



AValiação DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE, MUTAGENICIDADE IN VITRO DO CORANTE AZO AMIDO BLACK 10

Amanda Souza Scotti¹, Crislaine M. C. da Cruz Brambilla², Juliana da Silva³.

INTRODUÇÃO

Do ponto de vista ambiental, os corantes apresentam um grande potencial de poluição, dados seus elevados consumos em processos de coloração juntamente com a adição de aditivos. O corante Amido Black 10B está entre os corantes mais utilizados em todo o mundo em indústrias como têxteis, curtimento e gráficas. Devido à falta de dados toxicológicos sobre o corante azo Amido Black 10B, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade do mesmo para induzir danos em células HepG2 através do Teste MTT, Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo.

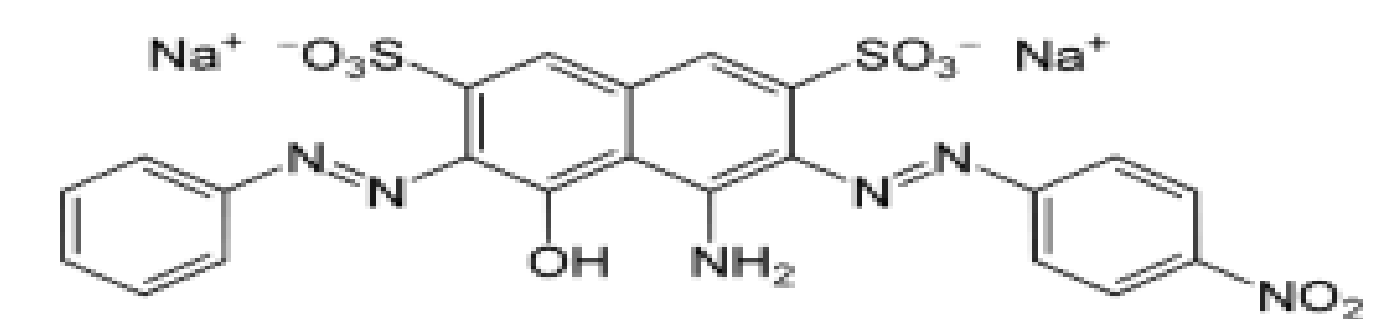


Figura 1: Estrutura química do corante Amido Black 10B.

METODOLOGIA

As células HepG2 foram mantidas em meio DMEM High Glucoso, suplementadas com soro fetal bovino (10%), e mantidas a 37°C em com CO₂ a 5%. Para o Ensaio de MTT as células foram expostas durante 3h a sete concentrações diferentes de Amido Black 10B (0,03125 mg/mL- 1 A 2 mg/mL- 1) e após foram incubadas com solução de MTT. A suspensão foi lida no espectrofotômetro e a densidade óptica (OD). Para o Ensaio Cometa as células Hep G2 advindas do cultivo celular são expostas ao Azo corante Amido Black 10B por 3 horas. As lâminas são preparadas, levadas a solução lise. Após levadas a eletroforese. Então as lâminas são neutralizadas, fixadas e coradas com nitrato de prata. O Teste de Micronúcleos consiste na inserção da amostra exposta ao corante, advinda da Cultura celular na Citocentrífuga, por 5 minutos à 700 RPMs. Após as lâminas são coradas e então analisadas. Nas análises são verificadas as divisões celulares (mono, bi, tri e poli celulares) e os danos celulares: Micronúcleos, Brotos Celulares (BUD) e as Pontes nucleares. Além de morte celular: Apoptose e Necrose.

RESULTADOS:

Os resultados para o Teste MTT indicam que nenhuma das concentrações conduz a uma citotoxicidade elevada, um vez que todas as doses mostraram viabilidade celular acima de 70% (Figura 2).

Os resultados para o Teste de Cometa expostas as concentrações de Amido Black 10B expressas em Índice de Danos (DI) e Frequência de Danos (DF), apresentaram-se significativas em relação ao controle negativo em DI e DF (Figura 3).

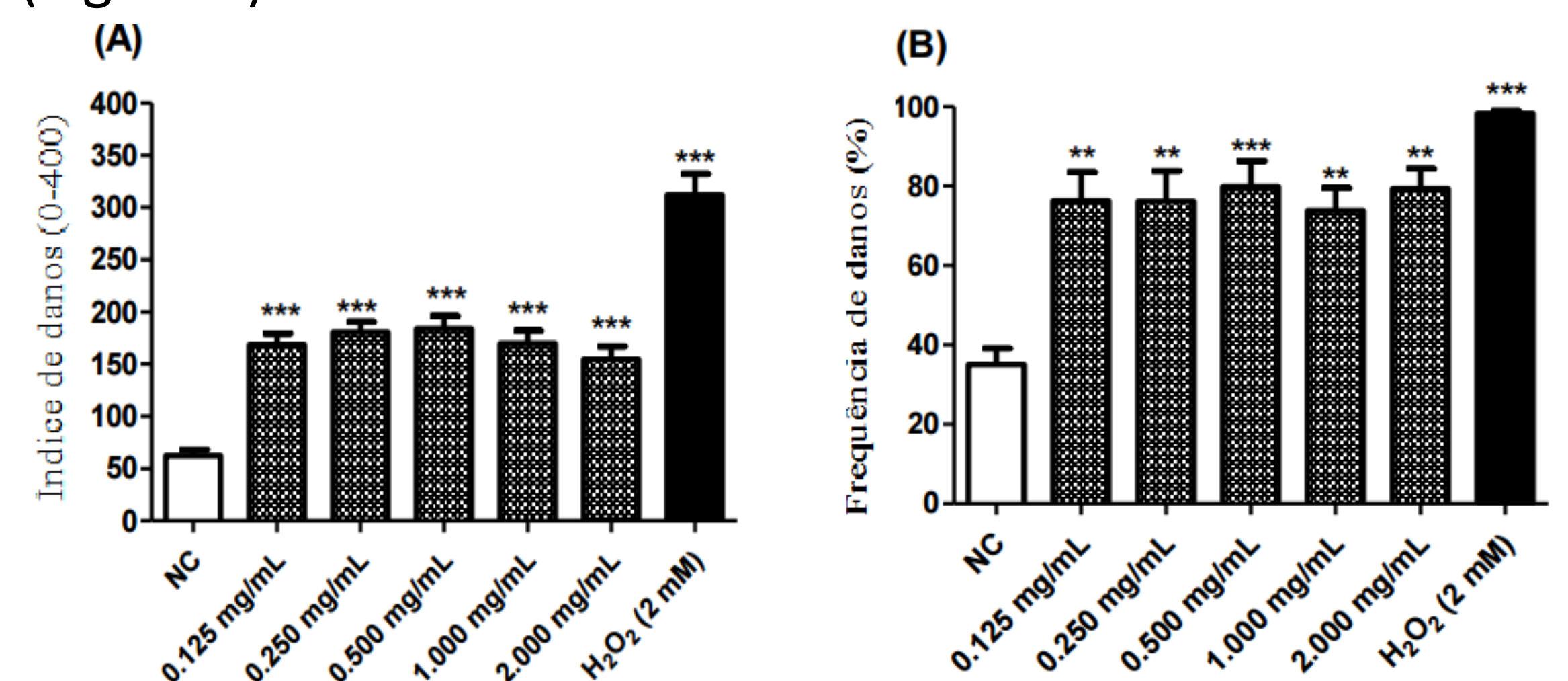


Figura 3: Genotoxicidade para HepG2 exposta a diferentes concentrações de Amido Black 10B. *** p <0,001, significativamente diferente em relação ao controle negativo.

Para o Ensaio Micronúcleo foram analisadas frequência de Micronúcleos (MN), Pontes celulares (NPB) e brotos nucleares (BUD). Analisada a proliferação pelo índice de divisão nuclear (NDI). Necrose e apoptose. O teste MN demonstrou que houve aumento significativo de danos ao DNA através do aumento de MN nas 2 concentrações maiores, mas não se observou aumento de morte celular para qualquer das concentrações testadas em células HepG2.(Tabela 1).

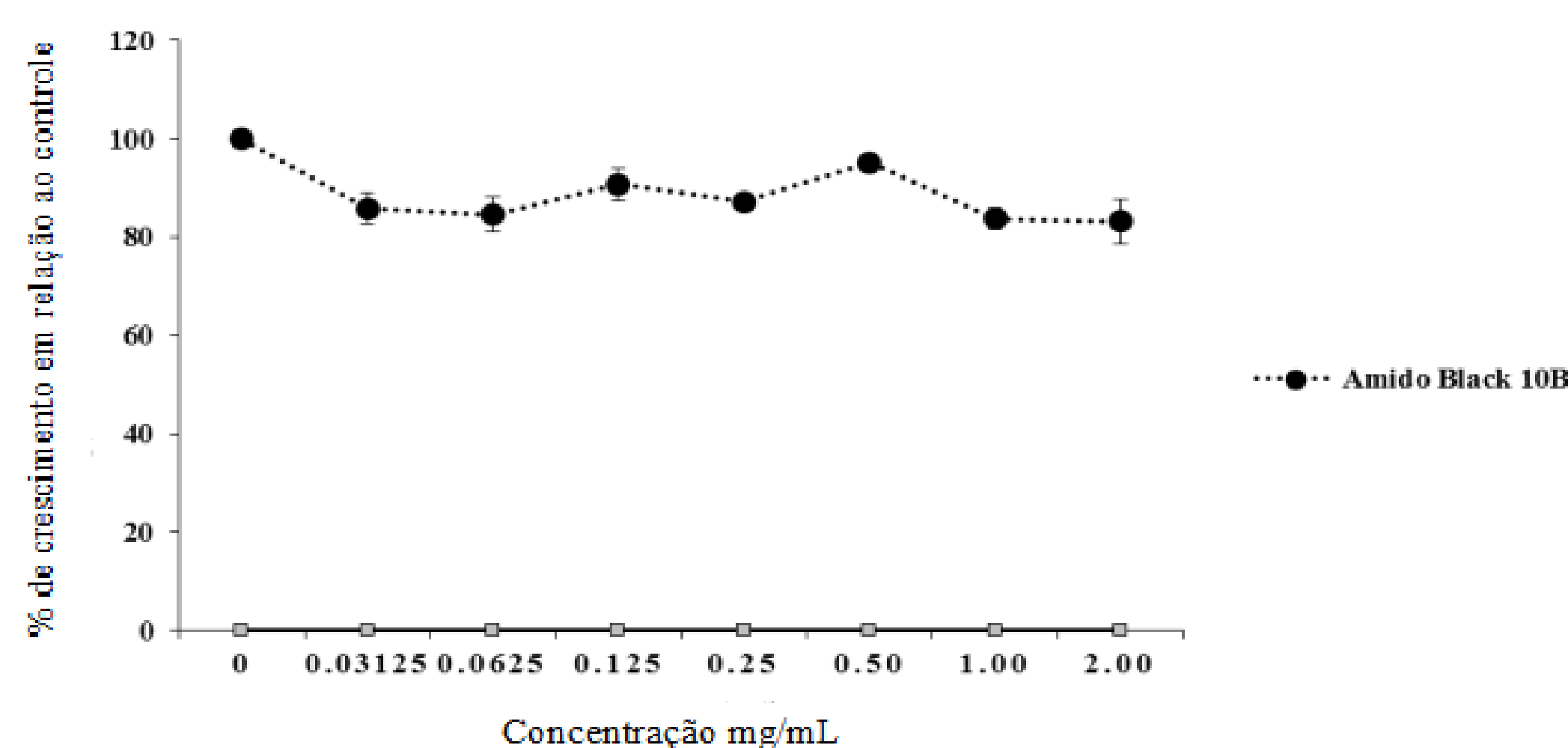


Figura 2: Citotoxicidade de Amido Black 10B em células HepG2 por Ensaio MTT.

Parâmetros	Controle Negativo ^a	Concentração					Controle Positivo
		2.0 mg/ml	1.0mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/ml	0.125mg/ml	
Proliferação celular (1000 células)							
NDI	1.33 ± 0.19	1.17 ± 0.07	1.19 ± 0.05	1.31 ± 0.15	1.34 ± 0.16	1.31 ± 0.16	1.22 ± 0.10
BN	306.30 ± 181.10	140.80 ± 53.80	163.80 ± 30.20	273.80 ± 129.60	309.50 ± 155.20	299.30 ± 157.90	201.50 ± 104.10
Danos ao DNA (1000 binucleadas)							
MN	1.75 ± 0.50	8.50 ± 5.80	5.75 ± 5.50	6.25 ± 2.87	3.75 ± 2.50	3.00 ± 0.82	12.50 ± 4.35*
NPB	2.00 ± 0.82	9.75 ± 9.74	3.75 ± 2.50	2.50 ± 3.00	4.00 ± 3.16	2.00 ± 0.81	4.25 ± 4.57
NBUD	3.50 ± 2.51	16.75 ± 9.98	9.25 ± 6.50	10.75 ± 9.57	8.25 ± 7.09	5.75 ± 2.87	19.00 ± 4.24*
Morte celular (1000 células)							
Apoptose	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.58	0.75 ± 0.96	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50
Necrose	1.00 ± 1.41	0.50 ± 1.00	1.50 ± 1.29	1.75 ± 1.71	1.00 ± 0.82	0.50 ± 0.58	0.25 ± 0.50

^a Meio de Cultura; ^b Benzo [a] pireno (10µL); * Significativo de P <0,05 em relação ao controle negativo.

Tabela 1: Detecção de Frequência de Micronúcleos (MN), Pontes Nucleares (NPB), Botões Nucleares (NBUD), Divisão Nuclear(NDI), Células Binucleadas (BN), Células Apoptóticas e Necróticas em Ensaio com culturas de células HepG2.

CONCLUSÃO

Os dados gerados nesta pesquisa indicam que o corante Amido Black 10B apresenta efeitos genotóxicos em células de mamíferos na sua forma pura. Esse corante pode estar parcialmente relacionado com a toxicidade observada nos estudos realizados com animais e com linhagens celulares expostos a efluentes de indústrias gráficas, de couro e têxtil que utilizam corantes azo em seus processos de tingimento. No entanto, mais estudos voltados aos corantes azo são necessários a fim de que se possa estabelecer critérios para o descarte seguro desses xenobióticos.