

# GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE *IN VITRO* DE AMOSTRAS DE ÁGUA DE ARROIOS SOB A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES EFLUENTES ANTROPOGÊNICOS

PICININI, Juliana<sup>\*</sup>; OLIVEIRA, Renata Farias<sup>2</sup>; GARCIA, Ana Letícia Hilário<sup>1</sup>; CORRÊA, Dione Silva<sup>2</sup>; DA SILVA, Juliana<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Toxicológica, Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde (PPGBioSaúde), Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas- RS.

<sup>2</sup> Centro de Pesquisa em Produto e Desenvolvimento (CEPPED), Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas- RS.

\*Correspondência eletrônica: julianapicinini@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

A poluição dos ecossistemas aquáticos está associada ao lançamento de efluentes principalmente industriais e urbanos, que podem causar danos à saúde pública. Sabe-se que tais efluentes podem conter diferentes substâncias químicas, que não são totalmente removidas após os tratamentos convencionais, afetando a qualidade da água dos corpos receptores, que muitas vezes atuam como fontes de captação de água para abastecimento público.

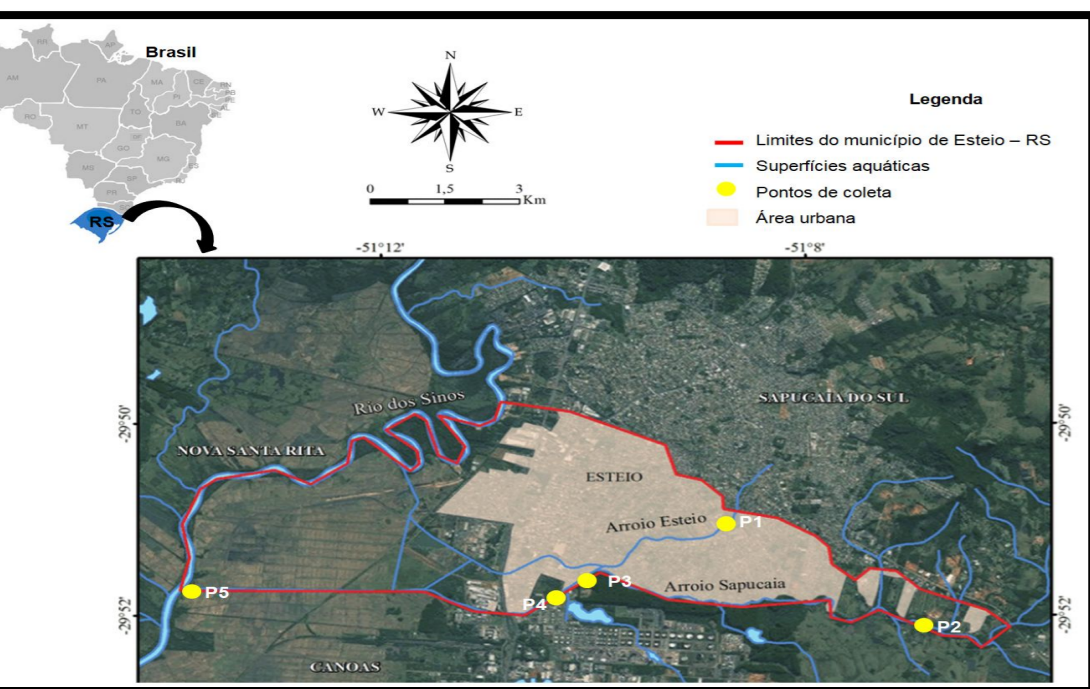


## OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico em células HepG2 de amostras de água de arroios que recebem diferentes efluentes antropogênicos.

## METODOLOGIA

Amostras foram coletadas ao longo dos arroios Esteio e Sapucaia (Esteio-RS) (Figura 1).



**Figura 1:** Localização geográfica dos pontos de coleta das amostras de água superficial dos arroios do município de Esteio (RS – Brasil).



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

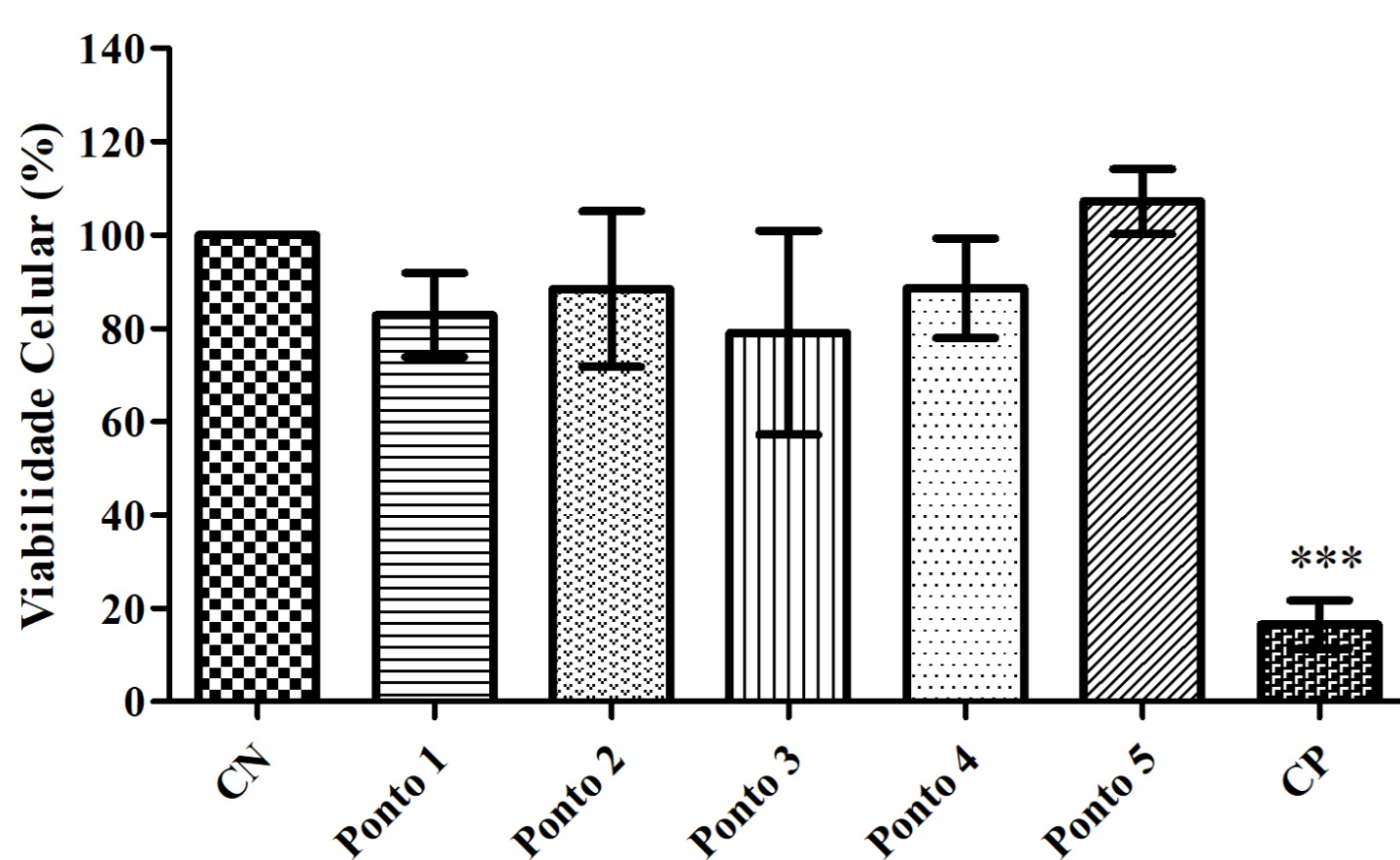
A localização e a descrição dos principais contribuintes para os locais de coleta estão descritos na Tabela 1. Detectamos diferentes elementos inorgânicos (Tabela 2), cafeína e dietiltolamida que correspondem a elementos de efluentes domésticos e industriais e escoamento agrícola. A figura 2 mostra os resultados para o ensaio de viabilidade celular (MTT), verificando-se que não houve citotoxicidade induzida pelas amostras na concentração testada. Amostras de água de todos os locais induziram danos ao DNA (Figura 3 e Tabela 3). O ensaio cometa modificado com enzimas sugere que tais danos são devido à lesões oxidativas. No entanto, esse dano ao DNA resulta de uma mistura complexa de diferentes compostos, incluindo metais pesados, embora seja difícil identificar individualmente quais substâncias podem ser responsáveis pelos efeitos adversos associados à exposição a agentes ambientais. Porém, amostras do arroio Sapucaia coletadas em áreas de influência industrial apresentaram maiores valores de elementos inorgânicos, demonstrando o impacto ambiental causado por tais efluentes neste arroio. Apesar disso, observa-se que tanto as contribuições urbanas como industriais tiveram efeito semelhante nas células avaliadas.

Ponto de coleta	Coordenadas Geográficas	Localização	Principais contribuintes
Ponto 1	29°50'54.4"S, 51°08'39.1"W	Arroio Esteio	Efluentes domésticos
Ponto 2	29°52'13.5"S, 51°06'28.7"W	Arroio Sapucaia	Local com menor contribuição antropogênica da cidade de Esteio
Ponto 3	29°51'31.8"S, 51°09'59.4"W	Arroio Sapucaia	Efluentes domésticos e de indústrias de refino de petróleo
Ponto 4	29°51'45.5"S, 51°10'17.6"W	Arroio Sapucaia	Efluentes domésticos e de indústrias metalúrgicas e de refino de petróleo
Ponto 5	29°52'20.3"S, 51°13'50.3"W	Arroio Sapucaia	Efluentes domésticos, de indústrias de refino de petróleo, e escoamento superficial agrícola

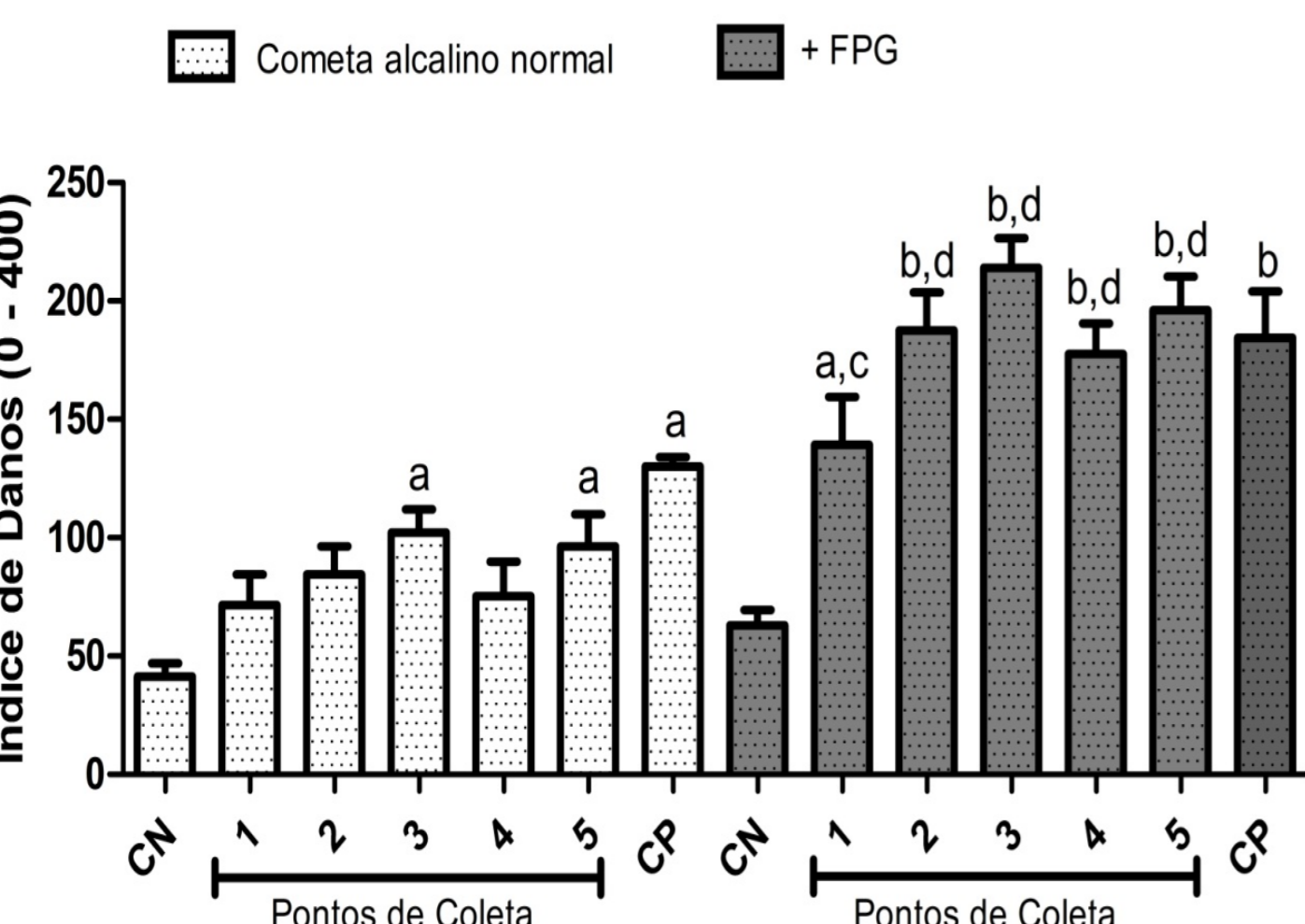
**Tabela 1:** Descrição dos pontos de coleta das amostras de água superficial dos arroios do município de Esteio (RS – Brasil).

Elementos Inorgânicos (ng/cm <sup>2</sup> )	PONTOS DE COLETA				
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Magnésio (Mg)	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	683,7	665,1	208,9
Alumínio (Al)	5.537	3.045	18.686	12.996	3.901
Silício (Si)	18.387,4	7.978,4	91.420,4	55.532,4	9.838,4
Fósforo (P)	1.163	260	1.845	2.167	1.277
Enxofre (S)	1.027,3	nd <sup>a</sup>	1.846,3	2.036,3	273,8
Cloro (Cl)	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Potássio (K)	1.320,7	334,2	7.584,7	2.514,7	429,3
Cálcio (Ca)	2.264	nd <sup>a</sup>	5.637	5.320	2.363
Titânio (Ti)	1.413,1	417,3	4.015,1	3.648,1	547,1
Cromo (Cr)	10,5	3,8	34,2	57,3	18,3
Manganês (Mn)	166,6	1.157	554,9	725,5	3.699
Ferro (Fe)	9.534,7	5.256,7	33.452,7	24.190,7	11.722,7
Níquel (Ni)	2,8	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	1,9
Cobre (Cu)	35,8	nd <sup>a</sup>	109,6	156	nd <sup>a</sup>
Zinco (Zn)	122,3	32,4	265,5	413,1	108,6
Estrôncio (Sr)	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	167,5	nd <sup>a</sup>	82,5
Zircônio (Zr)	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	367,7	136,9	nd <sup>a</sup>

**Tabela 2:** Resultados da análise de elementos inorgânicos presentes no Arroio Sapucaia e Arroio Esteio, em Esteio – RS, Brasil. <sup>a</sup> nd = não detectado.



**Figura 2:** Avaliação da viabilidade celular através do Ensaio de MTT em células HepG2 expostas por 3h às amostras de água superficial (10% v/v), Controle Negativo (CN – meio de cultura) e Controle Positivo (CP – DMSO 20%). As barras representam a média ± desvio padrão. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle negativo de  $p < 0,001$  (ANOVA, Teste de Dunnett).



**Figura 3:** Avaliação da genotoxicidade das amostras de água superficial através do ensaio cometa alcalino normal e modificado com enzimas em células HepG2. Controle Negativo (CN – meio de cultura) e Controle Positivo (CP – 4NQO – 0,040 μM). As barras representam as médias do índice de danos (0 – 400) ± desvio padrão. Diferença significativa em relação ao respectivo controle negativo de: <sup>a</sup> $p < 0,05$ ; <sup>b</sup> $p < 0,001$ . Diferença significativa em relação ao respectivo ponto sem enzimas: <sup>c</sup> $p < 0,05$ ; <sup>d</sup> $p < 0,001$ . (ANOVA, Teste de Tukey).

Parâmetros	Controle Negativo <sup>a</sup>	PONTOS DE COLETA					Controle Positivo <sup>b</sup>
		Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	
<b>Proliferação Celular (1.000 células)</b>							
IDN	1,64 ± 0,02	1,48 ± 0,03***	1,55 ± 0,03*	1,59 ± 0,02	1,56 ± 0,01*	1,52 ± 0,01**	1,66 ± 0,03
BN	498,00 ± 9,42	404,3 ± 25,07***	441,5 ± 19,10*	477,3 ± 7,18	438,3 ± 12,50*	433,0 ± 8,92*	520,3 ± 8,41
<b>Danos ao DNA (1.000 células BN)</b>							
MN	6,75 ± 1,11	11,50 ± 0,29	14,75 ± 1,65**	13,75 ± 1,31**	9,25 ± 1,18	14,50 ± 1,32**	17,00 ± 1,00***
NPB	0,00 ± 0,00	0,25 ± 0,25	0,00 ± 0,00	0,25 ± 0,25	0,25 ± 0,25	0,50 ± 0,29	0,33 ± 0,33
NBUD	7,00 ± 0,58	11,75 ± 1,11*	16,25 ± 0,75***	19,50 ± 0,50***	17,50 ± 0,50***	17,00 ± 1,00***	17,00 ± 2,08***
<b>Morte Celular (1.000 células)</b>							
Apoptose	4,75 ± 1,38	1,25 ± 0,25*	2,25 ± 0,48	2,50 ± 0,64	1,75 ± 0,48	1,75 ± 0,48	3,33 ± 0,67
Necrose	1,25 ± 0,48	1,00 ± 0,41	0,50 ± 0,50	0,75 ± 0,48	1,00 ± 0,58	1,00 ± 0,58	1,00 ± 0,58

**Tabela 3:** Avaliação do Índice de Divisão Nuclear (IDN) e da frequência de células Binucleadas (BN), células com Micronúcleos (MN), Pontes Nucleoplasmáticas (NPB), Brotos Nucleares (NBUD) e de células apoptóticas e necróticas no ensaio CBMN em células HepG2 expostas às amostras de água superficial e aos controles negativo e positivo. Resultados expressos como média ± desvio padrão. <sup>a</sup> Meio de cultura. <sup>b</sup> Metil Metano Sulfonato (MMS - 100 μM). Os asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle negativo de: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA, Teste de Dunnett).

## CONCLUSÃO

Tais resultados demonstram a necessidade de realizar o biomonitoramento das águas superficiais sob influência antropogênica, principalmente aquelas que deságuam em rios que constituem fonte de abastecimento público. Destacamos a necessidade de pesquisas sobre as diferentes substâncias químicas que podem estar presentes nesses ambientes e que têm potencial para exercer não apenas efeitos ecotoxicológicos, mas também riscos à saúde humana.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

\*Batista NJC, Melo AA de C, de Oliveira MG, Medeiros ECN, Machado JL, Evangelista SR, et al. Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities. *Chemosphere*. 2016;164:134–41. \*Johansson SAE, Campbell JL, Malmqvist KG. Particle-Induced X-Ray Emission Spectrometry (PIXE). 1st ed. Johansson SAE, Malmqvist KG, editors. Nova York: Wiley-Interscience; 1995. \*Jank L, Hoff RB, da Costa FJ, Pizzolato TM. Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct classes in surface and wastewater samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Int J Environ Anal Chem*. 2014;94(10):1013–37. \*Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55–63. \*ISO, ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. (2009) 34. <https://www.iso.org/standard/36406.html> (accessed June 3, 2021). \*Da Silva J, De Freitas TRO, Heuser V, Marinho JR, Erdmann B. Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and micronucleus test. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(4):270–8. \*Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single Cell Gel / Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35:206–21. \*Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007;2(5):1084–104.