

Received:
October 5, 2025

Accepted:
October 14, 2025

Published:
October 31, 2025

Assessment of the Genotoxic Potential of 17 β -estradiol in Different Filters Using the Comet Assay

Alice Camilo Duarte¹ , Edipaula Barbosa Franco² , Fernanda Junger Schaper³ ,
Sthefany Burmann Soares⁴ , Jairo Lisboa Rodrigues⁵ , Márcia Cristina da Silva
Faria⁶ 

¹ Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Teófilo Otoni, Brasil.

Email address

alice.duarte@ufvjm.edu.br (Alice C. Duarte) – Corresponding author.

edipaula.franco@ufvjm.edu.br (Edipaula B. Franco)

fernanda.schaper@ufvjm.edu.br (Fernanda J. Schaper)

sthefany.burmann@ufvjm.edu.br (Sthefany B. Soares)

jairo.rodrigues@ufvjm.edu.br (Jairo L. Rodrigues)

marcia.faria@ufvjm.edu.br (Márcia C.S. Faria)

Abstract

This study assessed the genotoxicity of different filtering materials in remediating the hormone 17 β -estradiol (E2), an emerging contaminant with genotoxic potential. The comet assay was performed using *Allium cepa* root cells to evaluate DNA damage after filtration. Filters containing banana biomass, *Pleurotus ostreatus* biomass, δ -FeOOH, and a combination of the three were tested. All treatments were efficient in reducing E2-induced DNA damage, with δ -FeOOH showing the highest remediation performance, presenting the lowest DNA Damage Index and Damage Frequency. The ImageJ software was used for the analysis of images obtained by epifluorescence microscopy, being essential for accurate measurement of DNA migration. The findings highlight the potential of natural, low-cost materials in the treatment of estrogen-contaminated effluents, supporting the development of sustainable environmental technologies.

Keywords: 17 β -estradiol, Genotoxicity, *Allium cepa*, Biomass, Comet assay.

1. Introdução

É inegável que a intensificação da urbanização, industrialização e práticas agrícolas têm imposto forte pressão sobre os recursos hídricos globais. Essas atividades resultam na liberação de compostos nocivos, os contaminantes emergentes (CEs), que, por não serem amplamente monitorados ou regulamentados, representam riscos potenciais à saúde humana e ao ambiente. Estudos como Geissen et al. (2015) ressaltam esse desafio global derivado de múltiplas fontes antrópicas (domésticas, agrícolas e industriais). No contexto brasileiro, Montagner, Vidal e Acayaba (2017) apontam lacunas no monitoramento e manejo dos CEs. Um dossiê organizado pela FAPESP (2025) também enfatiza os riscos contínuos e não regulados

de pesticidas, produtos farmacêuticos, cosméticos e outros CEs nos países em desenvolvimento.

Entre os contaminantes emergentes (CEs), os hormônios estrogênicos têm gerado grande preocupação devido aos seus efeitos como desreguladores endócrinos. Dentre eles, o hormônio natural 17 β -estradiol (E2), destaca-se por ser um dos estrogênios mais potentes detectados no ambiente. Segundo Nazari et. al. (2020), o E2 exerce forte atividade estrogênica mesmo em baixas concentrações e é persistentemente encontrado em águas superficiais e efluentes, além de resistir aos processos convencionais de tratamento.

No cenário atual do Brasil, apesar da crescente conscientização acerca dos impactos ambientais e à saúde pública relacionados a contaminantes emergentes, ainda persistem lacunas regulatórias significativas. As agências

responsáveis, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA), têm adotado algumas medidas para monitorar a qualidade da água e limitar a presença de substâncias tóxicas. Entretanto, a Resolução CONAMA nº 357/2005, que estabelece normas para o lançamento de efluentes em corpos d'água, não contempla regulamentação específica para contaminantes emergentes, como o E2, configurando um desafio para a gestão sustentável dos recursos hídricos no país (Brasil, 2005).

Em outros contextos, como nos Estados Unidos, a Environmental Protection Agency (EPA) tem adotado uma postura mais rigorosa no monitoramento e controle desses contaminantes. Contudo, a EPA também enfrenta limitações na regulamentação de contaminantes emergentes, dada a complexidade técnica e a diversidade desses compostos (EPA, 2021). Além disso, a ausência de critérios claros sobre a presença e os limites desses compostos nos corpos d'água torna difícil a implementação de soluções eficazes.

Convém apontar que entre os impactos ambientais em questão, estudos indicam que o E2 pode promover a feminização de peixes machos, alterar a proporção sexual das populações e induzir a produção de vitelogenina (proteína precursora da gema do ovo) em indivíduos machos, além de causar redução da fertilidade e prejuízos na produção de gametas. Essas alterações foram observadas em populações de peixes *Rutilus rutilus* expostas a efluentes tratados contendo contaminantes endócrinos, evidenciando os efeitos adversos dos hormônios estrogênicos no ambiente aquático (Jobling et al., 2002).

Tais efeitos comprometem a biodiversidade aquática e a estabilidade ecológica. Conforme discutido por Aus der Beek et al. (2016), os principais responsáveis pela presença do E2 nos corpos d'água são os efluentes provenientes do esgoto doméstico, hospitalar e industrial. Por certo, muitos desses compostos apresentam alta solubilidade e resistência à biodegradação, permitindo sua permanência nos efluentes tratados e, conseqüentemente, no meio ambiente (Crini e Badot, 2008). Nesse sentido, os contaminantes endócrino-disruptores (CEDs), incluindo o E2, são frequentemente detectados em águas superficiais e efluentes de estações de tratamento de águas residuais, visto que os métodos convencionais de

tratamento apresentam eficácia limitada na remoção desses compostos (Komesli et al., 2015).

Assim, é evidente que a persistência desses compostos pode representar uma ameaça significativa à saúde pública e ao meio ambiente, o que exige a busca por novas alternativas de remediação. Então, remover o E2 de forma eficaz é um desafio importante, e além da detecção química, torna-se essencial avaliar seus efeitos biológicos. À vista disso, a genotoxicidade, ou seja, a capacidade de uma substância de causar danos ao DNA, é um indicador-chave na avaliação de risco, já que alterações genéticas podem levar a mutações, câncer e problemas reprodutivos.

É indubitável que o estudo da genotoxicidade é fundamental na toxicologia ambiental, pois organismos aquáticos frequentemente são expostos a misturas complexas de poluentes. Segundo (Dourado et al., 2017), a avaliação precoce de danos ao DNA por agentes genotóxicos é um biomarcador fundamental para identificar possíveis riscos ambientais e prever consequências adversas a longo prazo para os ecossistemas. Frente a esse panorama, diversos materiais vêm sendo estudados como alternativas para a remoção do E2. Entre eles, o presente estudo destaca a biomassa de banana, o fungo *Pleurotus ostreatus* e o óxido de ferro δ -FeOOH.

Nesse raciocínio, o ensaio cometa, também chamado de eletroforese em gel de célula única, surge como uma ferramenta eficaz e sensível para detectar danos no DNA. Estudos mostram que o E2 pode gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), provocando lesões no material genético e alterações celulares (Cemeli & Anderson, 2011). Sendo assim, o ensaio permite avaliar com precisão o impacto genotóxico de substâncias químicas e verificar a eficácia dos tratamentos propostos.

Ademais, sabe-se que o modelo vegetal *Allium cepa* (cebola) é amplamente utilizado em estudos de genotoxicidade por apresentar respostas claras e rápidas a agentes tóxicos e seu uso é vantajoso por ser econômico, ético e ecologicamente relevante (Costea et. al., 2024). Assim, o ensaio cometa com o uso do *Allium cepa* permite investigar de forma abrangente a eficácia de tratamentos na redução da genotoxicidade induzida pelo E2.

2. Revisão de literatura

2.1. 17 β -estradiol

O E2 é o principal hormônio estrogênico natural produzido principalmente pelos ovários em mulheres, embora também seja sintetizado em pequenas quantidades nos testículos e nas glândulas adrenais em homens. Ele desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e na regulação do sistema reprodutor, influenciando o ciclo menstrual, a maturação folicular, a manutenção dos tecidos reprodutivos e o desenvolvimento das características sexuais secundárias (Rachid, 2021).

Apesar de ser um composto natural, o E2 pode se tornar um contaminante ambiental quando liberado em corpos d'água através de fontes como esgotos domésticos, efluentes industriais e agropecuários (Ternes, 1998). Além disso, efluentes hospitalares e farmacêuticos podem conter resíduos hormonais que, se não tratados adequadamente, liberam E2 e outros compostos estrogênicos no ambiente (Teixeira, 2018).

A problemática recai também sobre o fato de que a eficácia dos sistemas convencionais de tratamento biológico é limitada e fortemente influenciada por condições operacionais, de maneira que estudos demonstram que uma mudança de parâmetros de operação pode melhorar significativamente a remoção de compostos como o E2 (Mensah et al., 2023). Ou seja, a presença contínua de E2 no meio ambiente representa um problema urgente, exigindo o aprimoramento de tecnologias de tratamento e estratégias de mitigação.

Como Ternes (1998) destaca, devido à sua estabilidade química e persistência no ambiente, o E2 pode acumular-se nos ecossistemas aquáticos, interferindo na reprodução e no desenvolvimento de peixes e outros organismos, além de afetar a biodiversidade local. Sua presença nos efluentes é preocupante devido ao seu potencial de atuar como disruptor endócrino, causando efeitos adversos em organismos aquáticos e possivelmente em seres humanos (Jobling et al., 1998). Por isso, compreender sua natureza e impacto é fundamental para o desenvolvimento de métodos eficazes de remediação.

Nos ecossistemas aquáticos, o E2 tem sido identificado como um importante disruptor endócrino, capaz de interferir nos processos hormonais e reprodutivos de diferentes grupos de

organismos, incluindo peixes, anfíbios e invertebrados. Estudos apontam que sua presença pode desencadear alterações no desenvolvimento sexual, comprometimento da fertilidade e modificações comportamentais, como a feminização de machos e a masculinização de fêmeas, efeitos que estão associados à exposição crônica a esse composto (Jobling et al., 1998).

Já no que tange à saúde humana, a exposição prolongada a níveis elevados de E2 por meio da água contaminada pode representar riscos significativos. De acordo com Herrmann et al., (2023), mesmo em concentrações baixas, pode levar a alterações na taxa de espermatozoides, irregularidades no ciclo menstrual, infertilidade e desenvolvimento de doenças como endometriose e cânceres endometrial, testicular, de próstata e mama.

2.2. Remediação ambiental

A remediação contribui para a sustentabilidade ambiental e para o cumprimento de legislações ambientais que visam preservar os recursos hídricos, então as tecnologias de tratamento convencionais e avançadas são cruciais para a remoção de fármacos como o E2 (Verlicchi; Al aukidy; Zambello, 2012). Dessa forma, desenvolver e aplicar métodos eficientes para a remoção do E2 e outros contaminantes hormonais é essencial para garantir a qualidade da água, proteger os organismos aquáticos e prevenir potenciais efeitos tóxicos. Diante disso, diversas técnicas de remediação têm sido desenvolvidas para minimizar seus efeitos. Entre elas, o uso de filtros baseados em materiais naturais e sintéticos ganha destaque por sua eficiência, alto custo-benefício e menor impacto ambiental.

Os filtros atuam por meio de processos como adsorção, biodegradação e precipitação, permitindo a remoção ou transformação dos contaminantes presentes em águas e efluentes.

Nesta pesquisa, o foco está na avaliação de filtros que utilizam biomassa de banana, biomassa do fungo *Pleurotus* e δ -FeOOH, que representam alternativas promissoras para a remediação de hormônios estrogênicos. Além disso, combinações desses filtros foram testadas para otimizar o processo de remoção do E2 e reduzir a genotoxicidade das amostras tratadas. Cada material apresenta características específicas que contribuem para a eficácia do tratamento:

- Biomassa de Banana: Obtida de resíduos, atua por adsorção devido à sua composição rica em fibras e compostos orgânicos (Farias, 2023).
- Biomassa de *Pleurotus*: Proveniente de um fungo, degrada poluentes orgânicos através de processos enzimáticos (Křesinová et al., 2012).
- δ -FeOOH (óxido de ferro hidratado): Material inorgânico com alta área superficial, eficaz na remoção por adsorção e reações de oxidação (Mpupa et al., 2020).

2.3. Ensaio Cometa e suas Aplicações na Análise de Genotoxicidade

O ensaio cometa, também conhecido como ensaio de eletroforese em gel de células individuais, é uma técnica laboratorial utilizada para detectar danos no DNA em células individuais. Essa metodologia permite avaliar a extensão de quebras nas fitas de DNA causadas por agentes genotóxicos, como contaminantes ambientais, radiações e substâncias químicas (Cemeli & Anderson, 2011). No procedimento, as células são incorporadas em um gel de agarose e submetidas a uma corrente elétrica. Células com DNA intacto permanecem agrupadas, formando uma “cabeça” no gel, enquanto aquelas com DNA danificado apresentam fragmentos que migram, formando uma “cauda” semelhante à de um cometa, cuja intensidade indica o grau de dano genético.

Na área de remediação ambiental, o ensaio cometa é amplamente utilizado por sua sensibilidade, rapidez e capacidade de detectar danos genéticos em diferentes tipos celulares, sendo uma ferramenta importante na avaliação da genotoxicidade de efluentes e substâncias químicas, incluindo a análise da eficiência de tratamentos para a remoção de contaminantes como o E2 (Yildiz et al., 2009). Sua aptidão para detectar quebras no DNA permite identificar os efeitos causados por substâncias tóxicas, mesmo em baixas concentrações, algo que é fundamental para estudos de impacto ambiental e toxicologia (Yildiz et al., 2009). Ao comparar células expostas a amostras tratadas e não tratadas, é possível verificar se o método utilizado diminuiu efetivamente os danos genéticos causados pelo contaminante.

Além disso, o fato de que o ensaio cometa pode ser aplicado em diferentes tipos celulares proporciona uma avaliação abrangente dos riscos ambientais e auxilia no desenvolvimento de tecnologias mais eficientes para a descontaminação de corpos d’água. Este ensaio tem sido amplamente aplicado na toxicologia ambiental como ferramenta de triagem para avaliar o impacto de poluentes, inclusive hormônios estrogênicos, em organismos modelo como *Allium cepa* (Alias et al., 2023; Costea et al., 2024).

3. Metodologia

O trabalho em questão foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Contaminantes do Instituto de Ciência, Engenharia e Tecnologia (ICET) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM).

3.1. Grupo de amostras

Além da amostra tratada com o hormônio em estudo, para garantir a validade dos resultados, foram utilizados controles negativos e positivos.

3.1.1 Grupo de amostras 1: Pré-filtração

- Controle negativo (CN): Água ultrapura;
- Controle positivo (CP): Metanossulfonato de metila (MMS) 4×10^{-4} M;
- E2 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dissolvido em DMSO.

Tabela 1 – Amostras pré-filtração utilizadas no ensaio cometa.

Nº	Amostra
9	C+ (MMS)
10	C- (Água Milli-Q)
11	E2

3.1.2 Grupo de amostras 2: Pós-filtração

3.1.3 Grupo de amostras 2: Pós-filtração

- E2 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dissolvido em DMSO e filtrado;
- Controle negativo (CN): Água ultrapura.

Tabela 2 – Amostras pós-filtração utilizadas no ensaio cometa.

Nº	Amostra	Filtro
1	E2	Biomassa Banana
2	E2	Biomassa <i>Pleurotus</i>
3	E2	δ -FeOOH
4	E2	Biomassa <i>Pleurotus</i> + δ -FeOOH + Biomassa Banana
5	C ⁻ (Água Milli-Q)	Biomassa Banana
6	C ⁻ (Água Milli-Q)	Biomassa <i>Pleurotus</i>
7	C ⁻ (Água Milli-Q)	δ -FeOOH
8	C ⁻ (Água Milli-Q)	Biomassa <i>Pleurotus</i> + δ -FeOOH + Biomassa Banana

3.2. Preparação e montagem dos Filtros

Para o processo de remediação proposto pelo estudo, foram montados diferentes filtros utilizando os seguintes materiais e quantidades:

- Lã de vidro: 0,7 g;
- Biomassa de banana: 0,88 g;
- Biomassa de *Pleurotus ostreatus*: 0,3 g;
- Nanomaterial δ -FeOOH: 0,88 g.

Para montagem dos filtros foram utilizadas seringas hipodérmicas estéreis de 20 mL sem agulha, cada um com uma camada do material em questão (biomassa de banana, biomassa de *Pleurotus* ou δ -FeOOH), papel filtro de 0,45 μ m cortado no diâmetro da seringa, e lã de vidro alocada entre os adsorventes, como exemplificado na Figura (1). Além disso, foi preparado um filtro combinado, contendo *Pleurotus* + δ -FeOOH + biomassa de banana, para avaliar a sinergia entre os materiais. Dessa maneira, esse filtro apresentou 8 camadas, conforme ilustrado na Figura (2).

Cabe ressaltar que neste estudo não houve a necessidade da preparação das biomassas da casca de banana e do fungo *Pleurotus ostreatus*, tampouco o composto δ -FeOOH, visto que todos esses materiais já se encontravam disponíveis no laboratório. Os materiais haviam sido previamente preparados ou sintetizados em trabalhos anteriores e foram devidamente armazenados sob condições controladas, garantindo a preservação de suas características físico-químicas.

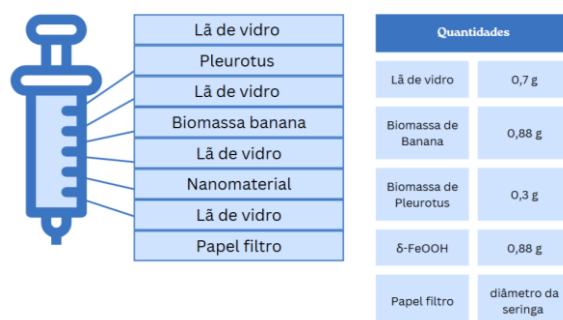
Figura 1 – Filtros de biomassa de banana e biomassa de *Pleurotus*

Figura 2 – Esquema da montagem do filtro.

3.3. Preparação da Solução Contaminante

A solução contendo o hormônio foi preparada na concentração de 200 μ g/mL, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) para a dissolução inicial e posterior diluição em água ultrapura e armazenada em temperatura controlada até o uso.

3.4. Teste do Cometa

3.4.1 Germinação das Sementes e Preparação das Raízes

Inicialmente, as sementes de *Allium cepa* foram submetidas à germinação em placas de Petri estéreis, previamente preparadas com papel filtro autoclavado e 3 mL de água destilada. Cerca de 30 a 50 sementes foram dispostas em cada placa e vedadas com filme de parafilme. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica, em ambiente escuro, a uma temperatura constante de 25 °C por aproximadamente cinco dias, tempo necessário para que as raízes atingissem o comprimento ideal de 1 a 1,5 cm.

3.4.2 Tratamento das Amostras

Os tratamentos com o E2 foram realizados por meio da adição de 2 mL de solução contendo o

hormônio já previamente filtrado por um dos materiais testados. As raízes permaneceram em contato com os tratamentos por um período de 24 horas sob as mesmas condições de crescimento. Essa etapa permitiu avaliar a eficiência dos filtros na redução da toxicidade do hormônio.

3.4.3 Pré Preparo das Lâminas

Paralelamente ao tratamento, foram preparadas as lâminas para o ensaio. Lâminas de microscopia (lapidadas com faixa fosca) foram lavadas em solução de Extran 10% por uma hora, enxaguadas com água destilada e secas em estufa. Posteriormente, foram mergulhadas em agarose NMP (Normal Melting Point) a 1,5%, preparada em água destilada, de forma a cobrir uniformemente a superfície da face fosca. Após a aplicação, o excesso de agarose foi removido cuidadosamente com papel toalha, e as lâminas foram deixadas para secar em temperatura ambiente por 24 horas, com a face recoberta voltada para cima. Esse procedimento tem como objetivo proporcionar uma camada basal firme, necessária para a ancoragem do gel contendo os núcleos durante a eletroforese.

3.4.4 Isolamento dos Núcleos

No dia seguinte ao tratamento, foram coletadas cerca de 20 raízes por lâmina. As extremidades apicais (1 cm) foram cortadas em uma tampa de placa de Petri disposta sobre gelo. As pontas foram imersas em ácido láctico 85% por 1 minuto, seguido de duas lavagens com PBS 1X. Após a secagem em papel filtro, as raízes foram transferidas para microtubos de 2 mL contendo 200 μ L de PBS 1X, onde foram fragmentadas com auxílio de lâmina de bisturi estéril por aproximadamente 2 minutos, a fim de liberar os núcleos das células meristemáticas.

O material celular obtido foi transferido para um novo microtubo, evitando a presença de fragmentos grosseiros de tecidos. Os tubos com as suspensões nucleares foram mantidos resfriados até o preparo final das lâminas.

3.4.5 Preparo das Lâminas

Agarose LMP (Low Melting Point) a 1% foi preparada com PBS 1X. A suspensão contendo os núcleos foi misturada a essa agarose morna, na proporção de 1:1 (200 μ L de cada). A mistura foi rapidamente homogeneizada e depositada sobre as

lâminas já preparadas, recoberta por lamínulas de vidro. As lâminas foram imediatamente resfriadas por 20 minutos em geladeira, a fim de solidificar a segunda camada. Esse procedimento foi realizado individualmente para cada lâmina, uma vez que a agarose LMP começa a solidificar rapidamente.

3.4.6 Eletroforese

Após a solidificação da segunda camada, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas foram incubadas por 20 minutos em tampão alcalino, previamente resfriado, permitindo o desenovelamento do DNA e a expressão de quebras de fita simples e duplas.

Em seguida, foi realizada a eletroforese horizontal sob corrente constante de 25 V por 10 minutos. Durante o processo, a cuba foi mantida sob resfriamento com gelo, a fim de evitar degradação térmica do DNA. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em tampão Tris-HCl 0,4 M (pH 7,5). A fixação foi feita com metanol gelado por cinco minutos, e as lâminas foram deixadas secar à temperatura ambiente e colocadas na geladeira após 24h.

3.5. Coloração e Análise Microscópica

A coloração das lâminas foi realizada com brometo de etídio (EtBr) a 20 μ g/mL, sendo aplicada uma alíquota de 100 μ L sobre cada lâmina, com tempo de incubação de cinco minutos. Em seguida as lâminas foram recobertas com lamínulas e imediatamente analisadas sob microscópio de epifluorescência com filtro UV, sendo os núcleos observados em coloração laranja fluorescente. As imagens foram capturadas com câmera acoplada ao microscópio e armazenadas para análise posterior.

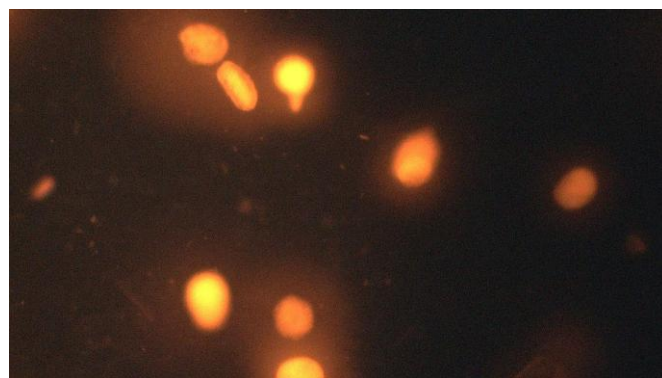


Figura 3 – Imagem capturada da amostra de controle positivo.

3.5.1 Análise de Imagens com o Software ImageJ

A quantificação do dano genético foi realizada com o auxílio do software ImageJ para obtenção das medidas da extensão da "cauda" do cometa, indicador da fragmentação do DNA. O ImageJ é uma ferramenta gratuita de análise de imagens muito utilizada em diversas áreas, como biologia, medicina e engenharia, o que o torna ideal para a quantificação de dados provenientes do ensaio cometa.

Para quantificar parâmetros no ensaio cometa, como o comprimento da cauda, foi necessário desenvolver a padronização do procedimento, para medir distâncias em pixels e, posteriormente, calibrar essa medida para unidades reais, conforme recomendado pelo protocolo descrito por Brianezi, Camargo e Miot (2009). Dessa maneira, foi desenvolvido o seguinte passo a passo para a medição e calibração da escala:

1. Medir distâncias em pixels: Selecione a ferramenta "*Line Tool*" (ícone de linha reta na barra de ferramentas). Clique no ponto inicial e arraste até o ponto final do objeto que deseja medir. Vá em "*Analyze*" → "*Measure*" (ou pressione Ctrl + M). A medição será exibida em uma nova janela chamada *Results*, mostrando a distância em pixels.
2. Calibrar a escala (conversão de pixels para unidade real): Se quiser converter de pixels para uma unidade real, como micrômetro (μm), vá em "*Analyze*" → "*Set Scale...*". Insira a distância em pixels (*distance in pixels*), a distância real correspondente (*known distance*) e a unidade desejada (*unit of length*). Por exemplo, 6.29 pixels podem ser equivalentes a 1 μm . Todas as medições seguiram essa escala.

3.6. Quantificação do Dano ao DNA

O dano foi classificado em níveis de 0 a 4 conforme a porcentagem de DNA migrado, permitindo comparar os tratamentos com e sem filtros.

4. Resultados e Discussão

Inicialmente, é importante ressaltar que os resultados obtidos por meio do ensaio cometa demonstraram variações expressivas no índice de dano genético (ID) entre as amostras filtradas com diferentes materiais, as quais foram quantificadas em micrômetros (μm) e classificadas segundo a

escala de dano genético de 0 a 4, conforme os intervalos definidos na Tabela (3). A atribuição dos scores foi realizada com base na distância média de migração do DNA medida nas imagens dos cometas (cauda nuclear) baseado em Santana (2015) e adaptado para esta pesquisa. Os intervalos foram definidos a partir da faixa de variação observada experimentalmente, como pode ser visto na Tabela (3).

Tabela 3 – Intervalos para definição dos scores.

Nível de Dano Genético	Intervalo (μm)
0	0 a 5,994
1	5,995 a 11,989
2	11,990 a 17,984
3	17,985 a 23,979
4	23,980 a 29,970

Essa classificação permitiu a padronização da leitura dos dados de forma objetiva e facilitou a comparação entre os tratamentos. Desse modo, as análises foram feitas a partir da contagem de 100 núcleos por lâmina, em triplicata, totalizando 300 núcleos por grupo experimental. Para cada célula analisada, foi atribuído um score de dano conforme sua cauda, e o Índice de Dano Genético (ID) foi calculado conforme a fórmula adaptada de Santana (2015):

$$ID = \Sigma(n.s)$$

Em que:

- n = número de células em cada classe de dano (0 a 4);
- s = score correspondente ao nível de dano.

Além do índice, foi calculada também a Frequência de Dano Genético (FD), expressa como a porcentagem de células que apresentaram algum nível de dano (ou seja, com score de 1 a 4), conforme a fórmula:

$$FD = [(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) \times 100] / N^{\circ} \text{ total}$$

Em que:

- n_1, n_2, n_3 e n_4 = número de células com score 1, 2, 3 e 4, respectivamente;
- $N^{\circ} \text{ total}$ = total de células analisadas.

Com base neste cenário, as análises da eficácia de cada filtro estudado se deram avaliando quais apresentaram maior incidência do menor nível de dano genético. Essa relação pode ser observada nos gráficos das Figuras (4) a (7).

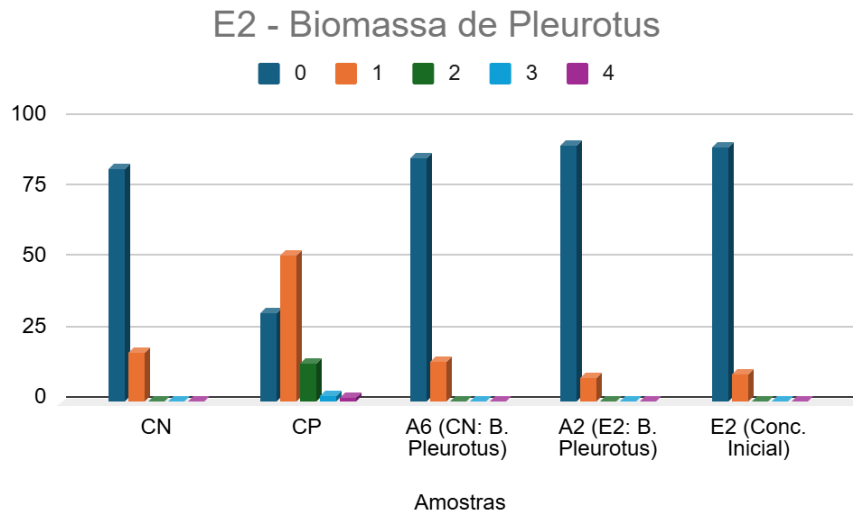


Figura 4 – Biomassa de *Pleurotus*.

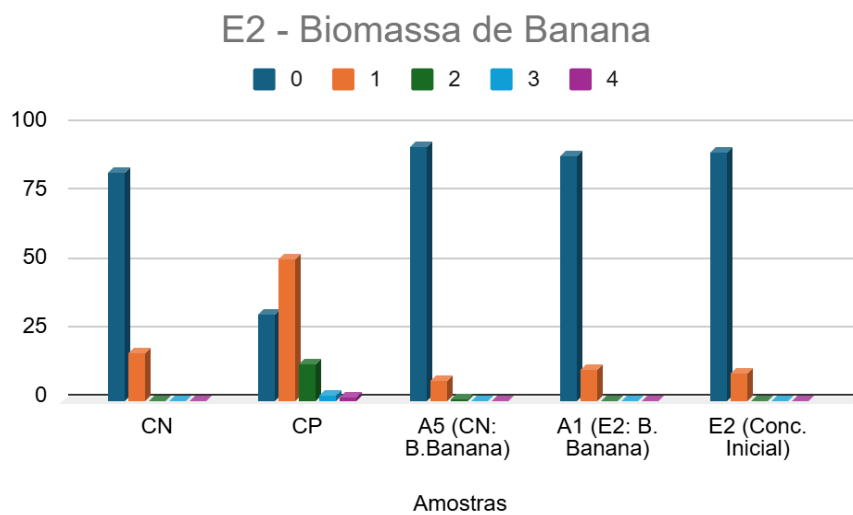


Figura 5 – Biomassa de Banana.

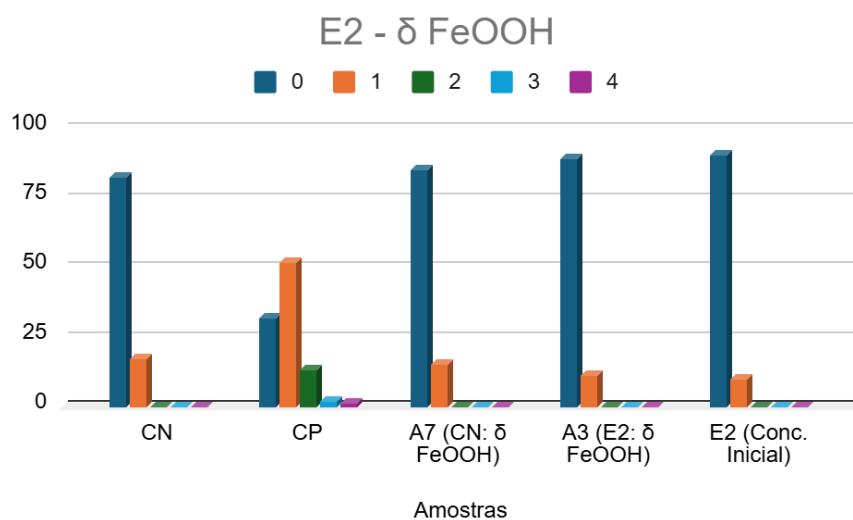


Figura 6 – δ -FeOOH.

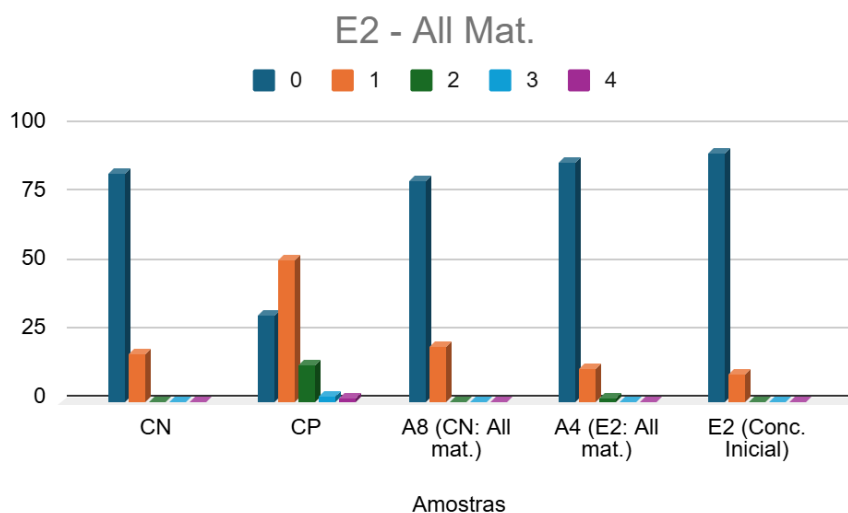


Figura 7 – All mat.

Os resultados mostraram diferenças substanciais entre os filtros testados, com destaque para os tratamentos com δ -FeOOH, biomassa de Pleurotus e biomassa de banana (figuras 4, 5, 6 e 7). Percebe-se que as amostras que passaram por esses filtros apresentaram os menores índices médios de dano genético, indicando maior eficiência na atenuação da genotoxicidade do E2.

As Tabelas (4) e (5) apresentam a distribuição percentual dos núcleos por classe de dano genético (níveis de 0 a 4), além do Índice de Dano Genético (ID) e da Frequência de Dano Genético (FD%) correspondentes a cada tratamento. Observa-se a comparação entre os índices de dano genético obtidos para cada tratamento, de maneira que fica evidente a eficácia diferencial entre os materiais utilizados nos filtros.

Tabela 4 – Índice e frequência de dano genético em CP, CN e E2.

Grupo Controle	Nível de dano genético					Índice e Frequência de Dano Genético	
	0	1	2	3	4	ID	FD(%)
CN	68,70	26,67	0,00	0,00	0,00	27,67 $\pm$ 9,06	26,67
CP	24,00	50,00	20,67	4,00	1,33	108,67 $\pm$ 18,70	68,33
E2	91,67	8,33	0,00	0,00	0,00	3,80 $\pm$ 1,76	8,33

Tabela 5 – Grupo de amostras após a filtração.

Grupo Controle	Nível de dano genético					Índice e Frequência de Dano Genético	
	0	1	2	3	4	ID	FD(%)
CN BB	92,33	7,00	0,67	0,00	0,00	8,33 $\pm$ 7,33	7,67
CN BP	86,00	14,00	0,00	0,00	0,00	14,00 $\pm$ 6,50	14,00
CN δ	85,00	15,00	0,00	0,00	0,00	15,00 $\pm$ 5,86	15,00
CN nCr	80,00	20,00	0,00	0,00	0,00	20,00 $\pm$ 8,00	20,00
E2 BB	89,00	11,00	0,00	0,00	0,00	11,00 $\pm$ 10,02	11,00
E2 BP	91,00	8,66	0,33	0,00	0,00	9,67 $\pm$ 4,41	9,00
E2 δ	89,00	11,00	0,00	0,00	0,00	9,33 $\pm$ 4,33	11,00
E2 nCr	87,00	11,67	1,00	0,00	0,00	15,00 $\pm$ 3,61	13,00

Onde,

- BB = Biomassa de banana;
- BP = Biomassa de *Pleurotus*;
- δ = δ -FEOOH;
- nCr = Combinação de Biomassa de banana, Biomassa de *Pleurotus* e δ -FEOOH.

Dentre os filtros avaliados, percebe-se que o filtro composto por δ -FeOOH apresentou o menor índice de dano genético e uma das menores frequências de dano, indicando elevada eficácia na remediação do E2. O nanomaterial pode atuar como bioissorvente, removendo compostos tóxicos por mecanismos como adsorção, complexação e troca iônica. Em seguida, destaca-se o filtro composto por biomassa de *Pleurotus ostreatus*. Este resultado positivo corrobora achados de Křesinová et al. (2012), que destacam a capacidade deste fungo em degradar compostos estrogênicos por meio da ação de lacases e peroxidases, enzimas envolvidas na quebra de estruturas aromáticas complexas.

Constata-se que o filtro composto por biomassa de banana também demonstra potencial relevante na redução do dano genético causado pelo hormônio, resultados que concordam com dados da literatura que apontam a presença de grupos funcionais ativos na estrutura da biomassa de banana (como hidroxilas, carboxilas e fenóis), os quais favorecem a interação com compostos orgânicos polares, como o E2, por mecanismos de adsorção física e química.

O filtro combinado, composto por todos os materiais (BB, BP e δ), apresentou um resultado melhor que o controle positivo, porém inferior aos filtros aplicados isoladamente. Esse desempenho sugere que a combinação dos materiais não resultou em sinergia positiva, de modo que interações físico-químicas desfavoráveis entre os componentes podem ter reduzido a eficiência do sistema, indicando que o uso conjunto de biomateriais nem sempre maximiza a remoção de contaminantes.

As amostras de controle negativo, tratadas com água ultrapura e submetidas aos diferentes filtros, apresentaram índices de dano geneticamente baixos, com ID variando entre 8,33 e 20,00, e FD% entre 7,67 e 20,00. No entanto, destaca-se que a de CN nCr apresentou o maior ID entre os controles (ID = 20,00), o que pode indicar contaminação residual dos materiais filtrantes ou variações experimentais, como diferença na exposição ou resposta biológica dos organismos.

O controle positivo, tratado com MMS, apresentou um ID elevado de 89,65 e FD% = 68,33, confirmando a genotoxicidade da substância e validando a sensibilidade do ensaio cometa aplicado. Este resultado serve como parâmetro de comparação para verificar a eficácia dos materiais testados na redução do dano genético, demonstrando que mesmo os valores mais elevados ainda apresentam baixa genotoxicidade quando comparados ao controle.

Assim, repara-se que as amostras-controle, tanto positivas quanto negativas, validaram o protocolo experimental. O controle positivo apresentou ID e FD% elevados, confirmando a genotoxicidade induzida. Já os controles negativos, mesmo após passarem pelos diferentes filtros, mantiveram níveis baixos de dano genético, indicando que os materiais testados não apresentaram toxicidade residual significativa quando não em contato com o E2.

Por fim, destaca-se também que a utilização do software ImageJ foi essencial para a padronização e precisão das análises. A conversão dos dados de microscopia em valores quantitativos, aliada à aplicação de uma escala calibrada em micrômetros, conforme descrito por Brianezi, Camargo e Miot (2009, p. 326), assegurou confiabilidade na quantificação dos danos ao DNA e eliminou subjetividades comumente associadas à avaliação visual direta.

5. Considerações Finais

Os resultados obtidos no ensaio cometa aplicado ao modelo vegetal *Allium cepa*, demonstraram que o uso de materiais naturais como filtros alternativos é uma estratégia promissora para a remediação de contaminantes hormonais emergentes, como o E2. Esse hormônio, amplamente encontrado em efluentes urbanos e industriais, representa uma ameaça significativa à saúde ambiental e pública devido à sua ação como desregulador endócrino e agente genotóxico.

Notou-se que todos os materiais filtrantes foram eficientes para a remoção do E2, de maneira que o desempenho positivo dos compostos está associado à presença de propriedades inerentes a cada substância testada para a remoção do hormônio. A formulação combinada (nCr), composta pela junção dos três materiais filtrantes, apresentou desempenho inferior ao esperado, com índice de dano genético maior do que os filtros

isolados, mas ainda capaz de reduzir a genotoxicidade. Essa observação reforça a necessidade de estudos adicionais para otimizar proporções e configurações em formulações múltiplas.

Outro aspecto relevante foi a aplicação do software ImageJ para análise das imagens obtidas por microscopia de epifluorescência. A digitalização dos dados, com calibração das medições em micrômetros e quantificação do comprimento das caudas dos cometas, conferiu rígido controle metodológico, alta reprodutibilidade e eliminação de subjetividades na classificação dos danos genéticos.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que os materiais testados configuram uma alternativa para remediação altamente eficiente, econômico, renovável e amplamente disponível, sendo viável para o tratamento de efluentes contaminados com hormônios estrogênicos.

Outrossim, o ensaio cometa demonstrou-se uma ferramenta eficaz e sensível para a avaliação da genotoxicidade residual após os tratamentos. Estudos futuros poderão aprofundar a investigação dos mecanismos de atuação de cada material filtrante, bem como sua aplicabilidade em larga escala no tratamento de águas residuais e efluentes contaminados. Por fim, conclui-se que a abordagem metodológica empregada, que associa o uso do ensaio cometa com a análise digital, pode ser replicada para avaliação de outras tecnologias de tratamento, oferecendo uma visão integrada dos impactos residuais sobre organismos-modelo.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa científica, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Referências

- Alias, C., Zerbini, I. and Feretti, D., 2023. A scoping review of recent advances in the application of comet assay to *Allium cepa* roots. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 64(5), pp.264-281. Available at: <https://doi.org/10.1002/em.22553>
- Aus Der Beek, T., Weber, F.-A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., 2016. Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), pp.823-835. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
- Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), 2005. *Resolução nº 357, de 17 de março de 2005*. Diário Oficial da União, Brasília. Available at: https://www.saude.mg.gov.br/index.php?option=com_gmg&controller=document&id=13282-resolucao-conama-n-357-de-17-de-marco-de-2005 [Accessed 19 Aug. 2025].
- Brianezi, G., Camargo, J.L.V. and Miot, H.A., 2009. *Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 45(4), pp.325-334. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442009000400010>.
- Cemeli, E. and Anderson, D., 2011. *Mechanistic investigation of ROS-induced DNA damage by oestrogenic compounds in lymphocytes and sperm using the comet assay*. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), pp.2783-2796. <https://doi.org/10.3390/ijms12052783>.
- Costea, M.A., Rosan, C.A., Laslo, V., Agud, E., Purcarea, C., Vicas, S.L., 2024. *The comet assay as a sustainable method for evaluating the genotoxicity caused by the soluble fraction derived from sewage sludge on diverse cell types, including lymphocytes, coelomocytes and Allium cepa L. cells*. *Sustainability*, 16(1), p.457. <https://doi.org/10.3390/su16010457>
- Crini, G., and Badot, P.M., 2008. *Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature*. *Progress in Polymer Science*, 33(4), pp.399-447. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.11.001>
- Dourado, P.L.R., Rocha, M.P., Roveda, L.M., Raposo Junior, J.L., Cândido, L.S., Cardoso, C.A.L., Morales, M.A.M., Oliveira, K.M.P. and Grisolia, A.B., 2017. *Genotoxic and mutagenic effects of polluted surface water in the midwestern region of Brazil using animal and plant bioassays*.

- Genetics and Molecular Biology, 40(1), pp.123-133. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0223>
- EPA – United States Environmental Protection Agency, 2021. *Unregulated Contaminant Monitoring Rule (UCMR)*. Washington, DC. Available at: <<https://www.epa.gov/dwucmr>> [Accessed 19 August 2025].
- FAPESP – Fundação De Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 2025. *Contaminantes emergentes: riscos e desafios para os países em desenvolvimento*. Dossiê especial. Agência FAPESP/Folha de S.Paulo. Available at: <<https://agencia.fapesp.br>> [Accessed 19 August 2025].
- Farias, A.M.T., 2023. *Caracterização físico-química de diferentes tipos de biomassa de banana verde e sua incorporação em sorvetes de chocolate*. Graduação. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química. Available at: <<https://repositorio.ufrn.br/server/api/core/bitstreams/99c078bb-3438-465d-933d-b1523a9e52b3/content>> [Accessed 18 August 2025].
- Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauf, G., Nadal, M., Van der Ploeg, M., Van de Zee, S.E.A.T.M. and Ritsema, C.J., 2015. *Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resources management*. Science of the Total Environment, 3(1), pp.57-65. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002>
- Herrmann, A., Costa, A.B., Martinhuk, N.G. and Armas, R.D., 2023. *Efeitos na Saúde Humana Causados Pela Exposição a 17 Beta-Estradiol e 17 Alfa-Etinilestradiol*. Epitaya E-Books, 1(27), pp.150-162. <https://doi.org/10.47879/ed.ep.2023670p150>
- Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G.C., Sumpter, J.P. and Tyler, C.R., 2002. *Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (Rutilus rutilus) living in rivers that receive treated sewage effluents*. Biology of Reproduction, 66(2), pp.272-281. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.2.272>
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G. and Sumpter, J.P., 1998. *Widespread sexual disruption in wild fish in rivers in the United Kingdom*. Environmental Science and Technology, 32(17), pp. 2498-2506. <https://doi.org/10.1021/es9710870>
- Komesli, O.T., Muz, M., Ak, M.S., Bakirdere, S. and Gokcay, C.F., 2015. *Occurrence, fate and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in Turkish wastewater treatment plants*. Chemical Engineering Journal, 277, pp.202-208. <https://doi.org/10.1016/j.ccej.2015.04.115>
- Křesinová, Z., Moeder, M., Ezechiáš, M., Svobodová, K. and Cajthaml, T., 2012. *Mechanistic study of 17 α -ethinylestradiol biodegradation by Pleurotus ostreatus: tracking of extracellular and intracellular degradation mechanisms*. Environmental Science & Technology, 46(24), pp.13377-13385. <https://doi.org/10.1021/es3029507>.
- Mensah, L., Petrie, B., Scrimshaw, M., Cartmell, E., Fletton, M. and Campo, P., 2023. *Influence of solids and hydraulic retention times on microbial diversity and removal of estrogens and nonylphenols in activated sludge systems*. Heliyon, 9(9), e20690. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19461>
- Mpupa, A., Nqombolo, A., Mizaikoff, B. and Nomngongo, P.N., 2020. *Enhanced Adsorptive Removal of β -Estradiol from Aqueous and Wastewater Samples by Magnetic Nano-Akaganeite: Adsorption Isotherms, Kinetics, and Mechanism*. Processes, 8(9), p.1197. <https://doi.org/10.3390/pr8091197>
- Nazari, E. and Suja, F., 2016. *Effects of 17 β -estradiol (E2) on aqueous organisms and its treatment problem: a review*. Reviews on Environmental Health, 31(4), pp.465–491. <https://doi.org/10.1515/reveh-2016-0040>
- Rachid, I., 2022. *Estradiol: Guia Completo*. Longevidade Saudável. Available at: <<https://longevidadesaudavel.com.br/estradiol-guia-completo/>> [Accessed 19 August 2025].
- Santana, S.L., 2015. *O Ensaio Cometa em Drosophila melanogaster como bioindicador da poluição atmosférica em uma área urbana e rural*. Graduação. Licenciatura em Ciências Biológicas.

Universidade Federal de Pernambuco, Available at:
<<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/18098/4/SANTANA%2C%20Samuel%20Lima%20de.pdf>> [Accessed 19 August 2025].

Montagner, C.C., Vidal, C. and Acayaba, R.D., 2017. *Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios*. Química Nova, 40(9), pp.1094-1101.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422017000500011>

Teixeira, R.B., Marques, C.A., Carvalho, N.R., Gomes, L.E.T., Silva, F.T. and Paiva, T.C.B., 2018. *Determinação de hormônios estrogênicos em esgoto bruto e efluente de uma estação descentralizada de tratamento por lodos ativados*. Ambiente & Água, 13(3), pp.1-10.
<https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2059>

Ternes, T.A., 1998. *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers*. Water Research, 32(11), pp.3245-3260.
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00099-2)

Verlicchi, P., Al Aukidy, M. and Zambello, E., 2012. *Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—a review*. Science of The Total Environment, 429, pp.123-155.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>

Yildiz, M., Cigerci, I.H., Konuk, M., Fidan, A.F. and Terzi, H., 2009. *Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in Allium cepa root cells by chromosome aberration and comet assays*. Chemosphere, 75(7), pp.934-938.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.023>