

Rice grass used for water phytoremediation with varying concentrations of 17 α -ethinylestradiol hormone

Capim arroz na fitorremediação de água com concentrações variadas do hormônio 17 α -etinilestradiol

Rayssa Thainá de Paiva Alves¹, Luana Aparecida Silvestre Braga², Katiúcia Dias Fernandes^{3*}, Sandro José de Andrade⁴, Alley Michael da Silva Procópio⁵

Abstract: 17 α -ethinylestradiol (EE2), an endocrine disruptor (ED) excreted by women and is found in contraceptive and hormone replacement pills used at menopause. An increase in EDs requires alternative means of water and sewage treatment, since these compounds threaten human health and the environment, even at trace levels. Phytotechnology stands out from other processes because it is sustainable, given that plants are used to recover the contaminated environment. Thus, the objective of this study was to evaluate rice grass performance in the removal of 17 α -ethinylestradiol (EE2), and determine the effect of this hormone on the root anatomy and chlorophyll content of the species. A completely randomized design was used with 4 replications: EE2 concentration composed of 4 study treatments (420, 300, 180 and 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ EE2) and 2 control treatments (positive and negative). The effect of the treatments was evaluated over time (1, 7 and 15 days). EE2 removal from the solution was analyzed by HPLC. Chlorophyll was analyzed by UV-vis spectrophotometry, showing that EE2 does not interfere with the photosynthetic activity of rice grass. Aerenchyma was analyzed by microphotographs of root sections, revealing a higher proportion in plants exposed to the hormone, indicating morpho-anatomical adaptations to survive in this medium. Thus, it can be concluded that rice grass has significant phytoremediation potential after 7 days' exposure, surviving and adapting to the contaminated environment, and can be used to complement water and sewage treatments.

Key words: Endocrine disruptor. Removal. *Echinochloa crusgalli*. Water.

Resumo: O 17 α -etinilestradiol (EE2) é um interferente endócrino (IE) liberado pelo organismo feminino e encontrado em remédios contraceptivos e de reposição hormonal na menopausa. A ascensão dos IEs requer meios alternativos de tratamento de água e esgoto, pois esses compostos ameaçam a saúde humana e o meio ambiente, mesmo em nível traço. A fitotecnologia vem se distinguindo dos demais processos por ser sustentável, tendo em vista que a recuperação do meio contaminado é feita através de plantas. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar o capim arroz na remoção do 17 α -etinilestradiol (EE2), bem como verificar o efeito desse hormônio na anatomia radicular e no teor de clorofila dessa espécie. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições. Os tratamentos consistiram das concentrações de EE2 (420, 300, 180 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$), mais dois controles (positivo e negativo). O efeito dos tratamentos foi avaliado no tempo, sendo: 1, 7 e 15 dias (tempo de remediação). A análise da remoção do EE2 da solução foi feita por HPLC. A análise da clorofila foi feita por espectrofotômetro UV-vis e mostrou que o EE2 não interfere na atividade fotossintética de capim arroz. A análise dos aerênquimas foi executada por microfotografias de secções das raízes, revelando maior proporção de aerênquimas nas plantas que tiveram contato com o hormônio, indicando adaptações morfoanatômicas para sobreviverem nesse meio. Sendo assim, a espécie tem alto potencial fitorremediador com 7 dias de exposição, sobrevivendo e se adaptando ao ambiente contaminado, podendo ser empregada como complemento em tratamentos de água e esgoto.

Palavras-chave: Interferentes endócrinos. Remoção. *Echinochloa crusgalli*. Água.

*Corresponding author

Submitted for publication on 16/08/2019 and approved 06/11/2019

¹Bachelor of Chemistry and Master's student in the Multicenter Chemistry Program of Minas Gerais (MG) state at the Physics and Chemistry Institute, Federal University of Itajubá. rayssatp@gmail.com;

²Bachelor of Chemistry, Federal University of Itajubá. luanaasbraga.qba@gmail.com;

³PhD in Environment and Water Resources from MEMARH, Institute of Natural Resources, Federal University of Itajubá – MG, Itajubá Campus. katiuciadf@gmail.com;

⁴Professor at the Physics and Chemistry Institute, Federal University of Itajubá – MG. Itajubá Campus. sandroandrade@unifei.edu.br;

⁵Doctoral student in Chemistry in the Multicenter Chemistry Program of Minas Gerais, at the Federal University of Itajubá – Itabira Campus. alleymichael1987@gmail.com.

INTRODUCTION

Pharmaceutical compounds (PCs) are a large and diversified group of widely consumed organic compounds. Their residues are omnipresent in aquatic environments, and their sources may be agricultural activities, hospital effluents and industrial and domestic waste (XIONG *et al.*, 2017).

PCs with steroids have been attracting considerable attention in scientific communities and the private sector due to the large number of diseases they cause. The presence of these compounds in the body may provoke endocrine system disorders, in both humans and animals, reproductive organ deformities, low sperm count, and thyroid dysfunction, among others. They also interfere in fish physiology, affecting the reproductive development of domestic and wild animals (JARDIM; GHISELLI, 2007; MUHAMMAD *et al.*, 2017).

Among the PCs containing steroids is 17 α -ethinylestradiol (EE2), which belongs to the estrogen class. In addition to being excreted by women, mainly in the urine, it is used in contraceptives, hormone therapy drugs at menopause and in the control of physiological disorders. According to Muhammad *et al.* (2017), polluting levels of estrogen have been detected near wastewater treatment plants and groundwaters around the world.

Methods that use adsorption and advanced oxidative processes (AOPs) are widely applied to remove endocrine disruptors from the environment, but are not effective in removing trace levels of substances. Furthermore, AOPs form intermediate products, which have not been sufficiently studied to elucidate their effects, and adsorption processes generate a considerable amount of residue (JARDIM; GHISELLI, 2007; FERNANDES *et al.*, 2011; AQUINO *et al.*, 2013). Thus, studies to find efficient, low-cost environmentally-friendly remediation methods are underway, including phytotechnology.

Phytotechnology stands out from the other processes due to its sustainability, since plants are used to recover the contaminated environment. The ability of some plants to survive and adapt in contaminated environments offers a model system that can detect a larger number of mechanisms that contribute to their tolerance (GERHARDT *et al.*, 2017). Identifying these mechanisms is essential to trigger the phytoremediation process.

INTRODUÇÃO

Os compostos farmacêuticos (PC's) em geral são um grupo grande e diversificado de compostos orgânicos amplamente consumidos. Seus resíduos são onipresentes em ambientes aquáticos, que podem ter como fonte as atividades agropecuárias, efluentes hospitalares, resíduos industriais e resíduos domésticos (XIONG *et al.*, 2017).

Os PC's com esteroides vêm ganhando ampla atenção nas comunidades científicas e setores privados devido ao alto índice de doenças desenvolvidas em decorrência da sua presença. A presença destes compostos no organismo humano pode provocar distúrbios do sistema endócrino, tanto de seres humanos quanto de animais, deformidades nos órgãos reprodutores, queda da taxa de espermatozoides, disfunção da tireoide entre outros. Além de interferir na fisiologia dos peixes, afetando o desenvolvimento reprodutivo de animais domésticos e selvagens (JARDIM; GHISELLI, 2007; MUHAMMAD *et al.*, 2017).

Dentre os PC's com esteroides, destaca-se o 17 α -etinilestradiol (EE2), que está contido na classe dos estrogênios. Além de ser excretado naturalmente pelo organismo feminino, principalmente pela urina, é utilizado em pílulas anticoncepcionais, remédios de reposição hormonal na menopausa e administrado no controle de distúrbios fisiológicos. De acordo com Muhammad *et al.* (2017), os estrogênios em níveis poluidores foram detectados em locais próximos a estações de tratamento de águas residuais e em águas subterrâneas em vários locais no mundo.

Métodos que empregam processos de adsorção e processos oxidativos avançados (POA's) são muito utilizados para a remoção de interferentes endócrinos do meio ambiente, mas não são eficazes na remoção de substâncias em nível traço. Além disso, os POA's formam produtos intermediários, os quais não possuem estudos suficientes para sua elucidação, além dos processos de adsorção gerarem muitos resíduos (JARDIM; GHISELLI, 2007; FERNANDES *et al.*, 2011; AQUINO *et al.*, 2013). Com isso, estudos para encontrar formas de remediação com baixo custo e alta eficiência e que sejam amigáveis ao ambiente progridem, como é o caso da fitotecnologia.

A fitotecnologia vem se distinguindo dos demais processos por ser sustentável, já que a recuperação do meio contaminado é feita por meio de plantas. A capacidade que algumas plantas apresentam de sobreviver e se adaptar em ambientes contaminados oferece um sistema modelo no qual se pode detectar o maior número de mecanismos que contribuem para a sua tolerância (GERHARDT *et al.*, 2017). Identificar esses mecanismos são essenciais para desencadear o processo da fitorremediação.

To remove the hormone levonorgestrel from aquatic environments, Li *et al.* (2014) conducted a study using two different hydrophytes, with satisfactory results. However, a series of recent articles described estrogen uptake in plants, underscoring that they can accumulate estrogens in both roots and shoots (SHI *et al.*, 2010; CARD *et al.*, 2012; CARD *et al.*, 2013; SHARGIL *et al.*, 2015).

The species *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. Ess. Agrost., popularly known as rice grass, is an annual herbaceous plant that is harmful to different crops in low-lying or irrigated areas. Poaceae, rapid-growing, easy-to-plant grasses, are potential agents in the revegetation of contaminated areas (SILVA *et al.*, 2006). The species *Echinochloa crusgalli* is tolerant to metals such as Cd, Cu and As (EZAKI *et al.*, 2008; SULTANA; KOBAYASHI, 2011), and is the target of this study. As such, the aim of this experiment was to assess rice grass performance in 17 α -ethinylestradiol (EE2) removal, and determine the effect of this hormone on the root anatomy and chlorophyll content of the species.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of EE2 solutions

Four solutions of commercial contraceptive containing the EE2 hormone at theoretical concentrations of 420, 300, 180 and 60 $\mu\text{g L}^{-1}$, equivalent to 70, 50, 30 and 10 pills were prepared. The pills were ground in a porcelain mortar and pestle. The mass of each dose was transferred to a 2000 mL beaker added with deionized water to form a solution. This solution was vacuum filtered to separate the solution with EE2 from the excipients of the pills. To that end, a 1000 mL Bunsen flask, vacuum pump, and Büchner funnel with Unifil quantitative filter paper (pore size of 7-12 μm) were used. After filtration, the solution was transferred to a 5000 mL volumetric balloon, but did not reach the meniscus. A modified no. 2 Hoagland and Arnon nutrient solution (1950), with 40% ionic strength, was added to the balloon. Only after this was the meniscus reached with deionized water. The volumetric balloon was wrapped in aluminum foil and stored in a refrigerator for future analyses.

Experimental procedure

In a greenhouse, the rice grass (*E. crusgalli*) seeds were planted in sand substrate, then washed and irrigated with a modified no. 2 Hoagland and Arnon nutrient solution (1950), with 40% ionic strength.

Para remover o hormônio levonorgestrel de ambientes aquáticos Li *et al.* (2014) desenvolveram um estudo utilizando duas hidrófitas diferentes; o aludido estudo se mostrou satisfatório. Todavia, uma série de artigos recentes descrevem estudos de captação de estrogênio em plantas, destacando que as plantas podem acumular estrogênios tanto na raiz como na parte aérea (SHI *et al.*, 2010; CARD *et al.*, 2012; CARD *et al.*, 2013; SHARGIL *et al.*, 2015).

A espécie *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. Ess. Agrost., conhecida popularmente como capim-arroz, é uma planta anual, herbácea e daninha de diversas culturas de áreas baixas ou áreas irrigadas. As poáceas geralmente apresentam facilidade de semeadura, rápido crescimento e estabelecimento, destacando-se como potenciais agentes na revegetação de áreas contaminadas (SILVA *et al.*, 2006). A espécie *Echinochloa crusgalli* tem sido identificada como tolerante a metais como Cd, Cu e As (EZAKI *et al.*, 2008; SULTANA; KOBAYASHI, 2011) e será alvo desse estudo. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho avaliar o capim arroz na remoção do 17 α -etinilestradiol (EE2), bem como verificar o efeito desse hormônio na anatomia radicular e no teor de clorofila dessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo das soluções de EE2

Preparou-se quatro soluções do anticoncepcional comercial contendo o hormônio EE2 nas concentrações teóricas de 420; 300; 180 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ equivalentes a 70; 50; 30 e 10 comprimidos. Os comprimidos foram macerados em almofariz com auxílio de um pistilo, ambos de porcelana. Transferiu-se a massa de cada dose para um béquer de 2000 mL e adicionou-se água deionizada para formar uma solução. Essa solução foi filtrada a vácuo para separar a solução com EE2 dos excipientes do comprimido. Para isso, utilizou-se um kitassato de 1000 mL, uma bomba de vácuo, um funil de Büchner com papel de filtro quantitativo da marca Unifil (tamanho de poro de 7-12 μm). Após a filtração, transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 5000 mL, mas não se acertou o menisco. Adicionou-se solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) n^o2, modificada, com 40% da força iônica ao balão. Só então se acertou o menisco com água deionizada. Envolveu-se o balão volumétrico em papel alumínio, que foi armazenado em uma geladeira para análises posteriores.

Instalação do experimento

Em casa de vegetação as sementes de capim arroz (*E. crusgalli*) foram semeadas em substrato areia lavada e irrigadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) n^o2, modificada, com 40% da força iônica.

Thirty days after planting, the seedlings were washed in deionized water, selected for uniform length, and transferred to aluminum trays containing previously prepared Hoagland and Arnon (1950) nutrient solution. A 500 mL solution with different EE2 concentrations was used and the *E. crusgalli* seedlings were suspended on Styrofoam sheets. The volume was maintained by replenishing the Hoagland and Arnon (1950) nutrient solution without hormones.

A completely randomized design was used, with four replications. The treatments consisted of EE2 concentrations (420, 300, 180 and 60 $\mu\text{g L}^{-1}$), and two controls (positive with EE2, without plants, and negative, without EE2, with plants). The effect of treatments was assessed over time, at 1, 7 and 15 days (remediation time), totaling 24 experimental units. The experimental plot consisted of 10 rice grass plants.

Chemical Analyses

Aliquots of the solution were removed in triplicate from each treatment at the onset of the experiment (day 1), on day 7 and day 15. EE2 concentrations were determined using Infinity 1260 high-performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent Technologies®) equipped with a fluorescent detector (FLD), quaternary pump and automatic injector. The sample was eluted in an Eclipse Plus C8 chromatographic column (5.0 μm , 4.6 x 150.0 mm – Agilent Technologies®) and a mobile phase composed of acetonitrile:water (60:40) in isocratic mode. The column flow rate was 0.500 mL min^{-1} , injection volume 10.00 μL , running time 10 min and column temperature 45 °C. The acetonitrile used was HPLC – Sigma - Aldrich® grade and the water was deionized in a Direct-Q (Millipore®) purification system and degassed in a digital ultrasonic bath (SoniClean 2 – Sanders Medical).

The experiment concluded after 15 days and the chlorophyll concentration was determined. Extraction was performed in 80% acetone, using around 1 g of fresh matter. Chlorophyll a and b and total chlorophyll were quantified (mg L^{-1}) by ultraviolet-visible (UV-vis) spectrophotometry. The equations deduced from Arnon's methodology (1949) were used to obtain chlorophyll a and b concentrations, in equations (1) and (2), respectively. Total chlorophyll was estimated by equation (3).

$$\text{Chlor}_a = 12.7 \times (A_{663}) - 2.69 \times (A_{645}) \quad (1)$$

$$\text{Chlor}_b = 22.9 \times (A_{645}) - 4.68 \times (A_{663}) \quad (2)$$

$$\text{Chlor}_t = 8.02 \times (A_{663}) + 20.2 \times (A_{645}) \quad (3)$$

Where A_x is the absorbance value in the wavelength used (nm).

Aos 30 dias após semeio, as mudas foram lavadas em água deionizada, selecionadas quanto à uniformidade do comprimento e transferidas para bandejas de alumínio contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) previamente preparada. Utilizou-se 500 mL da solução com diferentes concentrações de EE2 e as mudas de *E. crusgalli* ficaram suspensas em placas de isopor. O volume foi mantido com a reposição da solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) sem hormônio.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições. Os tratamentos consistiram das concentrações de EE2 (420, 300, 180 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$), mais dois controles (positivo com EE2 e sem planta e negativo, sem EE2 e com planta). O efeito dos tratamentos foi avaliado no tempo, sendo: 1, 7 e 15 dias (tempo de remediação), totalizando 24 unidades experimentais. A parcela experimental foi composta por 10 plantas de capim-arroz.

Análises químicas

Retirou-se alíquotas da solução em triplicata de cada tratamento na montagem do experimento (dia 1) e aos 7 e 15 dias. A determinação das concentrações de EE2 foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Modelo Infinity 1260 - Agilent Technologies® equipado com um detector de fluorescência (FLD), uma bomba quaternária e um injetor automático. A amostra foi eluída em uma coluna cromatográfica Eclipse Plus C8 (5,0 μm , 4,6 x 150,0 mm – Agilent Technologies®) e uma fase móvel composta por acetonitrila:água (60:40) em modo isocrático. A vazão da coluna foi de 0,500 mL min^{-1} , o volume de injeção foi de 10,00 μL , o tempo de corrida foi de 10 min e a temperatura da coluna permaneceu em 45 °C. A acetonitrila utilizada foi de grau HPLC – Sigma - Aldrich® e a água foi deionizada a partir de um sistema de purificação Direct-Q (Millipore®) e degaseificada em banho ultrassônico digital (Modelo SoniClean 2 – Sanders Medical).

Aos 15 dias, o experimento foi finalizado e determinada a concentração de clorofila. A extração foi realizada em acetona 80%, utilizando-se cerca de 1 g de matéria fresca. A quantificação dos teores de clorofilas a e b e clorofila total (mg L^{-1}) foi realizada por espectrofotometria na região do ultravioleta e visível (UV-vis). A partir das equações deduzidas pela metodologia de Arnon (1949), obteve-se as concentrações das clorofilas a e b, nas equações (1) e (2), respectivamente. A clorofila total foi estimada pela equação (3).

Onde A_x é o valor da absorbância no comprimento de onda utilizado (nm).

Anatomical Analyses

At the end of the experiment, the roots were collected, fixed and conserved in 70% alcohol. Next, free hand sections were cut using stainless steel blades. The sections were clarified with 50% sodium hypochlorite solution, submitted to 0.5% blue toluidine dye, washed in distilled water and dyed with an astra blue-safranin mixture, as described by Kraus and Arduin (1997). The sections were placed on slides coated with glycerin-gelatin and covered with a coverslip. An Olympus U-TV1X-2 digital camera, coupled to an Olympus CX41 microscope and Carl Zeiss Zen 2 blue edition software were used to obtain 6 microphotographs of each repetition, which were used to take measurements in ImageJ 1.45s software. A total of 120 observations were made, 24 for each treatment. For each section of the root, the aerenchyma area was measured and the vessels counted. The diameter of the metaxylem vessels was then measured in order to calculate the Carlquist vulnerability index (CVI), using the equation proposed by Carlquist (1975).

$$CVI = \frac{\text{vessel element diameter (mm)}}{\text{number of vessel elements}}$$

Statistical Analysis

The data were submitted to the F-test in analysis of variance ($p \leq 0.05$), and the significant results to the Scott-Knott test, using SISVAR software (FERREIRA, 2011).

RESULTS AND DISCUSSION

Obtaining the analytical curve to determine EE2

The analytical curve used to determine EE2 concentrations is represented by Figure 1, where the limits of the curve are $5.00-400.00 \mu\text{g L}^{-1}$.

The coefficient of determination (R^2) of 0.99 is higher than that stipulated by ANVISA (National Health Surveillance Agency), which is ≥ 0.98 for the results obtained by the analytical curve to be reliable. Thus, the model explains more than 99.8% of data variability.

The detection limit (DL) of EE2 was determined using a 3:1 signal-to-noise ratio, obtaining a result of $3.40 \mu\text{g L}^{-1}$. The quantification limit (QL) was also obtained using a 10:1 signal-to-noise ratio, resulting in $11.32 \mu\text{g L}^{-1}$ (RIBANI *et al.*, 2004).

Análises anatômicas

No final do experimento, as raízes foram coletadas, fixadas e conservadas em álcool 70%. Em seguida, foram feitos cortes à mão livre utilizando lâminas cortantes de inox. As seções foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio 50%, submetidas ao processo de coloração com a mistura de azul de toluidina 0,5%, lavadas em água destilada e submetidas ao processo de coloração com a mistura de azul de astra-safranina, métodos descritos por Kraus e Arduin (1997). As seções foram colocadas em lâminas com gelatina glicerinada e cobertas por lamínula. Com o auxílio de uma câmera digital Olympus U-TV1X-2, acoplada ao microscópio Olympus CX41 e com auxílio do *software* Carl Zeiss Zen 2 blue edition foi obtido 6 microfotografias de cada repetição as quais foram utilizadas para realizar as medições no *software* ImageJ 1.45s. Foram feitas 120 observações, sendo 24 para cada tratamento. Para cada seção da raiz, mediu-se a área de aerênquima e contagem dos vasos, seguido da medição dos diâmetros dos vasos do metaxilema para o cálculo do Índice de Vulnerabilidade de Carlquist – IVC, calculado segundo Carlquist (1975) de acordo com a Equação (4).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância F ($p \leq 0,05$), e os resultados significativos foram submetidos ao teste de Scott-Knott, empregando o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção da curva analítica para a determinação do EE2

A curva analítica utilizada na determinação das concentrações de EE2 está representada pela Figura 1, onde os limites da curva são $5,00-400,00 \mu\text{g L}^{-1}$.

O valor de 0,99 do coeficiente de determinação (R^2) está acima do estipulado pela ANVISA, sendo este igual ou maior que 0,98 para que os resultados obtidos pela curva analítica sejam confiáveis. Com isso, tem-se que o modelo consegue explicar mais de 99,8% da variabilidade dos dados.

O limite de detecção (LD) do EE2 foi obtido pelo método sinal/ruído em uma proporção de 3:1, com o qual se obteve o resultado de $3,40 \mu\text{g L}^{-1}$. O limite de quantificação (LQ) também foi obtido pelo método sinal/ruído em uma proporção de 10:1, resultando em $11,32 \mu\text{g L}^{-1}$ (RIBANI *et al.*, 2004).

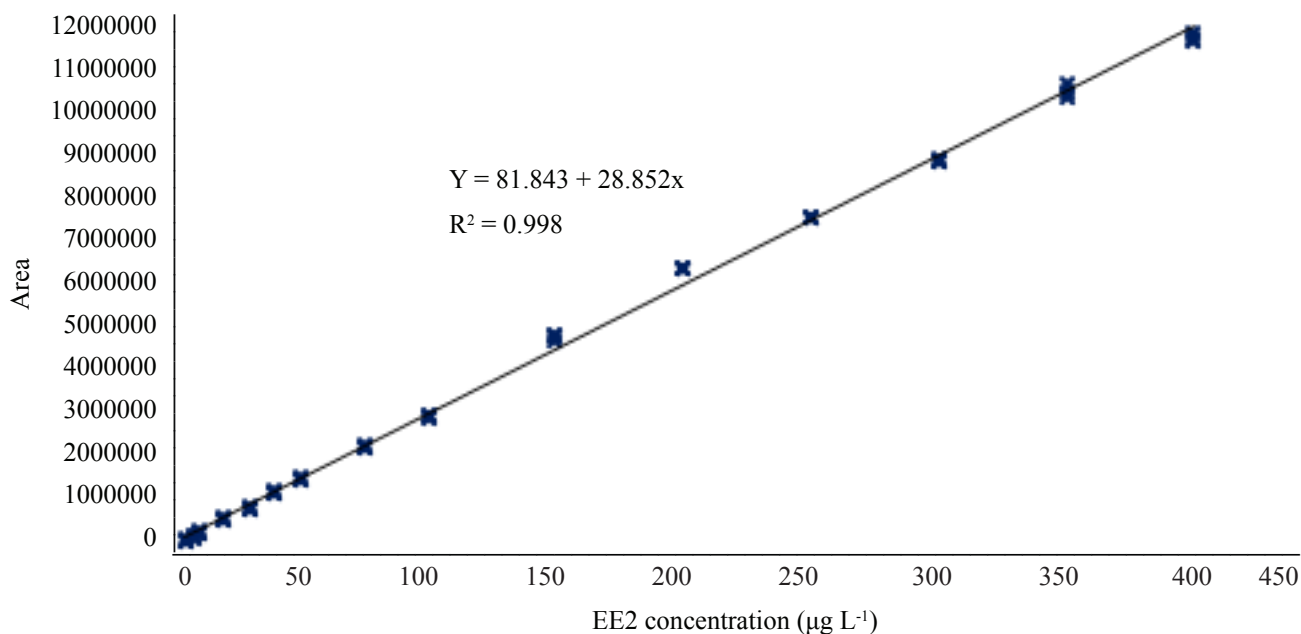


Figure 1 – Analytical curve to determine 17-alpha ethinylestradiol as a function of the fluorescence detector.
 Figura 1 - Curva analítica para a determinação de 17-alfa etinilestradiol em função do detector de fluorescência.

Phytoremediation Analysis

There was interaction between hormone concentration and phytoremediation time (Figure 2). In the treatments with 130 and 42 $\mu\text{g L}^{-1}$ of EE2, the first assessment (day 1), which contained the lowest hormone concentrations, indicated significant removal after 7 days of remediation, with values below the QL (11.32 and 3.40 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively) (Figure 2).

In treatments 251 and 348 $\mu\text{g L}^{-1}$, 98 and 91% removal was observed at the end of the first week, respectively. Over longer time periods, the hormone with the highest concentration can probably be removed, and may reach the QL, as observed after 15 days of remediation (Figure 2). The positive control indicates partial removal of the dose, corresponding to 20% EE2 degradation in the first week and 69% in the second, perhaps due to the ultraviolet rays of the sun and the microorganisms present in the solution, such as algae and fungi (WRITER *et al.*, 2011; PETRIE *et al.*, 2015).

Análise da fitorremediação

Houve interação entre os fatores concentração do hormônio e tempo de fitorremediação (Figura 2). Nos tratamentos com 130 e 42 $\mu\text{g L}^{-1}$ de EE2, primeira avaliação (dia 1), que continham as menores concentrações do hormônio, houve alta remoção após 7 dias de remediação, ficando os valores abaixo do LQ que foi de 11,32 e 3,40 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 2).

Nos tratamentos 251 e 348 $\mu\text{g L}^{-1}$, observa-se 98 e 91% de remoção ao final da primeira semana, respectivamente. Decorre-se que, em tempo maior, o hormônio em maior concentração provavelmente pode ser removido, podendo chegar até ao LQ, como observado aos 15 dias de remediação (Figura 2). O controle positivo indica remoção parcial da dose, correspondendo uma degradação de 20% do EE2 na primeira semana e de 69% na segunda semana, talvez pelos raios ultravioletas do sol e também devido aos micro-organismos presentes na solução, como algas e fungos (WRITER *et al.*, 2011; PETRIE *et al.*, 2015).

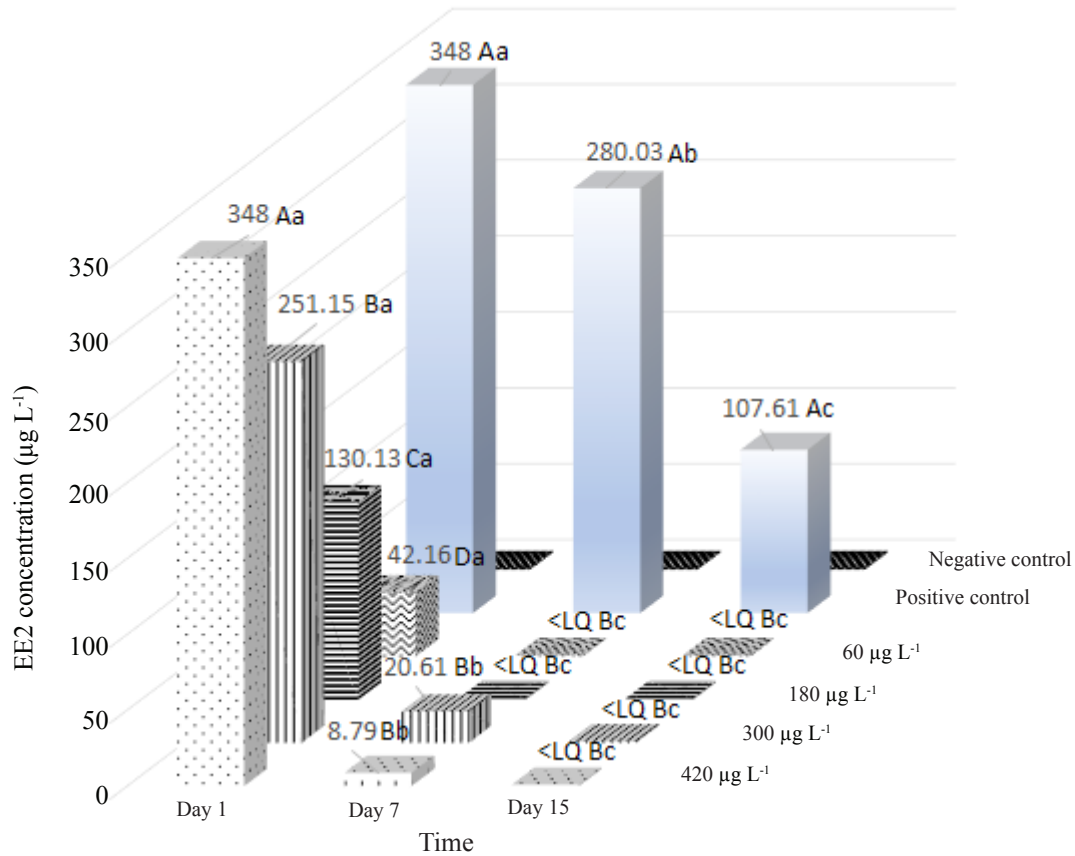


Figure 2 - Interaction between EE2 concentrations with each week of phytoremediation assessment using *E. crusgalli*.

*Means followed by the same lower case letter, within the EE2 concentrations, do not differ according to the Scott-Knott test at 5% probability. Means followed by the same upper case letter, within the time frame, do not differ according to the Scott-Knott test at 5% probability.

Figura 2- Interação entre as concentrações de EE2 com cada semana de avaliação da fitorremediação utilizando *E. crusgalli*.

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, dentro das concentrações do EE2, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. *Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, dentro do tempo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

The literature reports the crucial role of algae in removing estrogens (SHI *et al.*, 2010). However, for phytoremediation to be viable, the weather has to be favorable, explaining the emphasis on plants in relation to microorganisms (BEANS, 2017). Bircher (2011) observed that *Populus deltoids nigra*, an arboreal species, and the cyperacea *Scirpus validus* could reduce the concentration of synthetic and natural steroids such as 17 β -E2, E1, E3 and EE2 in the solution via transformation, suggesting that these species are phytoremediators of these hormones. Shi *et al.* (2010) observed that *Lemna sp* plays an important role in estrogen removal, including EE2 remediation. Pal *et al.* (2010) found concentrations between 0.59 and 5.60 ng L⁻¹ in a sewage treatment plant and up to 4.67 ng L⁻¹ of EE2 in seawater. The present study used higher amounts and obtained promising results with rice grass as a phytoremediator of EE2, primarily in the composition of a group of plants to remove industrial wastes and in sewage treatment.

Anatomical and physiological analyses

In the shoot and root system of plants, no significant morphological changes were observed in EE2 concentrations or time, given that all the treatments involved uniform stem and root size. Low estrogen concentrations may be beneficial in agriculture. Dormancy problems experienced by some plant species could be overcome. Thus, according to Erdal and Dumlupinar (2010), estrogens have both positive and negative effects on plant growth, depending on the concentration. In lentils, for example, treatment with 17 β -E2 improved embryo growth and tolerance to cadmium and copper stress during germination (CHAOUÏ; FERJANI, 2013). Janeczko and Skoczowski (2005) tested the hormones estrone and 17 β -estradiol at 1 μ M in a Hoagland solution in tomato seedlings and observed a decline in growth and in the number of roots. However, Pocock and Falk (2014) believe that further research is needed on the negative impacts of estrogen on plant growth, concluding that EE2 discharge into residual waters has a harmful effect, inhibiting algal growth. Thus, the role of estrogens in biological systems is ambiguous, that is, each plant reacts differently. As such, there is a need to test different species.

With respect to aerenchyma formation, the proportion of area occupied in relation to that of the cortex varied between plant roots due to the presence of the hormone (Table 1). However, the proportion of aerenchyma did not vary between EE2 concentrations.

A literatura relata o papel crucial das algas na remoção de estrogênios (SHI *et al.*, 2010). Porém, para que a fitorremediação seja viável, o tempo tem que estar favorável, por isso o destaque para as plantas em relação aos micro-organismos (BEANS, 2017). Bircher (2011) observou que *Populus deltoids nigra*, uma espécie arbórea, e a ciperácea *Scirpus validus* poderiam reduzir a concentração de esteroides sintéticos e naturais como 17 β -E2, E1, E3 e EE2 da solução por meio de transformação, sugerindo essas espécies como fitorremediadoras desses hormônios. Shi *et al.* (2010) observaram que a *Lemna sp* tem um papel crucial na remoção de estrogênios, inclusive para a remediação de EE2. Pal *et al.* (2010) encontraram em estação de tratamento de esgoto (ETE) concentrações entre 0,59 e 5,60 ng L⁻¹; e de até 4,67 ng L⁻¹ de EE2, na água do mar. O presente trabalho utilizou quantidades superiores e observou resultados promissores para o uso do capim-arroz como fitorremediadora de EE2, principalmente, na composição de um banco de plantas para remoção de efluentes industriais e de tratamentos de esgotos

Análises anatômicas e fisiológicas

Na parte aérea e no sistema radicular das plantas não se observou alterações morfológicas consideráveis em relação às concentrações de EE2 testadas e ao tempo, visto que todos os tratamentos apresentaram uniformidade dentro de uma faixa de tamanho para o caule e o sistema radicular. É possível que os estrogênios em baixas concentrações pudessem ser benéficos na agricultura. Problemas de dormência experimentados por algumas espécies de plantas poderiam ser superados. Assim, de acordo com Erdal e Dumlupinar (2010), os estrogênios têm efeitos positivos e negativos em razão da concentração no crescimento das plantas. Em lentilhas, por exemplo, o tratamento com 17 β -E2 melhorou o crescimento embrionário e a tolerância ao estresse por cádmio e cobre durante a germinação (CHAOUÏ; FERJANI, 2013). Já Janeczko e Skoczowski (2005) testaram os hormônios estrona e 17 β -estradiol a 1 μ M em solução de Hoagland em mudas de tomate e observaram redução do crescimento, bem como no número de raízes. Porém, Pocock e Falk (2014) acreditam que mais investigações são necessárias para os impactos negativos do estrogênio no crescimento das plantas, pois em seus trabalhos eles concluíram que a descarga de EE2 no fluxo de águas residuais apresentou efeito deletério, inibindo o crescimento de algas. Dessa forma, pode-se inferir que o papel dos estrogênios nos sistemas biológicos é ambíguo, ou seja, cada planta reage de forma diferente, daí a necessidade de se testar diversas espécies.

Em relação à formação de aerênquimas, a proporção da área ocupada por eles em relação à do córtex variou entre as raízes das plantas devido à presença do hormônio (Tabela 1). Entretanto, a proporção de aerênquima não variou entre as concentrações de EE2.

Table 1 – Proportion of aerenchyma area in relation to that of the cortex (%) in rice grass roots submitted to different EE2 concentrations

Tabela 1 - Proporção da área de aerênquimas em relação à área do córtex (%) em raízes de capim arroz submetidas à diferentes concentrações de EE2

Concentration (µl/ml)	Proportion of aerenchyma area (%)*
420	42.32 a
300	41.07 a
180	40.66 a
60	43.69 a
420 (positive control)	-
0 (negative control)	24.81 b

* Means followed by the same letter in the column do not differ according to the Skott-Knott test at 5% probability.

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade.

To protect their physiological system, plants develop morphoanatomical adaptations that increase their survival in the contaminated medium. This increase in the proportion of aerenchyma occurred as a response to the EE2 contaminant in the water. Aerenchyma formation may be related to stress-induced ethylene synthesis, leading to the synthesis of degradation enzymes and cell wall loosening, culminating in the programmed death of cortical cells and, finally the emergence of these spaces for oxygen storage. Aerenchyma formation is also related to the formation of reactive oxygen species (ROSs), which are free radicals that contribute to aerenchyma formation (CASTRO *et al.*, 2009).

Figure 3 shows how much rice grass aerenchymas increased in each treatment compared to the negative control. This dilation in spaces between the cells of the root indicates that the plant adapted to a medium contaminated with the EE2 hormone, regardless of its concentration.

As plantas, para protegerem seu sistema fisiológico, desenvolvem adaptações morfoanatômicas que lhes permitem maior sobrevivência em meio contaminado. Esse aumento na proporção de aerênquimas ocorreu em resposta à presença do contaminante EE2 na água. A formação de aerênquima pode estar relacionada à indução da síntese de etileno pela ocorrência de estresse, levando à síntese de enzimas de degradação e afrouxamento celular, culminando em morte celular programada das células corticais e, finalmente, o aparecimento desses espaços para o armazenamento de oxigênio. A formação de aerênquima também tem relação com a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são radicais livres que contribuem para a formação dos aerênquimas (CASTRO *et al.*, 2009).

A Figura 3 mostra o quanto os aerênquimas do capim-arroz aumentaram em cada tratamento em comparação com o controle negativo. Essa dilatação nos espaçamentos entre as células da raiz indica que a planta se adaptou bem em meio contaminado com o hormônio EE2, independente de sua concentração.

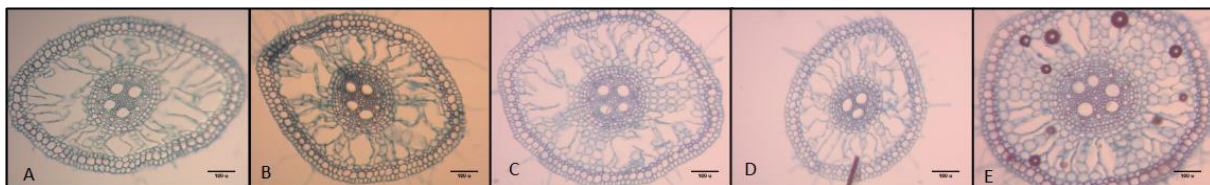


Figure 3 – Sections of roots cultivated at each EE2 concentration, which, according to real concentrations (A) are 348 µg L⁻¹, (B) 251 µg L⁻¹, (C) 130 µg L⁻¹, (D) 42 µg L⁻¹ and (E) 0 µg L⁻¹ (negative control). Bar: 100 µm.

Figura 3 - Secções das raízes cultivadas em cada concentração de EE2, onde de acordo com as concentrações reais (A) é o 348 µg L⁻¹, (B) 251 µg L⁻¹, (C) 130 µg L⁻¹, (D) 42 µg L⁻¹ e (E) 0 µg L⁻¹ (controle negativo). Barra: 100 µm.

There was no difference between chlorophyll a, b and total values for the different EE2 concentrations, confirming that EE2 did not interfere in plant physiological activity during the period proposed. Janeczko *et al.* (2012) observed that the hormones estrogen and androstenedione maximized liquid photosynthesis rates during the rehydration of plants exposed to drought. This result may have occurred because the plant was submitted to prolonged stress, unlike rice grass plants that were constantly under normal hydration conditions.

The use of rice grass at wastewater and sewage treatment plants may be a viable and effective alternative in the phytoremediation of EE2, thereby avoiding serious public health problems. Around one week is enough for efficient removal of EE2 in concentrations of less than 180 $\mu\text{g L}^{-1}$ using rice grass.

CONCLUSIONS

The species *Echinochloa crusgalli* (rice grass) was efficient in reducing the EE2 concentrations tested;

Concentrations of less than 130 $\mu\text{g L}^{-1}$ of EE2 were below the detection limit after 7 days of remediation with rice grass;

A concentration above 130 $\mu\text{g L}^{-1}$ of EE2 requires up to two weeks of phytoremediation with rice grass in order to be below the detection limit;

The EE2 concentrations did not interfere in the ability of rice grass to perform photosynthesis;

Rice grass exhibits anatomical traits that contribute to its survival in aquatic environments contaminated with EE2.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Rio-Grandense Institute for the rice grass seeds. The Minas Gerais Chemical Network (RQ-MG) and the FAPEMIG - Research Support Foundation of Minas Gerais State (Project: CEX-RED-00010-14).

Não houve diferença entre os valores de clorofila a, b e total para as diferentes concentrações de EE2. Esse resultado evidencia que o EE2 não interferiu na atividade fisiológica da planta durante o período proposto. Janeczko *et al.* (2012) observaram que o hormônio estrogênio e androstenediona maximizaram as taxas fotossintéticas líquidas durante a reidratação de plantas que sofreram um período de seca. Esse resultado pode ter sido observado porque a planta passou por um forte período de stress, diferente das plantas de capim-arroz que estiveram o tempo todo em condições normais de hidratação.

É possível que o uso do capim-arroz em estações de tratamento de água e esgoto seja uma alternativa viável e efetiva na fitorremediação do EE2, evitando assim graves problemas de saúde pública. Em torno de uma semana é suficiente para uma remoção eficiente do EE2 em concentrações menores que 180 $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando capim-arroz.

CONCLUSÕES

A espécie *Echinochloa crusgalli* (capim-arroz) foi eficiente na redução das concentrações de EE2 testadas;

Concentrações menores que 130 $\mu\text{g L}^{-1}$ de EE2 ficam abaixo do limite de detecção em 7 dias de fitorremediação com capim-arroz;

Concentração superior a 130 $\mu\text{g L}^{-1}$ de EE2 requer até duas semanas de fitorremediação com o capim-arroz para ficarem abaixo do limite de detecção;

As concentrações de EE2 testadas não interferiram na capacidade do capim-arroz de realizar fotossíntese;

O Capim-arroz tem características anatômicas que contribuem para a sua sobrevivência em ambientes aquáticos contaminados com o EE2.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Rio-grandense pelas sementes de capim-arroz. À Rede Mineira de Química (RQ-MG) e à FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Project: CEX-RED-00010-14).

CITED SCIENTIFIC LITERATURE

- AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 187-204, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-41522013000300002>
- ARNON, D. I. **Determinação do teor de clorofila – Método de Arnon** [Internet]. 1949; 2015. Available from: <http://documents.tips/documents/metodo-arnon-clorofila.html>.
- BEANS, C. Core Concept: Phytoremediation: advances in the lab but lags in the field. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 29, p. 7475-7477, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1707883114>
- BIRCHER, S. **Phytoremediation of natural and synthetic steroid growth promoters used in livestock production by riparian buffer zone plants**. 2011. 130 p. [thesis]. Iowa City: Civil and Environmental Engineering Commons/University of Iowa.
- CARD, M. L.; SCHNOOR, J. L.; CHIN, Y. P. Uptake of natural and synthetic estrogens by maize seedlings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 34, p. 8264-8271, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf3014074>
- CARD, M. L.; SCHNOOR, J. L.; CHIN, Y. P. Transformation of natural and synthetic estrogens by maize seedlings. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 10, p. 5101-5108, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/es3040335>
- CARLQUIST, S. **Ecological strategies of xylem evolution**. Berkeley: University of California Press, 1975. 259 p.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA – Universidade Federal de Lavras, MG, 2009. 234 p.
- CHAOUI, A.; FERJANI, E. E. β -estradiol protects embryo growth from heavy-metal toxicity in germinating lentil seeds. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, p. 636-645, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-013-9332-x>
- ERDAL, S.; DUMLUPINAR, R. Progesterone and β -estradiol stimulate seed germination in chickpea by causing important changes in biochemical parameters. **Z. Naturforsch**, v. 65, n. 3-4, p. 239-244, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/znc-2010-3-412>
- EZAKI, B.; NAGAO, E.; YAMAMOTO, Y.; NAKASHIMA, S.; ENOMOTO, T. Wild plants, *Andropogon virginicus* L. and *Miscanthus sinensis* Anders, are tolerant to multiple stresses including aluminum, heavy metals and oxidative stresses. **Plant cell reports**, v. 27, n. 5, p. 951-961, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-007-0503-8>
- FERNANDES, N. A.; GIOVANELA, M. Remoção dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etilestradiol de soluções aquosas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1533, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000900009>
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- GERHARDT, K. E.; GERWING, P. D.; GREENBERG, B. M. **Opinion: Taking phytoremediation from proven technology to accepted practice**, v. 256, p. 170-185, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.11.016>
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Circular 347. Berkeley: California Agricultural Experimental Station; 1950. 32 p.
- JARDIM, W. F.; GHISELLI, G. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000300032>
- JANECZKO, A.; SKOCZOWSKI, A. Mammalian sex hormones in plants. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 43, n. 2, p. 71-79, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.5603/4616>
- JANECZKO, A.; KOCUREK, M.; MARCI ŃSKA, I. Mammalian androgen stimulates photosynthesis in drought-stressed soybean. **Central European Journal of Biology**, v. 7, n. 5, p. 902-909, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.2478/s11535-012-0068-6>
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. EDUR, Seropédica, 1997. 198p.

- LI, G.; ZHAI, J.; HE, Q.; ZHI, Y.; XIAO, H.; RONG, J. Phytoremediation of levonorgestrel in aquatic environment by hydrophytes. **Journal of Environmental Sciences**, v. 26, n. 9, p. 1869-1873, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2014.06.030>
- MUHAMMAD, M. U.; KWAZO, H. A.; ABUBAKAR, L.; BAGNA, E. A. Nutritional profile and phytochemical composition of *Gardenia sokotensis* (Boscia of the rock). **African Journal of Food Science and Technology**, v. 8, n. 6, p. 108-112, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.14303/ajfst.2017.115>
- PAL, A.; GIN, K. Y. H.; LIN, A. Y. C.; REINHARD, M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 24, p. 6062-6069, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.09.026>
- PETRIE, B.; BARDEN, R.; HORDERN, B. K. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v. 72, p. 3-27, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>
- POCOCK, T.; FALK, S. Negative Impact on Growth and Photosynthesis in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* in the Presence of the Estrogen 17 α -Ethinylestradiol. **Plos One**, v. 9, n. 10, p. 1-6, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109289>
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>
- SHARGIL, D.; GERSTL, Z.; FINE, P.; NITSAN, I.; KURTZMAN, D. Impact of biosolids and wastewater effluent application to agricultural land on steroidal hormone content in lettuce plants. **Science of the Total Environment**, v. 505, p. 357-366, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.100>
- SHI, W.; WANG, L.; ROUSSEAU, D. P.; LENS, P. N. Removal of estrone, 17 α -ethinylestradiol, and 17 β -estradiol in algae and duckweed-based wastewater treatment systems. **Environmental Science Pollution Research**, v. 17, n. 4, p. 824-833, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0301-7>
- SILVA, S.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1749-1757, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006001200009>
- SULTANA, R.; KOBAYASHI, K. Potential of barnyard grass to remediate arsenic-contaminated soil. **Weed Biology and Management**, v. 11, n. 1, p. 12-17, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1445-6664.2011.00400.x>
- XIONG, J. Q.; KURADE, M. B.; JEON, B. H. Can Microalgae Remove Pharmaceutical Contaminants from Water? **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 30-44, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.09.003>
- WRITER, J. H.; RYAN, S. H.; KEEFE, L. B. Fate of 4-nonylphenol and 17 β -estradiol in the Redwood River of Minnesota. **Environmental Science Technology**, v. 46, n. 2, p. 860-868, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/es2031664>