

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

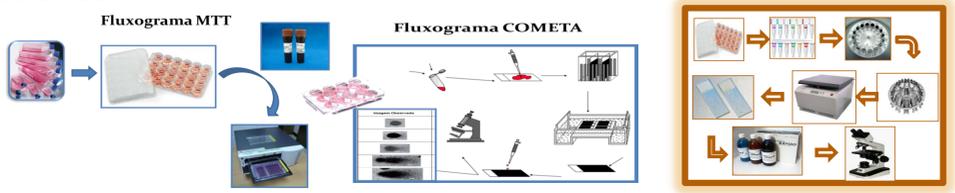
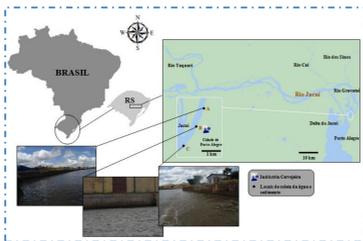
A contaminação da água possui diferentes fontes de poluição, sejam elas oriundas de descargas de efluentes, atividades agrícolas e esgotos domésticos. Efluentes de indústrias cervejeiras possuem altos níveis de matéria orgânica, fósforo, nitrogênio, elementos orgânicos e inorgânicos. Esta mistura complexa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

OBJETIVOS

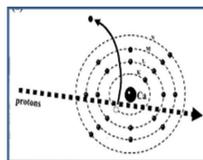
Esse estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade celular utilizando o ensaio colorimétrico de MTT ((3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)), a genotoxicidade e mutagenicidade através do Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleos em células de fibroblastos de pulmão de Hamster 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.

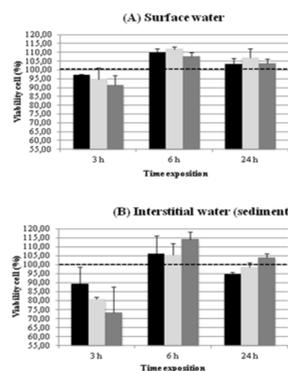


Fig 1. Avaliação da viabilidade das células V79 através do MTT após tratamentos com amostras em diferentes tempos. Os valores são a média \pm desvio padrão. Viabilidade celular percentual acima de 70%.

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
Aluminium	335 = 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 ¹	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 ²
		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.