

## Formação de subprodutos de desinfecção da água e avaliação do seu potencial genotóxico: o caso dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Miguel Pinto<sup>1</sup>, Marlene Rebola<sup>1,3</sup>, Henriqueta Louro<sup>1</sup>, Alexandra MM Antunes<sup>2</sup>, Sílvia S José<sup>3</sup>, M Raquel Rocha<sup>3</sup>, Maria João Silva<sup>1</sup>, Ana Sofia Cardoso<sup>3</sup>  
ana.s.cardoso@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana, INSA.

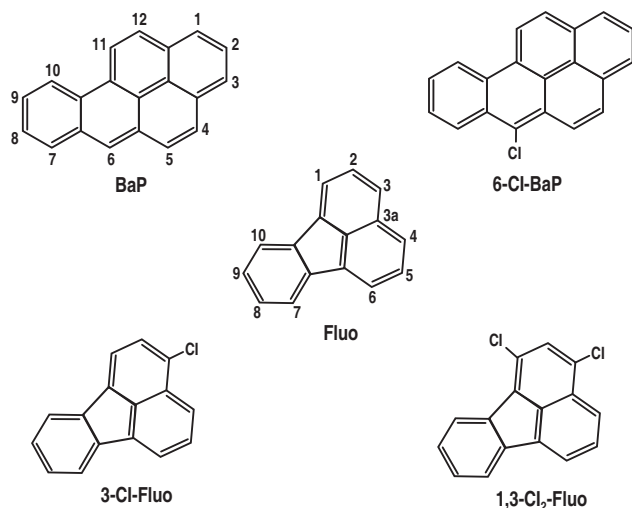
(2) Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa.

(3) Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos que apresentam um elevado potencial mutagénico e carcinogénico e têm sido também classificados como desreguladores endócrinos.

As águas superficiais podem ser contaminadas com HAPs através de descargas de efluentes industriais não tratados e de águas residuais municipais. Os fogos florestais libertam, para a atmosfera, este tipo de compostos que se podem depositar nas águas, podendo também ocorrer a contaminação de águas devido à solubilização da matéria orgânica proveniente de solos poluídos. Consequentemente, a formação de HAPs clorados (Cl-HAPs) durante o processo de cloração da água é possível, permanecendo os compostos mais estáveis dissolvidos nas águas tratadas. Esta assunção é também consubstanciada pela deteção de Cl-HAPs em amostras ambientais como o ar de zonas urbanas, gases de exaustão de automóveis, resíduos de incineração industriais e, mais importante ainda, em águas tratadas para consumo humano (1,2).

Figura 1: Estruturas do BaP, 6-Cl-BaP, Fluo, 3-Cl-Fluo e 1,3-Cl<sub>2</sub>-Fluo.



Os objetivos deste trabalho foram sintetizar e caracterizar os principais derivados clorados do benzo[a]pireno (BaP) e do fluoranteno (Fluo), desenvolver metodologias analíticas para a sua quantificação em amostras de água e analisar os seus efeitos genotóxicos em células humanas.

Os derivados clorados foram preparados utilizando um método inovador que se baseou na utilização de um sistema bifásico de água/n-hexano na presença de hipoclorito de sódio. O derivado 6-cloro-benzo[a]pireno (6-Cl-BaP) foi seletivamente obtido a partir do seu precursor BaP, enquanto que a partir do Fluo se obtiveram dois derivados clorados: 3-cloro-fluoranteno (3-Cl-Fluo) e 1,3-dicloro-fluoranteno (1,3-Cl<sub>2</sub>-Fluo) (Figura 1). A formação dos derivados clorados do BaP e Fluo foi confirmada em soluções aquosas tratadas com o agente da cloração hipoclorito de sódio, utilizando uma metodologia cromatográfica otimizada.

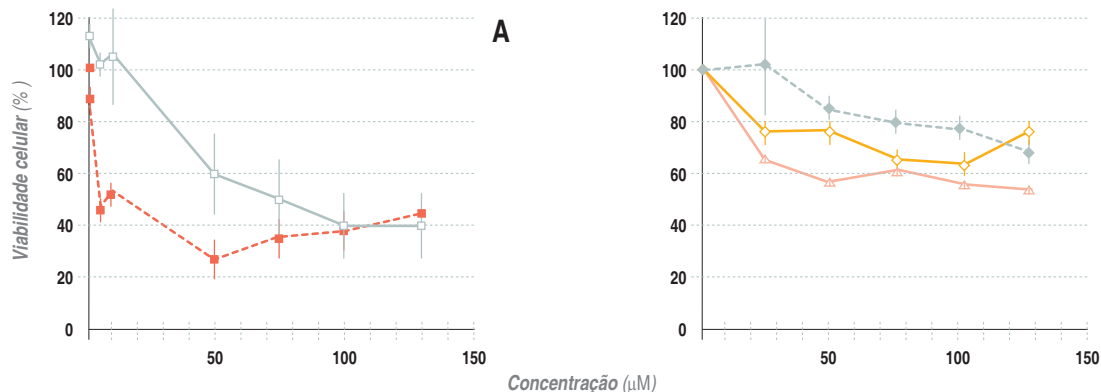
Os efeitos citotóxicos e genotóxicos dos três derivados clorados foram estudados, em comparação com os efeitos dos seus precursores BaP e Fluo, na linha celular humana HepG2, utilizando os ensaios do vermelho neutro e do cometa, respetivamente.

Por comparação dos dados de viabilidade celular, obtidos para as concentrações mais baixas testadas (10 e 50 µM), verificou-se que o BaP é cerca de duas vezes mais citotóxico do que o 6-Cl-BaP. No entanto, a exposição das células a concentrações mais elevadas (100 and 125 µM), resultou numa redução da viabilidade celular (app. 40%) semelhante para os dois compostos (e.g., p = 0,044 e 0,048, para 125 µM de BaP e 6-Cl-BaP, respetivamente). Por outro lado, não se observou qualquer efeito citotóxico do Fluo e dos seus derivados clorados nas condições testadas (Gráfico 1).

Os efeitos genotóxicos dos mesmos compostos e derivados foram analisados através do ensaio do cometa que permite, de uma forma rápida e sensível, quantificar as lesões induzidas na molécula de DNA (Gráfico 2). O 6-Cl-BaP induziu um aumento significativo da percentagem de DNA na cauda, para as concentrações de 100 µM e 125 µM (p = 0,012 e 0,017, respetivamente), por comparação com o controlo do solvente (Gráfico 2A). Os resultados obtidos demonstraram também que, para concentrações equimolares de 100 e 125 µM, o composto 6-Cl-BaP induz um nível significativamente superior de danos no DNA em relação ao BaP (p = 0,041 e 0,038, respetivamente), sugerindo um potencial genotóxico superior. Em contraste, o Fluo e os seus derivados clorados não mostraram atividade genotóxica na mesma linha celular.

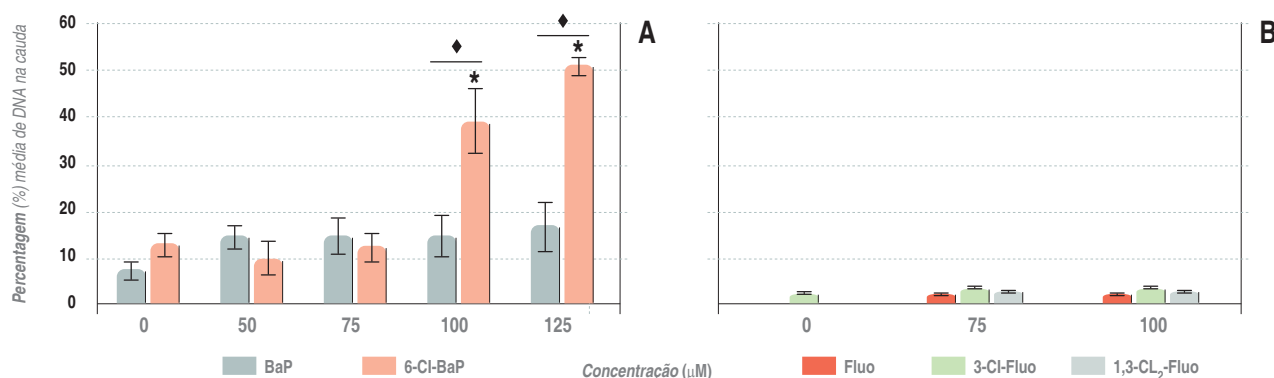
artigos breves\_ n. 10

**Gráfico 1:** Viabilidade das células HepG2, após 24h de exposição a varias concentrações de:  
(A) BaP (■) e 6-Cl-BaP (□); (B) Fluo (◆), 3-Cl-Fluo (◇) e 1,3-Cl<sub>2</sub>-Fluo (△).



Resultados expressos como percentagem média da viabilidade celular ( $\pm$  erro padrão) de 3 experiências independentes.

**Gráfico 2:** Danos no DNA após exposição das células HepG2 a:  
(A) BaP, 6-Cl-BaP, (B) Fluo, 3-Cl-Fluo e 1,3-Cl<sub>2</sub>-Fluo e avaliados pelo ensaio do cometa.



0 M corresponde ao controlo do solvente. Os resultados são expressos como a percentagem média de DNA na cauda ( $\pm$  erro padrão) de 3 experiências independentes.

(\*) Diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o controlo do solvente;

◆ Diferenças estatisticamente significativas entre concentrações equimolares de BaP e de 6-Cl-BaP.

**Em conclusão:**

1) Os resultados obtidos suportam a possível ocorrência de derivados clorados do BaP e do Fluo em águas, após o seu tratamento com desinfetantes clorados;

2) Os derivados 1,3-Cl<sub>2</sub>-Fluo e 3-Cl-Fluo não se mostraram genotóxicos em células HepG2, nas condições testadas. No entanto, verificou-se que o 6-Cl-BaP, em concentrações elevadas, induziu um maior nível de danos no DNA do que o seu precursor BaP, em condições de equitoxicidade. Estes resultados sugerem que o 6-Cl-BaP pode ser um composto ainda mais perigoso que o seu precursor BaP, já classificado, pela IARC, como cancerígeno (3).

A identificação de subprodutos de desinfecção da água formados a partir de HAPs evidencia a necessidade de desenvolvimento e implementação de novos métodos de tratamento de águas mais eficazes e seguros por forma a proteger a saúde humana.

**Referências bibliográficas:**

- (1) Shiraiishi H, Pilkington NH, Otsuki A, et al. Occurrence of chlorinated polynuclear aromatic-hydrocarbons in tap water. *Environ Sci Technol.* 1985;19(7):585-90.
- (2) Ohura T, Sawada K, Amagai T, et al. Discovery of Novel Halogenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Urban Particulate Matters: Occurrence, Photostability, and AhR Activity. *Environ Sci Technol.* 2009 Apr 1;43(7):2269-75.
- (3) Spink DC, Wu SJ, Spink BC, et al. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells [Em linha]: roles of PAH interactions and PAH metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;226(3):213-24. [consult. 14-11-2013]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2423327/>