



INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE ÁGUAS SUPERFICIAIS EM REGIÃO DE EXPLORAÇÃO E QUEIMA DO CARVÃO

Bruno Johann Savedra da Silva¹
Cynthia Silva Porta²
Mauricio Lehmann³
Juliana da Silva⁴
Rafael Rodrigues Dihl⁵

Resumo

A mineração do carvão, apesar de ser a mais abundante fonte de energia não renovável do país, também é responsável pelo lançamento de diversos contaminantes no ambiente, como os rejeitos piritosos que são os principais geradores das drenagens ácidas de mina, que se caracterizam pela elevação da acidez e concentração de metais pesados como o cádmio, chumbo, cobre, ferro, alumínio e zinco. Sendo assim, a extração e a utilização de carvão mineral são atividades potencialmente poluidoras e podem causar sérios impactos nos recursos hídricos. Diante disto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial mutagênico e citotóxico associado a amostras de águas superficiais impactadas pela mineração do carvão na cidade de Candiota-RS, por meio do Teste de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese (CBMN) na linhagem celular HepG2. Foram escolhidos quatro pontos de coleta de águas superficiais do Arroio Candiota, próximo a Usina Termelétrica Presidente Médici, nos períodos de inverno e verão. Após 20h de cultivo as células foram tratadas com as diferentes amostras de água, oriundas dos pontos de coleta. Nos resultados obtidos não foram observados aumentos significativos de micronúcleos, células apoptóticas e necróticas em relação ao controle negativo para os quatro pontos de coleta nos períodos de inverno e verão. Somado a isso, não foram observadas diminuições no índice de divisão nuclear entre os tratamentos e o controle negativo.

Palavras-chave: CBMN; HepG2; micronúcleos; poluição aquática.

INTRODUÇÃO

Dentre os contaminantes provenientes da atividade mineradora encontram-se os rejeitos piritosos que são os principais geradores das drenagens ácidas de mina (DAM) (AKCIL; KOLDAS, 2006) caracterizadas pela elevada acidez e expressiva concentração de metais pesados (BENASSI et al., 2006; LAUS et al., 2006). No Rio Grande do Sul, no município de Candiota, onde também se localiza a usina Termelétrica Presidente Médici, está inserida a maior jazida de carvão mineral do Brasil.

1 Aluno do curso de graduação em Ciências Biológicas da ULBRA – Bolsista PROBIC/FAPERGS – brunojohann94@gmail.com

2 Doutoranda no PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde - cynthiapor9@gmail.com

3 Professor do curso de graduação em Engenharia Ambiental e do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

4 Professora dos cursos de graduação em Ciências Biológicas e Biomedicina e do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

5 Professor dos cursos de graduação em Ciências Biológicas e Biomedicina e do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – rafael.rodrigues@ulbra.br

Apesar de ser um importante recurso energético, a extração, o beneficiamento e a utilização de carvão mineral são atividades potencialmente poluidoras (GAIVIZZO et al., 2002). Essas atividades causam impacto ao meio físico, como nos recursos hídricos, solo, subsolo, na qualidade atmosférica e biótica, como o desaparecimento da fauna e flora, emissões de gases tóxicos e de material particulado que causam danos aos seres vivos (BORTOT; ZIMALEXANDRE, 1995; POMPÊO et al., 2004).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos mutagênicos ocasionados por águas superficiais impactadas pela queima e extração do carvão na cidade de Candiota – RS, através do Teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN).

METODOLOGIA

Este estudo foi realizado no município de Candiota no Estado do Rio Grande do Sul. Os pontos de coleta foram escolhidos nas proximidades da Usina Termelétrica Presidente Médici, no curso do Arroio de Candiota, sendo o ponto nº 1 - antes da Usina; ponto nº 2 - em frente à Usina; nº 3 - aproximadamente 200 m após a Usina; ponto nº 4 - aproximadamente 5 Km após a Usina e próximo de uma antiga mina de carvão a céu-aberto.

As amostras de águas superficiais foram coletadas em dois períodos, verão e inverno, nos quatro pontos de coleta. De cada ponto foram coletados 2000 mL de água que foram armazenados em frascos apropriados, de acordo com EATON et al. (2005).

O teste de micronúcleos se baseia na identificação de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não estão integrados ao conjunto de cromossomos de uma célula, formando, assim, um pequeno núcleo individual, chamado micronúcleo (MN). O CBMN baseia-se no uso da citocalasina B (CIT-B) que é um agente inibidor da citocinese. O emprego da CIT-B resulta em um acúmulo de células binucleadas que passaram por apenas um ciclo de divisão. Havendo a formação de micronúcleos, eles também ficarão contidos no citoplasma. Desta forma, a análise dos micronúcleos em células binucleadas permite uma medida mais precisa da frequência de células micronucleadas, considerando que seria necessário analisar o dobro de mononucleadas para observar o mesmo nível de lesões detectadas em binucleadas (FENECH, 1997).

As células utilizadas foram as da linhagem HepG2 (hepatocarcinoma humano) oriundas do banco de células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² (TPP), contendo meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e antibiótico (combinado de estreptomicina e penicilina a 1% e gentamicina a 0,1%, ambos obtidos da Gibco) a 37°C em uma incubadora (Thermo Scientific) com 5% de CO₂.

Para a realização dos experimentos as células foram semeadas em placas para cultura celular com 24 poços (TPP), sendo adicionadas em cada poço aproximadamente 100.000 células. Desta maneira, após 20 h de cultivo, as células foram tratadas com meio DMEM, sem soro fetal bovino, contendo as amostras de água de cada ponto de coleta, além dos controles negativo (água destilada) e positivo (Benzo[a]Pireno). Após 24h em tratamento, as células foram lavadas com solução salina-fosfato (PBS), em seguida foi adicionado novo meio de cultura contendo CIT – B por mais 28h, totalizando 72h de incubação. Após este período, as células foram tripsinizadas, coletadas por citocentrifugação e fixadas em lâminas de vidro, coradas e analisadas em microscópio óptico com um aumento de 1000x.

Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata, sendo analisadas 1000 células por tratamento. O critério de seleção, assim como o de contagem de células binucleadas com micronúcleos foi definido de acordo com FENECH, 2007. O parâmetro utilizado para a avaliação da cinética celular foi o Índice de Divisão Nuclear (IDN), usando a

seguinte fórmula: $IDN = M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4) / NT$. Onde M1 - M4 representam o número de células com 1 - 4 núcleos e NT corresponde ao número total de células analisadas. Somado a isso, a contagem do número de células necróticas e apoptóticas foi realizada através da análise de um total de 500 células. A avaliação da ação mutagênica e citotóxica dos tratamentos ocorreu através da comparação dos diferentes pontos de coleta com o controle negativo e a comparação estatística foi feita através da análise da variância (one-way ANOVA) com teste *post hoc* de Dunnett para uma significância estatística $\alpha=0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que não houve diferenças significativas quanto à indução de micronúcleos em células HepG2, para os quatro pontos de coleta nos períodos de inverno e verão, quando comparados com o controle negativo. Somado a isso, não foram verificados aumentos significativos nas frequências de células apoptóticas e necróticas. Os valores de IDN dos tratamentos com as águas dos pontos de coleta não foram significativamente diferentes daqueles observados no controle negativo (Tabela 1).

Com base nestas informações, as amostras de água superficial avaliadas neste estudo não promoveram aumentos nas frequências de micronúcleos, apoptose e necrose no teste CBMN, na linhagem celular HepG2, após um tempo de exposição de 24 h nos dois períodos de amostragem, inverno e verão. O teste CBMN tem sido o método preferido para avaliar a indução de micronúcleos, que é um evento associado a quebras cromossômicas e/ou perda de cromossomos inteiros em cultura de células humanas. Somado a isso, a citotoxicidade pode ser representada pelo índice de divisão nuclear (IDN), que avalia os efeitos citostáticos induzidos pelas amostras de água, e pela análise das células apoptóticas e necróticas, que são indicativos de morte celular (FENECH, 2007).

Tabela 1: Média e desvio padrão obtidos por meio das análises mutagênica e citotóxica de amostras de água de superfície de quatro pontos de coleta (P1-P4) em células HepG2 no ensaio CBMN.

Controles	MN	BNMN	IDN	AP	NEC
CN	3,4±1,2	3,4±1,2	1,6±0,1	10,8±4,7	8,1±7,9
B[a]P (100µM)	12,1±3,1***	12,1±3,1***	1,3±0,0*	16,1±3,6*	15,1±4,0*
Amostras					
Inverno					
P1	4,3±3,9	4,3±3,9	1,6±0,1	12,6±4,9	8,7±3,5
P2	4,7±1,6	4,3±1,7	1,7±0,3	12,0±1,5	9,5±3,8
P3	4,8±1,9	4,8±1,9	1,7±0,2	10,5±2,3	8,9±4,1
P4	4,7±2,4	4,7±2,4	1,7±0,1	11,0±4,2	8,5±2,9
Verão					
P1	3,2±1,8	3,2±1,8	1,6±0,2	11,2±3,9	7,8±3,4
P2	4,6±1,5	4,6±1,5	1,7±0,1	11,3±2,7	8,0±4,0
P3	3,8±1,8	3,8±1,8	1,7±0,1	11,0±3,1	7,6±3,8
P4	4,3±3,6	4,3±3,6	1,7±0,2	10,9±2,7	8,2±4,7

CN: controle negativo. B[a]P: controle positivo. MN: micronúcleos. BNMN: células binucleadas micronucleadas. IDN: índice de divisão nuclear.

AP: apoptóticas. NEC: necróticas. *Significativamente diferente do CN (P<0,05). ***Significativamente diferente do CN (P<0,001).

Células HepG2 têm mostrado grande sensibilidade para a detecção de efeitos genotóxicos e citotóxicos de elementos orgânicos, em especial os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e aminas aromáticas e heterocíclicas (KNASMUELLER et al., 2004). Por outro lado, células HepG2 são pouco sensíveis à exposição a compostos inorgânicos, sendo que apenas o cádmio e o arsênio tiveram seus efeitos genotóxicos e citotóxicos demonstrados nesta linhagem celular (KNASMUELLER et al., 1998). De fato, a análise química das amostras de água apontou para a ausência de HAPs e presença de elementos inorgânicos (dados não mostrados). Neste sentido, os resultados negativos observados neste estudo podem estar associados à presença de elementos inorgânicos nas amostras de água e a baixa sensibilidade desta linhagem celular na detecção destes poluentes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda que o carvão e os subprodutos da sua queima estejam associados à indução de eventos mutagênicos, a maioria dos estudos foi realizada em mineradores (ROHR et al., 2013). Neste trabalho, amostras de água superficial coletadas em pontos próximos a UTPM em Candiota, região impactada pela exploração e queima do carvão, não foram capazes de induzir alterações cromossômicas e/ou citotoxicidade em células HepG2.

AGRADECIMENTOS

A FAPERGS pela concessão da bolsa PROBIC.

REFERÊNCIAS

- AKCIL, A.; KOLDAS S. Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, p. 1139-1145, 2006.
- BENASSI, J.C.; LAUS, R.; GEREMIAS, R. et al. Evaluation of remediation of coal mining wastewater by chitosan microspheres using biomarkers. **Arch of environ contam and toxicol**, v. 51, p. 633-40, 2006.
- BORTOT, A.; ZIM-ALEXANDRE. Programa de proteção e melhoria da qualidade ambiental da bacia do rio Tubarão e complexo lagunar. **Revista Tecnologia Ambiente**, v 1, p. 55-74, 1995.
- EATON, A.D.; CLESCERI, L.S.; RICE, E.W. et al. American water works association. Standard methods for examination of water and wastewater 21.th. Washington: **American Public Health Association**. 2005.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**. v. 2, p. 1084-1104, 2007.
- FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**. v. 392, p. 11-8, 1997.

GÁBELOVÁ, A.; VALVOVICOVÁ, Z.; HORVÁTHOVÁ, E. et al. Genotoxicity of environmental air pollution in three European cities: Prague, Kosice and Sofia. **Mutation Research**. v. 563, p. 49-59, 2004

GAIVIZZO, L.B.; VIDOR, C.; TEDESCO, M.J. Recuperação de áreas utilizadas para depósitos de rejeitos de minas de carvão. In: Centro de Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Carvão e meio ambiente**. Porto Alegre: Editora da Universidade. p. 480-91, 2002.

KNASMÜLLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S. et al. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Toxicology**. v. 198, p. 315–328, 2004.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R. et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**. v. 402, p. 185–202, 1998.

POMPÊO, M.L.M.; MOSCHINI-CARLOS, V.; ALEXANDRE, N.Z. et al. Qualidade da água em região alterada pela mineração de carvão na microbacia do rio Fiorita (Siderópolis, Estado de Santa Catarina, Brasil). *Acta Scientiarum*. **Bio Sciences**. v. 26, p.125-36, 2004.

SIMSIMAN, G.V.; CHESTERS, G.W. Effect of ash disposal ponds on groundwater quality at a coal fired power plant. **Water Research**. v. 21, p.417, 1987.