08682</p> <p>173.11751</p> <p>185.10341</p> <p>229.07561</p> <p>247.08517</p> <p>247.08594 Precursor</p> <p>- H<sub>2</sub>O</p> <p>C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O m/z = 168.10056</p> <p>C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S m/z = 229.07537</p> <p>C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S m/z = 247.08594</p>	

DBPs	ESI	Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS <sup>2</sup>	
M6	(-)	MS	<p>C:\Users\...\Negativo\Metribusin_T12h 10/07/19 10:27:47</p>  <p>NL: 8.61E5 C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>N<sub>3</sub>S: C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>N<sub>3</sub>S<sub>1</sub> pa Chrg 1</p> <p>Teórico</p> <p>NL: 1.58E7 Metribusin_T12h#148 8 RT: 4.83 AV: 1 T: FTMS - p ESI Full ms [100.0000-900.0000]</p> <p>Experimental</p>
		MS <sup>2</sup>	<p>G:\My Drive\...\Negativo\Metribusin_T12h 10/07/19 10:27:47</p> <p>Metribusin_T12h #1463-3884 RT: 4.75-10.98 AV: T: Average spectrum MS2 232.04 (1463-3884)</p>  <p>C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> m/z = 168.07785</p> <p>C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S m/z = 232.03865 Precursor</p>

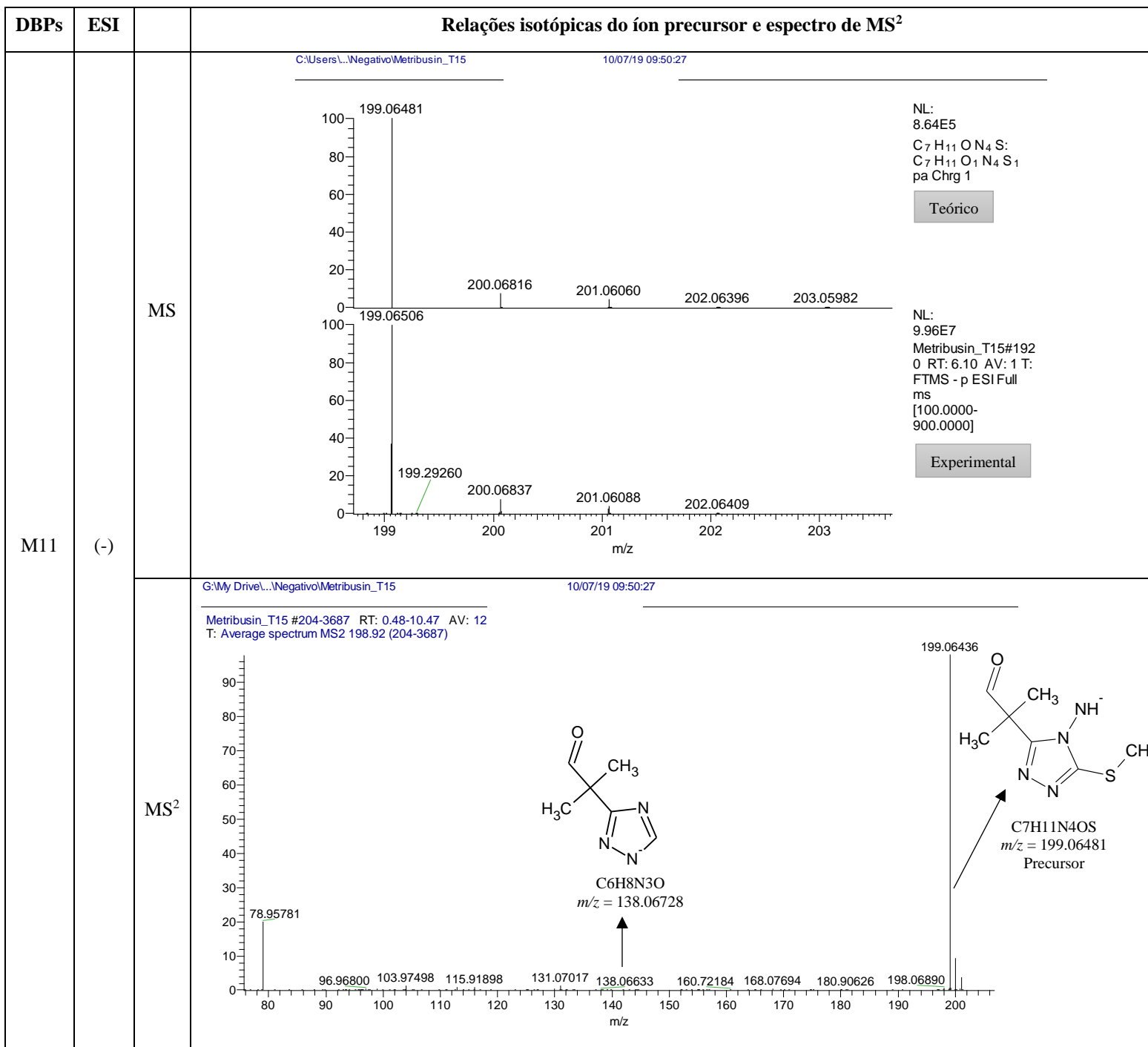


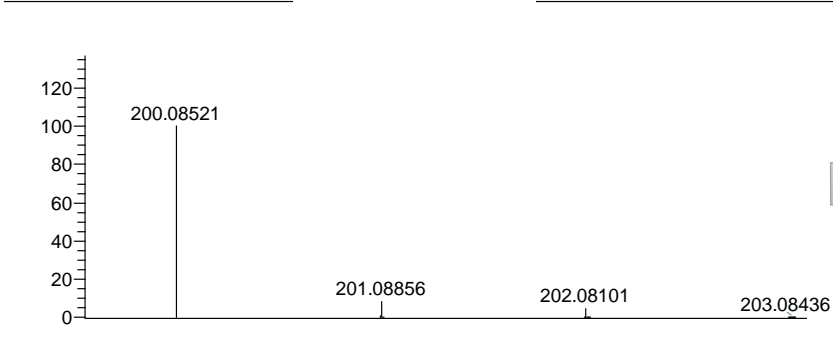
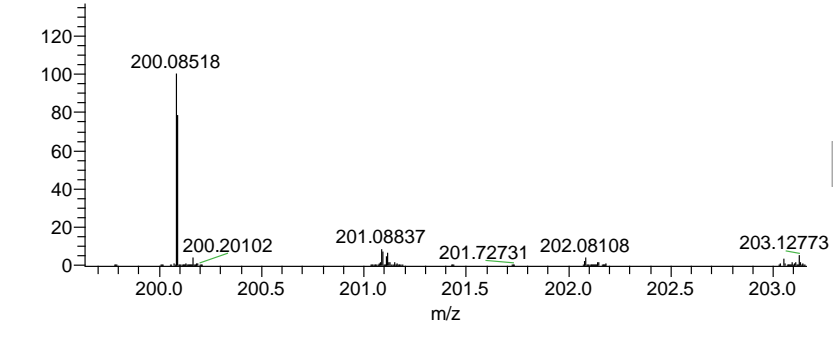
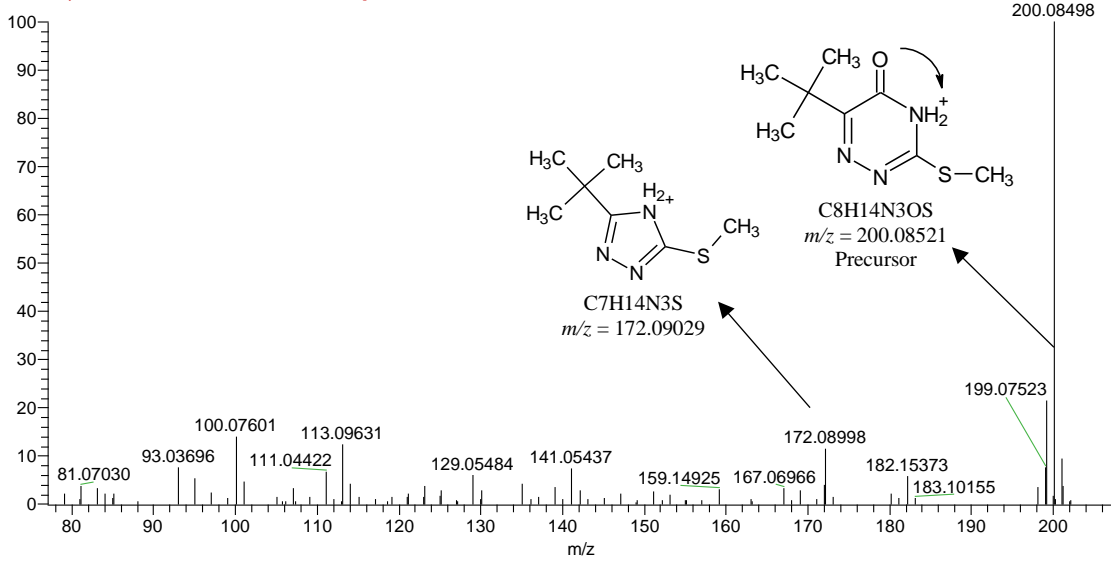


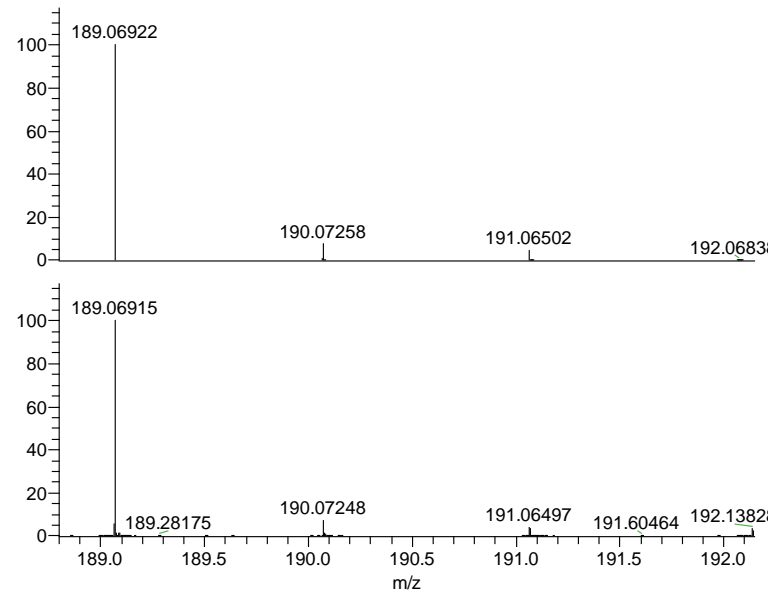


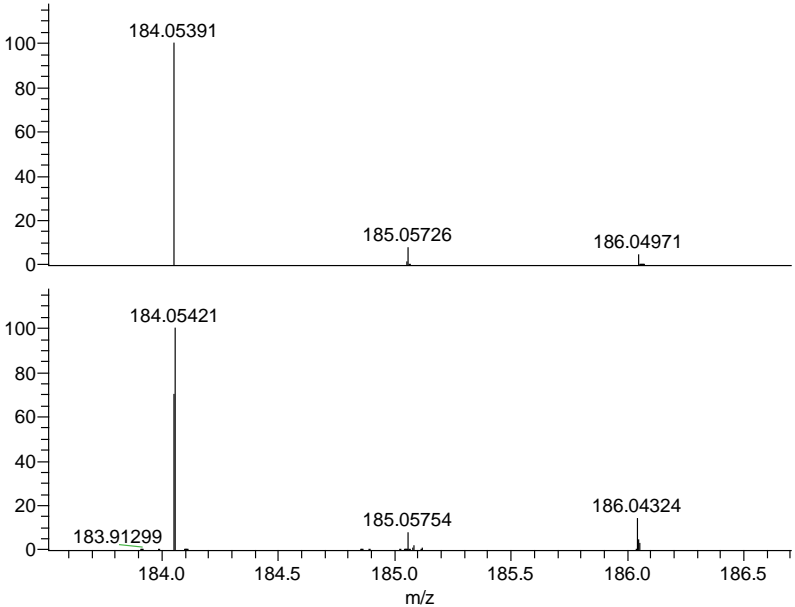
DBPs	ESI	Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS <sup>2</sup>	
M10	(+)	MS	<p>C:\Users\...\positivo\Metribusin_T24h 10/07/19 17:30:52</p>  <p>NL: 8.65E5 C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>S: C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>S<sub>1</sub> pa Chrg 1</p> <p>Teórico</p> <p>NL: 7.88E5 Metribusin_T24h#2303- 2486 RT: 5.28-5.61 AV: 31 T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1000.0000]</p> <p>Experimental</p>
		MS <sup>2</sup>	<p>O subproduto DBP M10 não gerou fragmentos de íons no espectro MS<sup>2</sup>, provavelmente devido intensidade muito baixa do íon precursor. A estrutura é sugerida como o produto da oxidação do enxofre seguida da desaminação do DBP M11.</p> <p style="text-align: center;">DBP M11.</p>

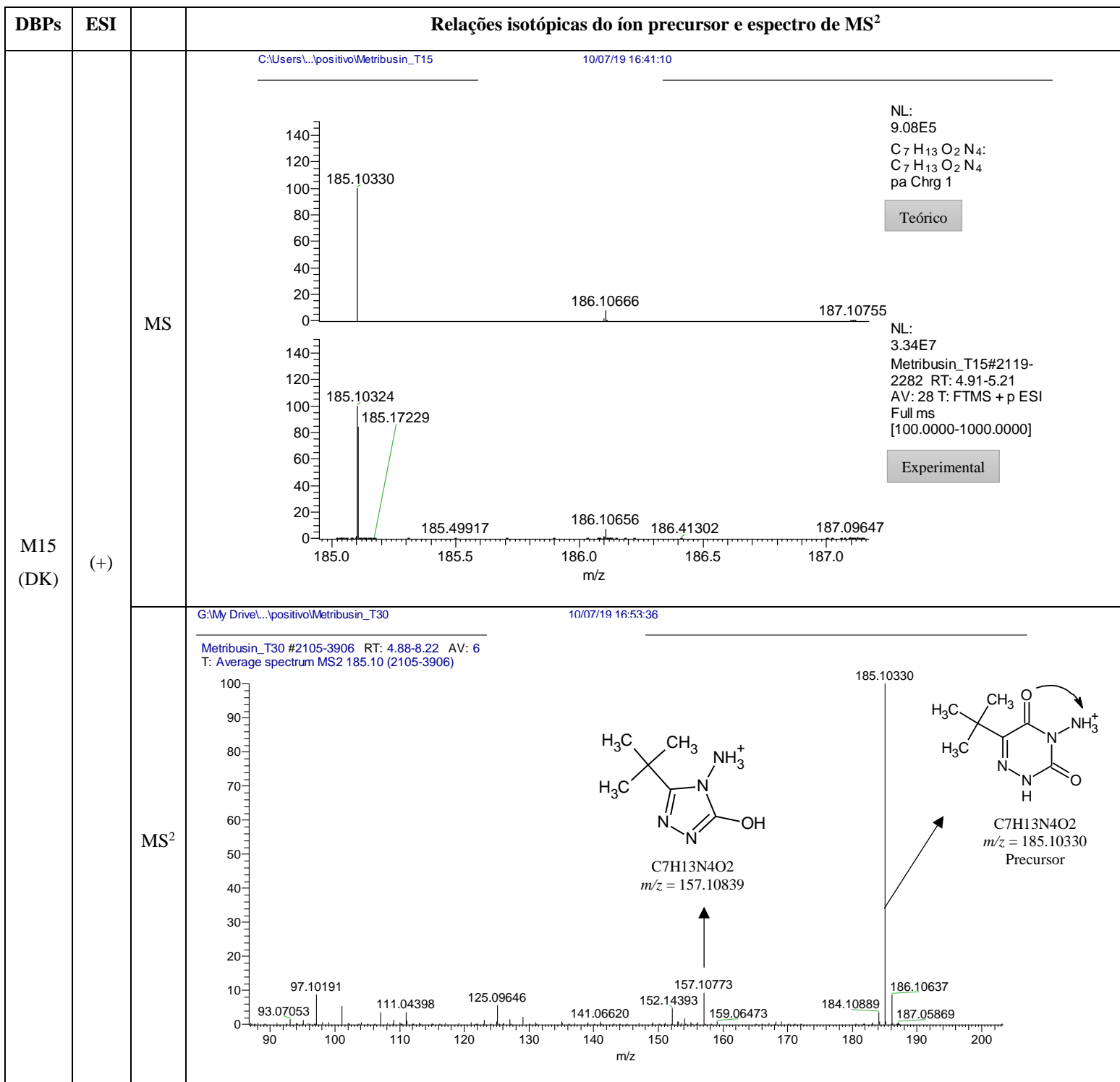


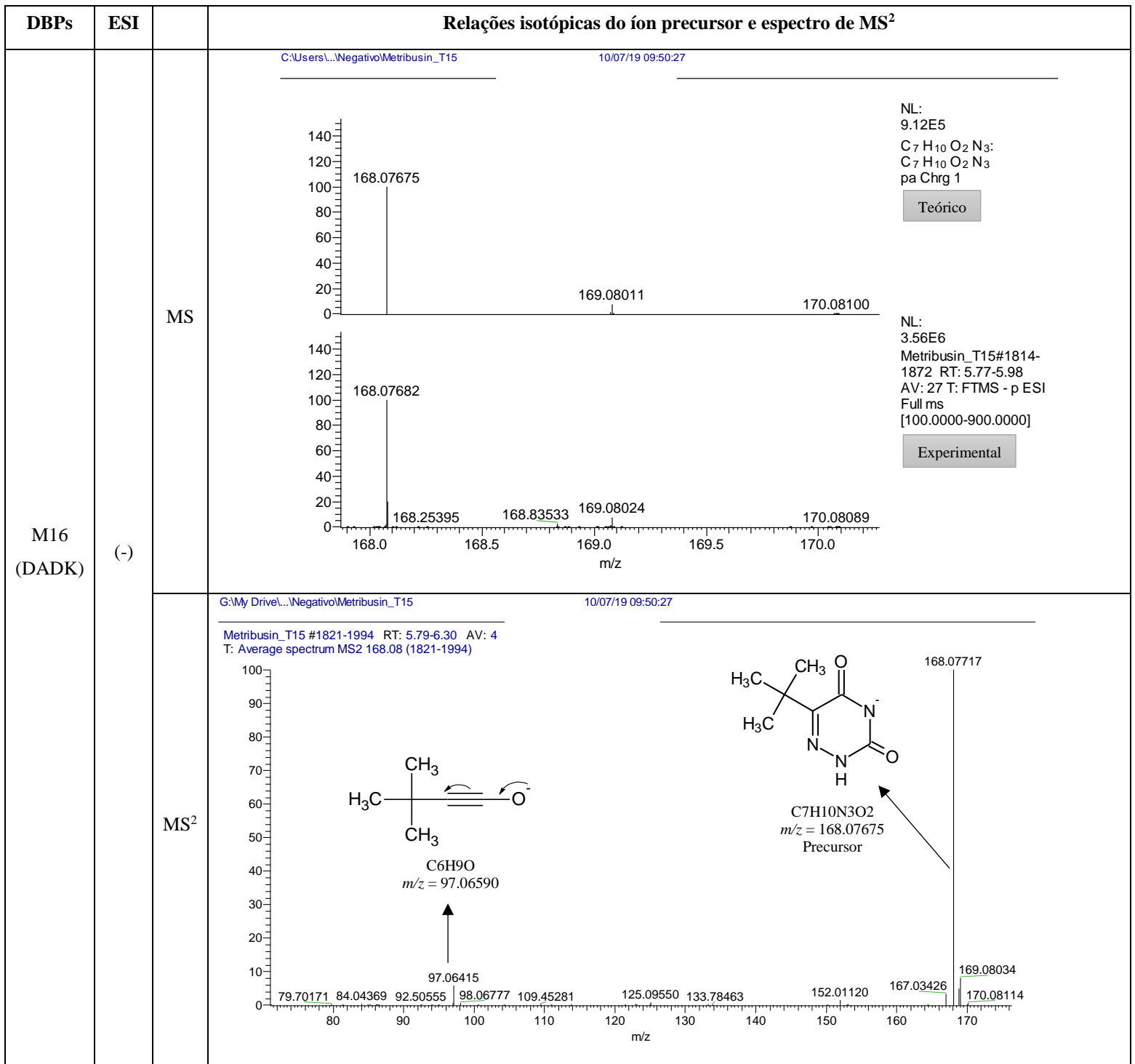


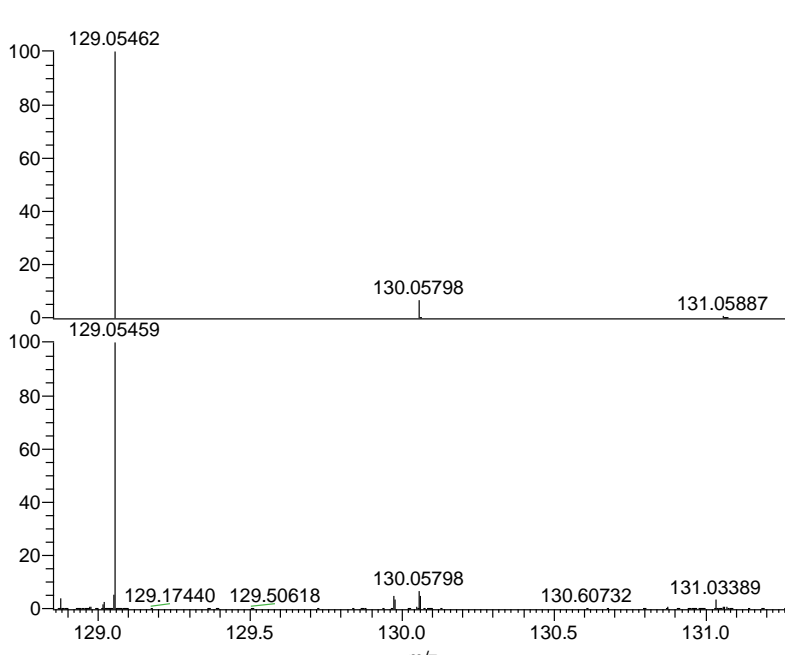
DBPs	ESI	Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS <sup>2</sup>	
M12 (DA)	(+) MS	<p>C:\Users\...\positivo\Metribusin_T15</p>  <p>NL: 8.58E5 C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>1</sub>N<sub>3</sub>S: C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>1</sub>N<sub>3</sub>S<sub>1</sub> pa Chrg 1</p> <p>Teórico</p>	<p>10/07/19 16:41:10</p>  <p>NL: 6.20E6 Metribusin_T15#2682-2820 RT: 5.96-6.21 AV: 23 T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1000.0000]</p> <p>Experimental</p>
		<p>G:\My Drive\...\positivo\Metribusin_T12h</p> <p>Metribusin_T12h #2673 RT: 5.98 AV: 1 NL: 4.73E F: FTMS + p ESI d Full ms2 200.0852@hcd30.00 [50]</p>  <p>MS<sup>2</sup></p> <p> <chem>Cc1nc(C)c(C)n1</chem> (C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>S, m/z = 172.09029)  <chem>Cc1nc(C)c(C)c(=O)n1</chem> (C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>OS, m/z = 200.08521, Precursor)  <chem>Cc1nc(C)c(C)c(=O)n1</chem> (C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>OS, m/z = 200.08498) </p>	<p>10/07/19 17:18:25</p>

DBPs	ESI	Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS <sup>2</sup>	
M13	(+)	MS	<p>C:\Users\...\positivoMetribusin_T15 10/07/19 16:41:10</p>  <p>NL: 8.68E5 C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>S: C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>S<sub>1</sub> pa Chrg 1</p> <p>Teórico</p> <p>NL: 9.46E6 Metribusin_T15#1701-1860 RT: 4.13-4.42 AV: 28 T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1000.0000]</p> <p>Experimental</p>
			MS <sup>2</sup>

DBPs	ESI	Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS <sup>2</sup>	
M14	(-)	MS	<p data-bbox="418 268 958 289">C:\Users\...\Negativo\Metribusin_T24h 10/07/19 10:40:14</p>  <div data-bbox="1263 331 1412 499"> <p>NL: 8.68E5 C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>ON<sub>3</sub>S: C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>O<sub>1</sub>N<sub>3</sub>S<sub>1</sub> pa Chrg 1</p> <p>Teórico</p> </div> <div data-bbox="1263 615 1445 808"> <p>NL: 3.19E6 Metribusin_T24h#192 1 RT: 6.04 AV: 1 T: FTMS - p ESI Full ms [100.0000-900.0000]</p> <p>Experimental</p> </div>
		MS <sup>2</sup>	<p data-bbox="305 1123 1518 1197">O subproduto DBP M14 não gerou fragmentos de íons no espectro MS<sup>2</sup>, provavelmente devido intensidade muito baixa do íon precursor. A estrutura é sugerida como o produto da perda da amina primária do DBP M11.</p>

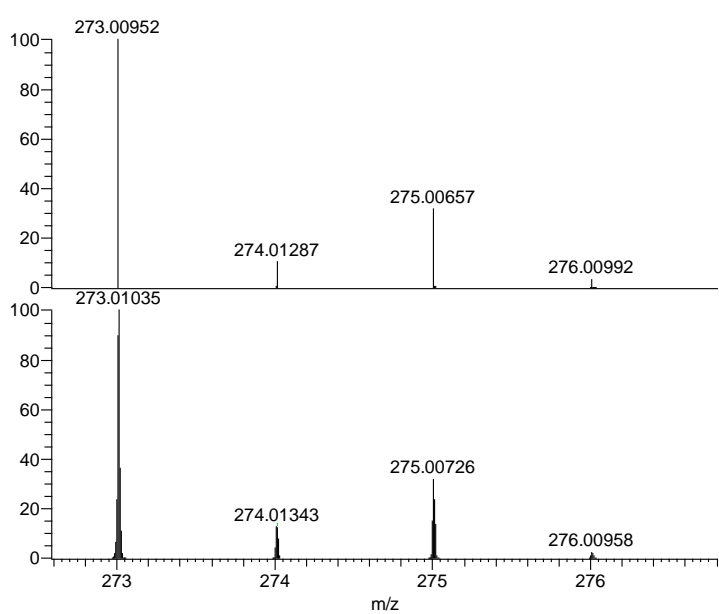
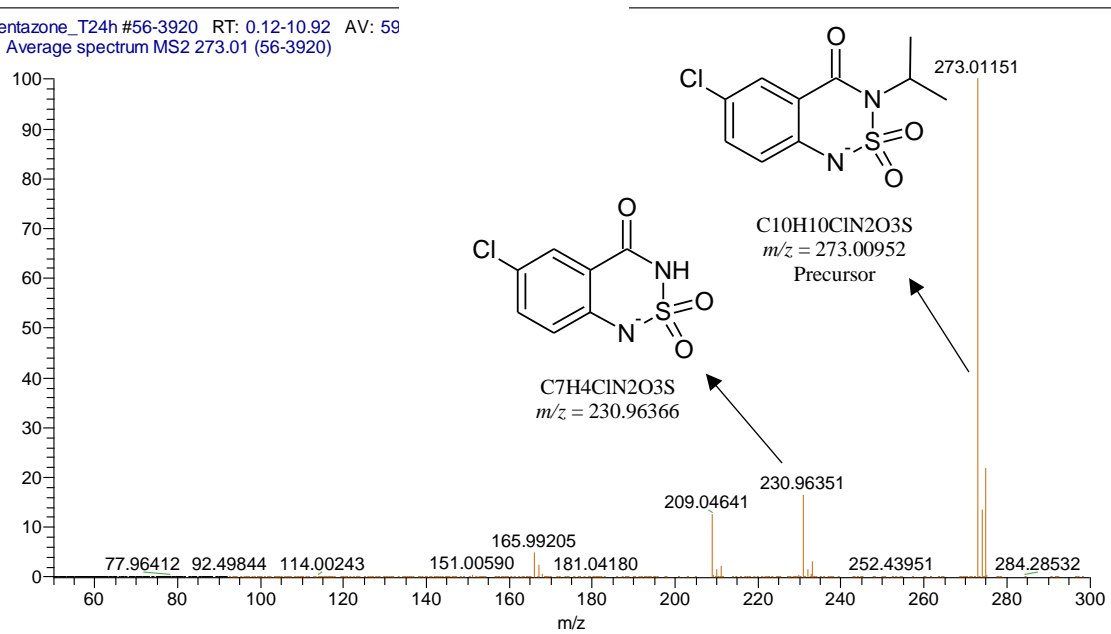




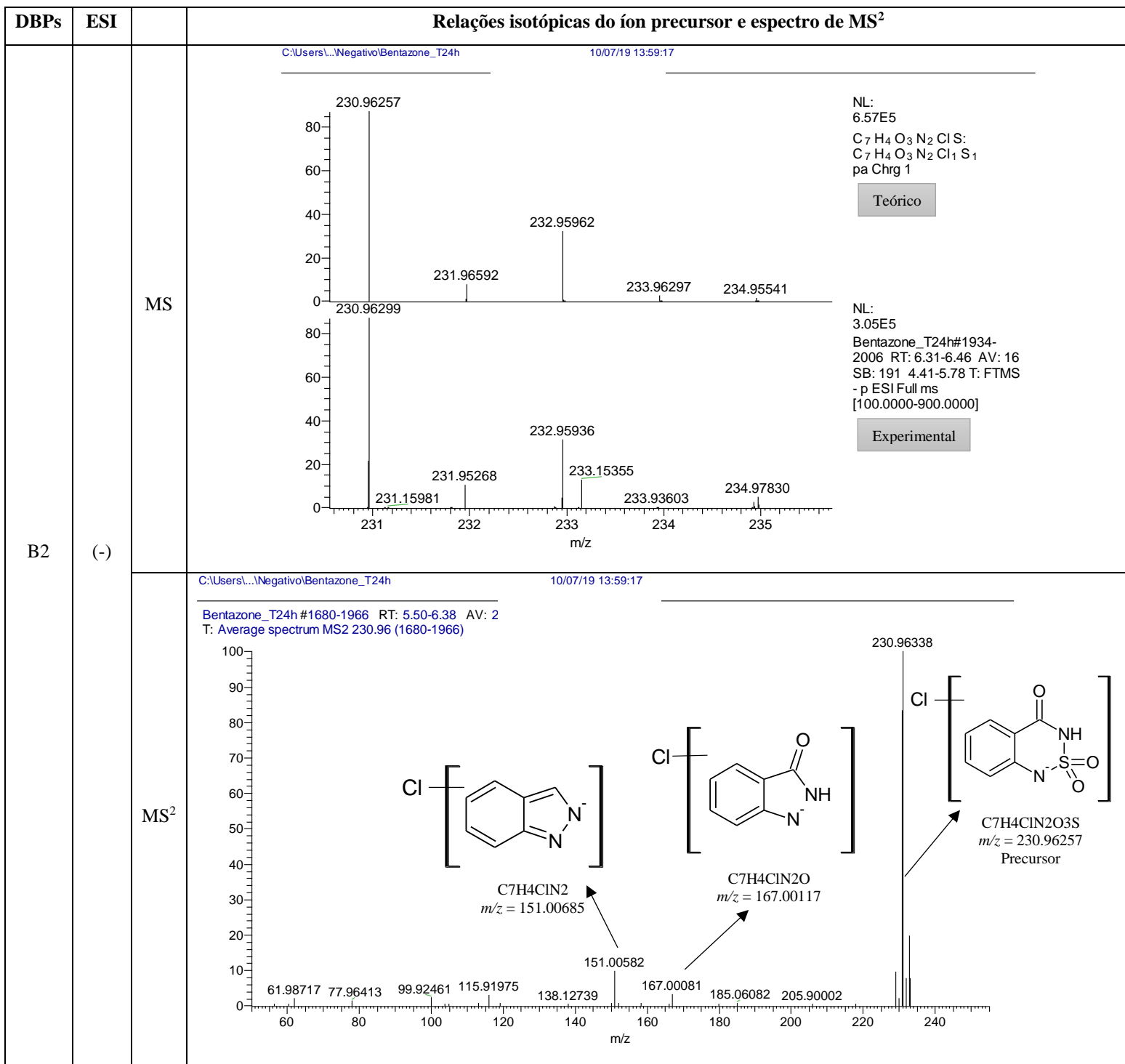
BPs	ESI	Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS <sup>2</sup>	
M17	(-)	MS	<p data-bbox="406 254 958 275">C:\Users\...\Negativo\Metribusin_T15 10/07/19 09:50:27</p>  <div data-bbox="1234 315 1347 483"> <p>NL: 9.30E5 C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>: C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub> pa Chrg 1</p> <p>Teórico</p> </div> <div data-bbox="1234 609 1445 819"> <p>NL: 1.53E6 Metribusin_T15#926- 1063 RT: 2.81-3.24 AV: 51 T: FTMS - p ESI Full ms [100.0000-900.0000]</p> <p>Experimental</p> </div>
		MS <sup>2</sup>	<p data-bbox="300 1102 1526 1228">A formação de ácido trimetilpirúvico (ácido cetocarboxílico) foi previamente descrita em dados da literatura para a oxidação do metribuzim. BBP M17 não gerou íons de fragmento estáveis no espectro de MS<sup>2</sup> devido à sua baixa relação massa/carga.</p>

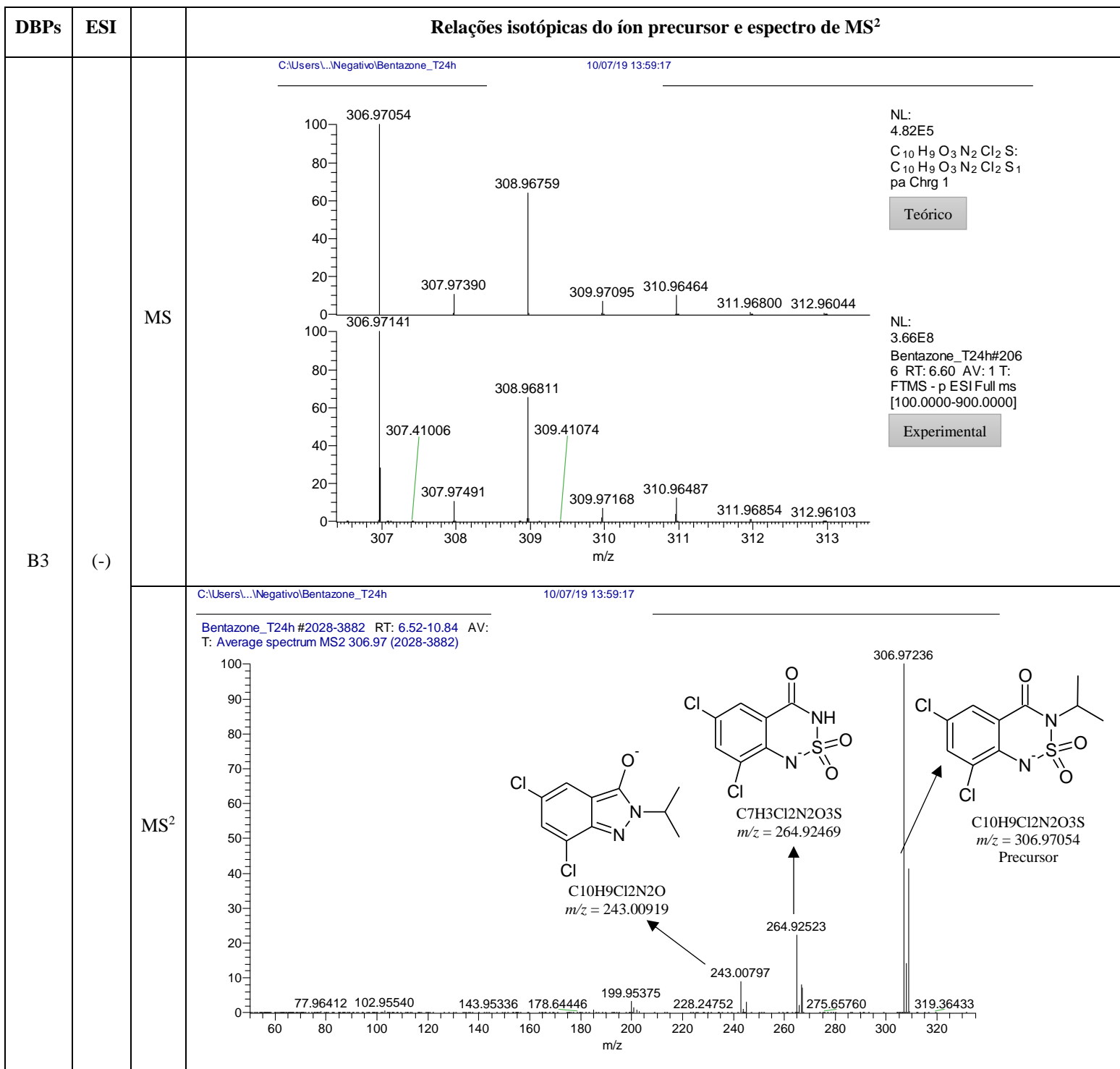
# ANEXO E – Dados de MS e MS<sup>2</sup> para os DBPs do bentazone

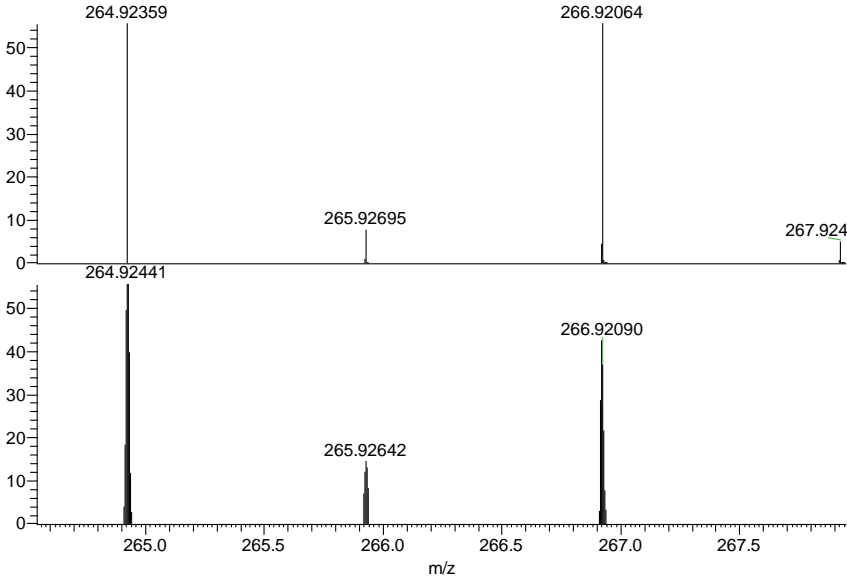
**Tabela E1.** Relações isotópicas do íon precursor de cada DBP formado e seu respectivo espectro de fragmentação na célula de colisão (MS<sup>2</sup>).

DBPs	ESI		Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS <sup>2</sup>
B1	(-)	MS	<p>C:\Users\...\Negativo\Bentazone_T24h 10/07/19 13:59:17</p>  <p>NL: 6.36E5 C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>ClS: C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>ClS<sub>1</sub> pa Chrg 1</p> <p>Teórico</p> <p>NL: 8.76E5 Bentazone_T24h#1968 RT: 6.39 AV: 1 T: FTMS - p ESI d Full ms2 876.9632@hcd30.00 [61.0000-915.0000]</p> <p>Experimental</p>
		MS <sup>2</sup>	<p>C:\Users\...\Negativo\Bentazone_T24h 10/07/19 13:59:17</p> <p>Bentazone_T24h #56-3920 RT: 0.12-10.92 AV: 59 T: Average spectrum MS2 273.01 (56-3920)</p>  <p>C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S <i>m/z</i> = 273.00952 Precursor</p> <p>C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S <i>m/z</i> = 230.96366</p>







DBPs	ESI	Relações isotópicas do íon precursor e espectro de MS <sup>2</sup>	
B4	(-)	MS	<p data-bbox="386 279 649 296">C:\Users\...\Negativo\Bentazone_T24h</p> <p data-bbox="857 279 987 296">10/07/19 13:59:17</p>  <div data-bbox="1273 342 1435 447"> <p>NL: 4.98E5 C<sub>7</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>S: C<sub>7</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>S<sub>1</sub> pa Chrg 1</p> </div> <div data-bbox="1273 453 1385 495">Teórico</div> <div data-bbox="1273 600 1471 741"> <p>NL: 2.81E4 Bentazone_T24h#2044 RT: 6.56 AV: 1 T: FTMS - p ESI d Full ms2 391.9492@hcd30.00 [50.0000-420.0000]</p> </div> <div data-bbox="1273 747 1430 789">Experimental</div> <p data-bbox="302 1077 1568 1150">Não foi possível obter o MS<sup>2</sup> visto que o íon foi detectado em intensidade muito baixa, sendo a estrutura proposta apenas neste estudo seguindo a rota de degradação do bentazone.</p>

## **ARTIGOS PUBLICADOS**



# Aqueous chlorination of herbicide metribuzin: Identification and elucidation of “new” disinfection by-products, degradation pathway and toxicity evaluation

André Luis Corrêa de Barros<sup>a</sup>, Daniel Aparecido da Silva Rodrigues<sup>b</sup>,  
Camila Cristina Rodrigues Ferreira da Cunha<sup>b</sup>, Igor Aparecido Santana das Chagas<sup>c</sup>,  
Daiana Rocha do Espírito Santo<sup>d</sup>, Silvana de Queiroz Silva<sup>a,c</sup>,  
Robson José de Cássia Franco Afonso<sup>a,b,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Postgraduation Program in Environmental Engineering (ProAmb), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, 35400-000, Brazil

<sup>b</sup> Multicenter Postgraduation Program in Chemistry - Minas Gerais, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, 35400-000, Brazil

<sup>c</sup> Department of Biological Sciences, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, 35400-000, Brazil

<sup>d</sup> Department of chemistry, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, 35400-000, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 5 May 2020

Revised 19 October 2020

Accepted 20 October 2020

Available online 28 October 2020

### Keywords:

Pesticides

Metribuzin

Chlorination

Disinfection by-products

Water

Toxicity

## ABSTRACT

A widely used herbicide, metribuzin, was evaluated for degradation, mineralization and disinfection by-products (DBPs) formation during aqueous chlorination. In addition, to assess the toxicity effects of chlorination on metribuzin solution the following tests were performed: acute toxicity using *Artemia salina* nauplii; cell viability using MTT assay; estrogenicity using a re-engineered Bioluminescent Yeast Estrogen Screen (BLYES) and a constitutively bioluminescent strain (BLYR); mutagenicity and developmental toxicity using Q(SAR) methodology. Metribuzin at 10 mg·L<sup>-1</sup> was degraded by chlorination, achieving 93% of removal at 30 min of reaction. TOC analysis showed that the herbicide does not suffer complete mineralization, even after 24 h of contact with free chlorine. Seventeen DBPs were detected and their structural formulae were elucidated by high resolution mass spectrometry. Toxicity effects for chlorinated solutions increased when compared to the unreacted metribuzin solution. DBPs were more toxic to *Artemia salina* nauplii, increasing around 20% on nauplii mortality. It was also observed high estrogenicity to human receptors in BLYES assays and mutagenic and developmental toxicant effects to animals and humans in Q(SAR) methodology, suggesting that DBPs are potentially more toxic than the precursor metribuzin. Metribuzin solutions at 10 mg·L<sup>-1</sup> showed equivalent 17-β-estradiol values ranged from 0.061 to 6.71 µg·L<sup>-1</sup> after to be chlorinated at different reaction times.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Metribuzin (4-amino-6-tert-butyl-4,5-dihydro-3-methylthio-1,2,4-triazin-5-one), one of the most important selective triazinone herbicides, is an asymmetrical triazine used for pre- and post-emergence control of grass and broadleaved weed in crops. It is a photosynthesis inhibitor, blocking the electron transport in the Hill reaction of photosystem II (Antonopoulou and Konstantinou, 2014; Štěpánova et al., 2012).

Metribuzin is considered nontoxic or slightly toxic to non-target species such as mammals, bees, fresh or estuarine/marine fishes and invertebrates and moderately toxic to avian species on an

acute basis. According to EPA, metribuzin has not shown carcinogenicity, mutagenicity or developmental toxicity effects to humans and animals (EPA, 2003, 1998).

Due to its efficiency and relative low toxicity, this herbicide has been extensively used in diverse crops worldwide, such as: soybean, sugar cane, tomato, carrots, vines and others (Honório et al., 2013; Travlos et al., 2017). Consequently, metribuzin has been determined in different aquatic compartments at trace concentration levels. Metribuzin is highly susceptible to runoff and leaching into surface and groundwater due to its physical and chemical properties (Antonopoulou and Konstantinou, 2014; Fairchild and Sappington, 2002; Štěpánova et al., 2012). Residues levels up to 25.15 µg·L<sup>-1</sup> in water samples have been reported in the literature (Antonopoulou and Konstantinou, 2014).

In Brazil, surface and groundwater metribuzin contamination has been associated to soybean, corn and cotton producing

\* Corresponding author.

E-mail address: [robsonafonso@ufop.edu.br](mailto:robsonafonso@ufop.edu.br) (R.J.d.C.F. Afonso).



# Identification, Elucidation, and Toxicity Assessment of Nontarget Disinfection By-products from Fipronil Chlorination

André Luis Corrêa de Barros · Daniel Aparecido da Silva Rodrigues · Camila Cristina Rodrigues Ferreira da Cunha · Silvana de Queiroz Silva · Robson José de Cássia Franco Afonso

Received: 9 February 2021 / Accepted: 29 March 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2021

**Abstract** In the present study, fipronil degradation was evaluated in typical chlorination conditions (fipronil: 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; free chlorine concentration: 2  $\text{mg L}^{-1}$ ; pH 7.5; 25 °C). Fipronil was quickly degraded by chlorination with half-time life of 2.08 min, achieving 95% of degradation in 15 min of reaction. For identification and elucidation of its disinfection by-products, fipronil solutions (2.0  $\text{mg L}^{-1}$ ) were chlorinated at different contact times. Six by-products were identified and their structural formulas were elucidated by high-resolution mass spectrometry. Lastly, the toxicity of the unreacted and chlorinated solutions was evaluated using in vitro, in vivo, and in silico assays. Unreacted and chlorinated solutions were toxic to *Artemia salina* nauplii with an increase on toxic effects after 24 h of reaction time. No

estrogenicity and cytotoxicity were observed for the tested solutions using re-engineered bioluminescent yeast estrogen screen and colorimetric MTT assays, respectively. According to quantitative structure-activity relationship methodology, chlorination may produce a more mutagenic compound than the precursor fipronil. The generated disinfection by-products also proved to be developmental toxicant, although it was not possible to measure their relative potency in relation to the parent compound.

**Keywords** Pesticides · Degradation · Oxidation · Disinfection step · Water treatment · Drinking water

A. L. C. de Barros (✉)  
Postgraduation Program in Environmental Engineering (ProAmb),  
Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG  
35400-000, Brazil  
e-mail: andre.barros@ufop.edu.br

D. A. da Silva Rodrigues · C. C. R. F. da Cunha  
Multicenter Postgraduation Program in Chemistry – Minas Gerais,  
Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG 35400-000,  
Brazil

S. Silva  
Department of Biological Sciences, Universidade Federal de Ouro  
Preto, Ouro Preto, MG 35400-000, Brazil

R. J. Afonso  
Department of Chemistry, Universidade Federal de Ouro Preto,  
Ouro Preto, MG 35400-000, Brazil

## 1 Introduction

Fipronil (5-amino-I-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(I R,S)-(trifluoromethyl)sulfinyl]-I H-pyrazole-3-carbonitrile) is a relatively new insecticide and part of a small class of pesticides known as phenylpyrazoles and fiproles. Fipronil is a broad-spectrum and low application rate insecticide, which acts on the central nervous system of insects. This pesticide causes interference on gamma-aminobutyric acid (GABA) channel that regulate the passage of chloride ions (Lilia, 2003). In addition, fipronil has a distinct advantage, which is its selectivity to the invertebrate GABA channel. Fipronil bond to the vertebrate GABA channel is less stable, ensuring a supposed safety to its use (Chamberlain et al., 2010; Lilia, 2003).