

USO INTEGRADO DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOMARCADORES GENOTÓXICOS PARA AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS DE RIO (SUPERFICIAIS E SEDIMENTOS) SOB O EFEITO DE EFLUENTES DE CERVEJARIA.

SCOTTI AS*, GARCIA ALH, MATZENBACHER CA, SANTOS MS, SILVA, J.
Universidade Luterana do Brasil – Laboratório de Genética Toxicológica.

INTRODUÇÃO

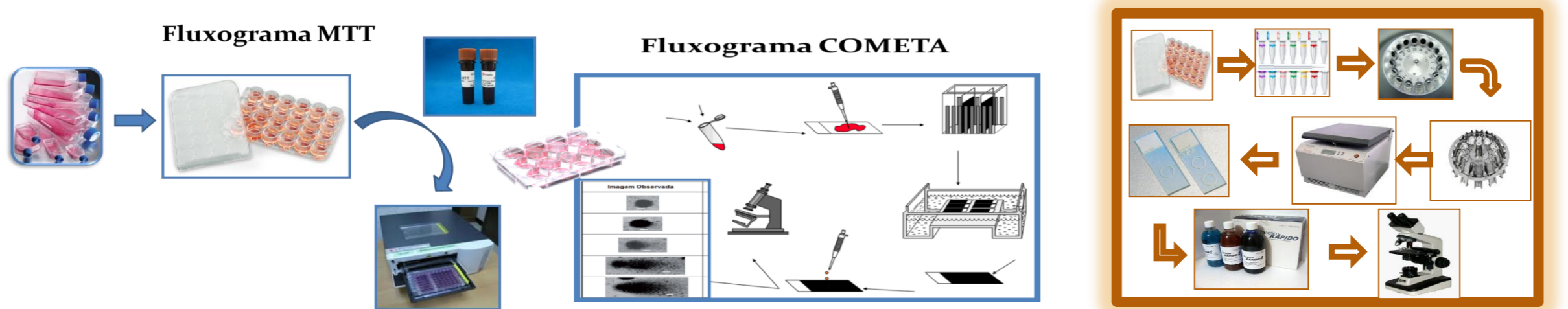
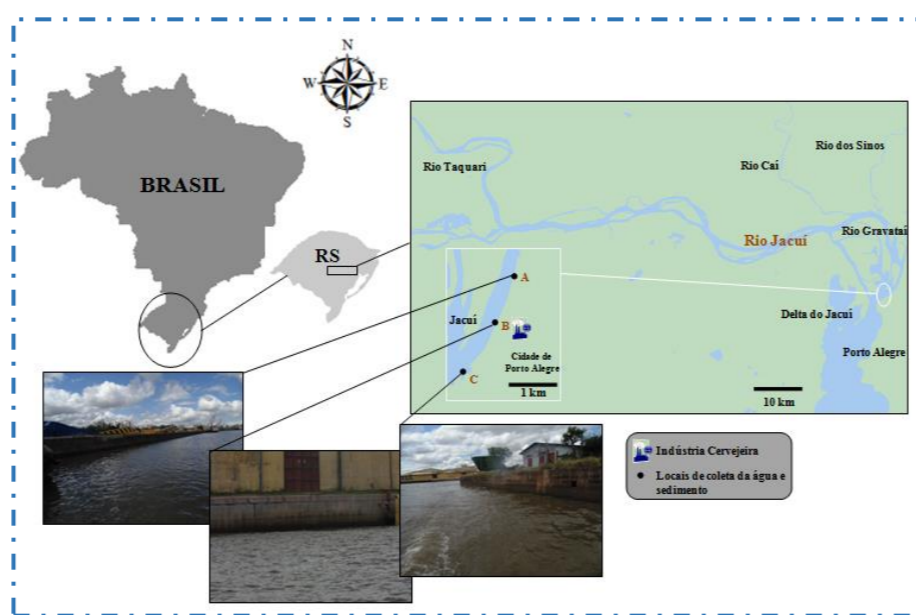
A contaminação da água possui diferentes fontes de poluição, sejam elas oriundas de descargas de efluentes, atividades agrícolas e esgotos domésticos. Efluentes de indústrias cervejeiras possuem altos níveis de matéria orgânica, fósforo, nitrogênio, elementos orgânicos e inorgânicos. Esta mistura complexa liberada no ambiente deve ser investigada para identificar os possíveis efeitos tóxicos e genotóxicos que esses contaminantes podem causar.

OBJETIVOS

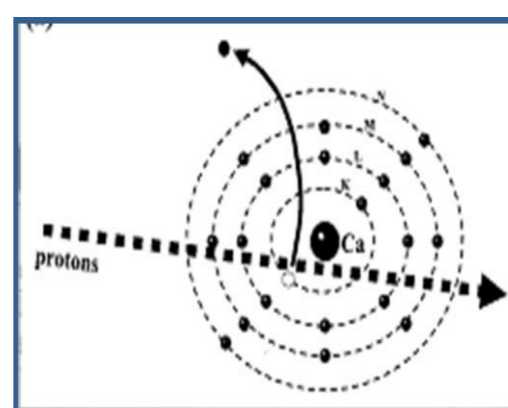
Esse estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade celular utilizando o ensaio colorimétrico de MTT ((3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)), a genotoxicidade e mutagenicidade através do Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleos em células de fibroblastos de pulmão de Hamster Chinês (V79). Além disso, identificar e quantificar os elementos inorgânicos através da técnica de PIXE, em amostras de águas do Rio Jacuí (RS/Brasil) sob a influência de despejo de efluentes industriais, principalmente da indústria cervejeira.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de águas superficiais e sedimentos foram coletadas no rio em três locais durante o verão: 1 km antes do descarte da cervejaria (local A); em frente ao local de descarte de efluentes, após o tratamento químico e biológico (local B); cerca de 1 km depois do local de descarte do efluente (local C). Para os ensaios de MTT, cometa e micronúcleos, as células foram plaqueadas (1×10^5) em cada poço, colocadas em estufa por 37^o a 5% CO₂ por 24hs para aderência nos poços, após as células foram expostas as amostras (10%) por 3hs. No Ensaio de viabilidade celular foi adicionado o sal de MTT em cada poço e realizado leitura em comprimento de onda de 540 nm. Para o ensaio cometa as células foram expostas por 3hs e após retiradas das placas e submetidas a eletroforese, e analisadas conforme a classe de danos (0-4) em microscópio óptico. Para o teste de micronúcleos as células foram expostas por 3hs e após serem retiradas da placa as células foram dispostas em lâminas e coradas.



As amostras também foram submetidas a técnica de PIXE que identifica e quantifica os elementos inorgânicos presentes em uma amostra.



CONCLUSÕES FINAIS

As amostras de águas superficiais e intersticiais foram capazes de causar danos genotóxicos em células V79 expostas à 10% de amostra. Esses danos podem ser oriundos de quantidades significativas de elementos inorgânicos causadores de efeitos genotóxicos. Os resultados obtidos demonstraram que existe a necessidade de verificar outros parâmetros físicos e biológicos ao avaliar recursos hídricos impactados por efluentes industriais de cerveja e outros efluentes industriais de elevada carga poluidora. Portanto é imprescindível a busca por soluções para identificar e diminuir (formas de tratamento do efluente) a quantidade de compostos tóxicos, potencialmente genotóxicos e mutagênicos oriundos de efluentes industriais de cervejarias no Rio Jacuí/RS, que irá impactar direta e indiretamente na qualidade dos recursos hídricos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afroz, R., Masud, M.M., Akhtar, R., Duasa, J.B., 2014. Water pollution: challenges and future direction for water resource management policies in Malaysia. Environ. Urban. 5, 63-81.
- Campbell, J.L., Hopman, T.L., Maxwell, J.A., Nejedly, Z., 2000. The Guelph PIXE software package III: alternative proton database. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. 170, 193-204.
- Da Silva, J., de Freitas, T.R., Heuser, V., Marinho, J.R., Erdtmann, B., 2000. Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by comet assay and micronucleus test. Environ. Mol. Mutagen. 35, 270-278.

RESULTADOS

As células V79 expostas as amostras de águas superficiais e intersticiais demonstraram viabilidade celular no Ensaio de MTT acima de 70% quando comparadas ao controle negativo (100%) nos três tempos de exposição. Os dados observados no ensaio cometa apresentaram genotoxicidade nos três locais (A, B e C), em amostras de água e sedimento, e mutagenicidade para local B (águas superficiais) e para os locais A e C (sedimentos). O Local C também induziu apoptose em células V79 expostas ao sedimento. As análises físico-químicas realizadas com as amostras de água apresentaram parâmetros dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. Os elementos inorgânicos encontrados nas amostras de águas e sedimentos, mostraram uma relação com o dano observado no DNA e um aumento na concentração destes elementos no local de descarte do efluente e logo após.

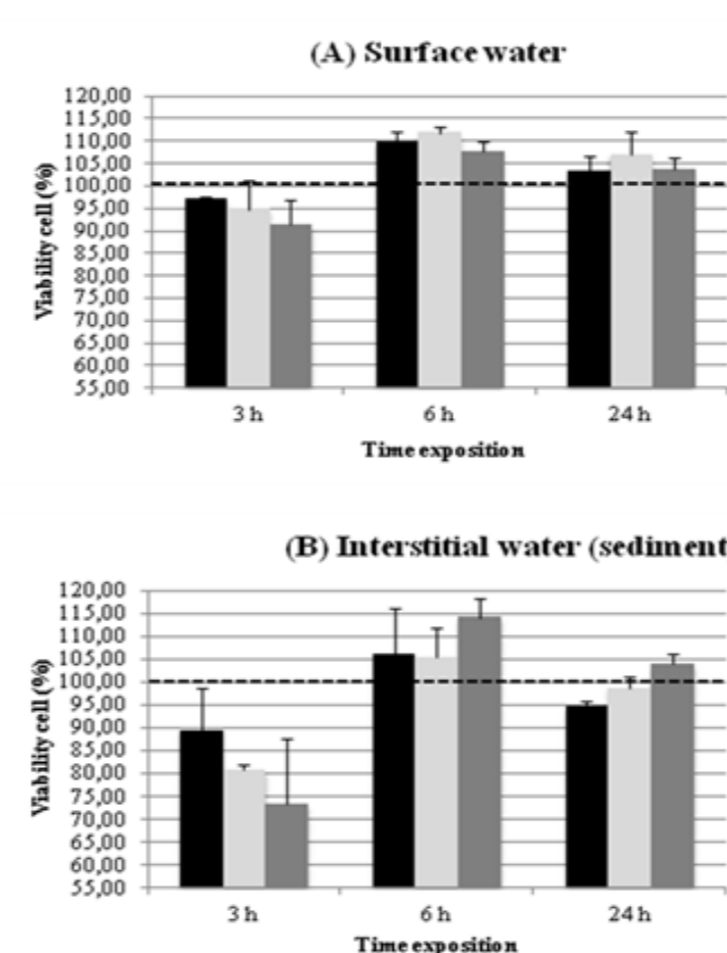


Fig 1. Avaliação da viabilidade das células V79 através do MTT após tratamentos com amostras em diferentes tempos. Os valores são a média \pm desvio padrão. Viabilidade celular percentual acima de 70%.

| Elements | Surface water ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) | | | Interstitial water (sediment) (ppm) | | |
|------------|---|-------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | Site A | Site B | Site C | Site A | Site B | Site C |
| Magnesium | 87 = 24 | 53 = 27 | 51 = 4 | 210 = 41 | 6701 = 422 ^{1,2} | 3714 = 338 ¹ |
| Aluminum | 351 = 37 | 230 = 70 | 225 = 27 | 1002 = 84 | 104953 = 4640 ^{1,2} | 49372 = 948 ¹ |
| Silicon | 555 = 160 | 453 = 148 | 388 = 39 | 34381 = 645 | 198675 = 12041 ¹ | 337487 = 32654 ^{1,2} |
| Phosphorus | nd | nd | nd | nd | nd | 6992 = 418 ^{1,2} |
| Sulfur | 68 = 9 | 70 = 13 | 62 = 20 | 108 = 20 | 1123 = 58 ¹ | 3243 = 181 ^{1,2} |
| Chlorine | 304 = 38 | 289 = 45 | 294 = 16 | 144 = 22 ^{1,2} | nd | 316 |
| Potassium | 75 = 11 | 120 = 37 | 79 = 24 | 83 = 44 | 4757 = 313 ¹ | 6489 = 1300 ^{1,2} |
| Calcium | 1269 = 68 | 1387 = 123 | 1132 = 57 | 622 = 28 | 4553 = 536 ¹ | 16921 = 3570 ^{1,2} |
| Titanium | 52 = 19 | 112 = 17 ^{1,2} | 62 = 15 | 15 = 15 | 7296 = 897 ^{1,2} | 1729 = 344 ¹ |
| Chromium | 12 = 6 | 17 = 2 | 10 = 4 | nd | 66 = 13 ^{1,2} | 43 = 16 ¹ |
| Manganese | 27 = 11 | 42 = 11 | 30 = 4 | 2 = 1 | 671 = 97 ^{1,2} | 189 = 16 ¹ |
| Iron | 361 = 105 | 945 = 92 ^{1,2} | 515 = 136 | 70 = 53 | 43492 = 4654 ^{1,2} | 12802 = 2094 ¹ |
| Cobalt | 7 = 1 | 10 = 4 | 117 = 7 ^{1,2} | 1 = 1 | 149 = 54 ^{1,2} | 34 = 1 |
| Nickel | nd | nd | nd | 1 = 0.1 | 18 = 7 ¹ | 27 = 11 ¹ |
| Copper | 3 = 1 | 3 = 1 | 2 = 1 | 1 = 0.1 | 76 = 18 ^{1,2} | 47 = 23 ¹ |
| Zinc | 7 = 4 | 14 = 4 | 8 = 7 | 2 = 1 | 223 = 35 ¹ | 234 = 91 ¹ |
| Arsenic | nd | nd | 38 = 13 ^{1,2} | 1 = 0.1 | 17 = 4 ^{1,2} | 8 = 4 |
| Bromine | 4 = 1 | 8 = 2 | 13 = 0.1 | 1 = 0.1 | 37 = 18 ^{1,2} | 12 = 2 |
| Zirconium | nd | nd | nd | 15 = 1 | 259 = 87 ¹ | 238 = 223 ¹ |

Fig 2. Elementos inorgânicos presentes em águas superficiais e intersticiais (sedimentos) em três locais de coleta no rio Jacuí (média \pm desvio padrão pela análise PIXE).

| Groups | Damage Index | Damage Frequency |
|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | (DI) | (DF) |
| Negative Control ¹ | 12.25 \pm 5.68 | 8.25 \pm 7.09 |
| Surface water | | |
| Site A | 55.50 \pm 31.96 ² | 30.33 \pm 17.32 ² |
| Site B | 73.83 \pm 45.86 ² | 35.00 \pm 21.08 ² |
| Site C | 82.00 \pm 44.29 ² | 42.50 \pm 20.05 ² |
| Interstitial water (sediment) | | |
| Site A | 51.67 \pm 35.40 ² | 27.00 \pm 15.56 ² |
| Site B | 59.33 \pm 29.07 ² | 32.83 \pm 16.13 ² |
| Site C | 71.67 \pm 42.35 ² | 39.50 \pm 16.23 ² |
| Positive Control ³ | 125.50 \pm 44.25 ² | 52.25 \pm 7.27 ² |

Fig 3. Análise de danos no DNA em células V79 tratadas com amostras de águas superficiais e intersticiais (sedimentos).

| Parameters | Negative Control ¹ | Surface water | | | Interstitial water (sediment) | | | Positive Control ³ |
|---------------------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | Site A | Site B | Site C | Site A | Site B | Site C | |
| Cell proliferation (1000 cells) | | | | | | | | |
| NDI | 1.78 \pm 0.07 | 1.83 \pm 0.04 | 1.73 \pm 0.02 | 1.81 \pm 0.03 | 1.76 \pm 0.02 | 1.69 \pm 0.03 | 1.78 \pm 0.92 | 1.83 \pm 0.04 |
| BN | 650.25 \pm 53.39 | 619.25 \pm 10.05 | 591.00 \pm 9.83 | 568.00 \pm 83.09 | 580.25 \pm 15.13 | 558.50 \pm 33.52 | 601.00 \pm 50.00 | 656.25 \pm 42.37 |
| DNA damage (1000 binucleated) | | | | | | | | |
| MN | 4.50 \pm 3.42 | 9.06 \pm 2.47 | 12.88 \pm 2.37 ¹ | 10.91 \pm 4.03 | 11.69 \pm 2.30 ¹ | 9.31 \pm 5.14 | 12.70 \pm 1.95 ¹ | 13.23 \pm 5.27 ¹ |
| NPB | 1.28 \pm 0.80 | 1.38 \pm 1.45 | 2.90 \pm 0.91 | 2.95 \pm 1.07 | 1.20 \pm 0.98 | 1.66 \pm 2.28 | 0.74 \pm 0.87 | 1.76 \pm 0.27 |
| NBUD | 0.79 \pm 0.92 | 1.26 \pm 1.48 | 2.76 \pm 0.20 | 2.03 \pm 1.63 | 0.62 \pm 0.83 | 1.66 \pm 0.84 | 1.91 \pm 0.68 | 1.25 \pm 1.04 |
| Cell death (1000 cells) | | | | | | | | |
| Apoptotic | 0.27 \pm 0.31 | 1.08 \pm 0.49 | 1.02 \pm 0.57 | 0.79 \pm 0.56 | 0.86 \pm 0.61 | 0.44 \pm 0.51 | 1.52 \pm 1.19 ¹ | 1.00 \pm 1.07 |
| Necrotic | 0.00 \pm 0.00 | 0.28 \pm 0.56 | 0.00 \pm 0.00 | 0.14 \pm 0.28 | 0.25 \pm 0.50 | 0.28 \pm 0.56 | 0.14 \pm 0.28 | 1.76 \pm 1.26 ¹ |

Fig 4. Detecção de frequência de micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (NPB), botões nucleares (NBUD), índice de divisão nuclear (NDI), binucleadas (BN), apoptose e necrose utilizando CBMN em células V79 expostas a amostras coletadas em águas superficiais e sedimentos.