



Avaliação da atividade citotóxica em cultura de células das águas do Rio Chopim

Evaluation of cytotoxic activity in culture of cells from the Waters of the Chopim River

Isadora Dalsente Andrigues¹, Anna Gabriela Drummond Xavier Teles², Patricia Aline Bressiani³, Rodrigo Lingnau⁴, Elisângela Düsman⁵

RESUMO

A crescente degradação ambiental trouxe à tona novas perspectivas de planejamento e manejo dos cursos hídricos no Brasil, tendo em vista a cautela em relação a problemas que podem acometer a qualidade da saúde humana. Portanto, esse estudo buscou analisar a atividade citotóxica das águas e dos sedimentos do Rio Chopim, dentro e fora da Unidade de Conservação Refúgio de Vida Silvestre de Palmas. Foram coletadas amostras de três nascentes (N1, N2 e N3) e de quatro pontos do Rio Chopim (P1, P2, P3 e P4). Foi utilizado como sistema-teste as células hepáticas humanas, linhagem HuH7.5, submetidas às concentrações de 1:10, 1:100 e 1:1000 das águas do Rio ou da solução extraída dos sedimentos, pelo teste do MTT. Para as amostras de água, o P3 (1:10) e a N1 (1:100) apresentaram alterações nas divisões celulares. Para as amostras de sedimento, a concentração de 1:10 das nascentes 1 e 2 resultou em estresse celular. Estes resultados podem ser justificados pela presença de diferentes poluentes nas amostras avaliadas. Por fim, essa análise é suma importância para realizar o biomonitoramento das águas das nascentes, pois é um parâmetro para evitar a intensificação destes danos.

PALAVRAS-CHAVE: bioindicadores, poluição ambiental, teste do MTT.

ABSTRACT

Growing environmental degradation has led to new perspectives on the planning and management of watercourses in Brazil, in view of the need for caution in relation to problems that can affect the quality of human health. Therefore, this study sought to analyze the cytotoxic activity of the waters and sediments of the Chopim River, inside and outside the Palmas Wildlife Refuge Conservation Unit. Samples were collected from three springs (N1, N2 and N3) and four points on the Chopim River (P1, P2, P3 and P4). The test system used was human liver cells, strain HuH7.5, subjected to concentrations of 1:10, 1:100 and 1:1000 of the river water or the solution extracted from the sediments, using the MTT test. For the water samples, P3 (1:10) and N1 (1:100) showed changes in cell division. For the sediment samples, the 1:10 concentration of springs 1 and 2 resulted in cell stress. These results can be explained by the presence of different pollutants in the samples evaluated. Finally, this analysis is extremely important for biomonitoring spring waters, as it is a parameter for preventing the intensification of this damage.

KEYWORDS: bioindicators, environmental pollution, MTT test.

¹ Bolsista Recursos Próprios UTFPR-FB. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: isadalsente@gmail.com. ID Lattes: 9206475473477935.

² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: annateles@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 5949876840504948.

³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: pbressiani@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 6244294104014856.

⁴ Docente no Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: rodrigolingnau@utfpr.edu.br. ID Lattes: 2657881579905943.

⁵ Docente no Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: edusman@utfpr.edu.br. ID Lattes: 08342282115894459.



INTRODUÇÃO

A crescente degradação ambiental trouxe à tona novas perspectivas de planejamento e manejo dos cursos hídricos no Brasil, tendo em vista a cautela em relação aos problemas que podem acometer a qualidade da saúde humana. É válido ressaltar que uma estratégia eficaz para a redução de danos causados pela ação antrópica é a proteção das nascentes e da vegetação nativa. Nesse contexto de preservação, destacam-se as unidades de conservação (UC), como o Refúgio de Vida Silvestre de Palmas (RVS-CP). Este refúgio é localizado no Paraná, responsável pela fiscalização integral da natureza existente nos municípios de General Carneiro e Palmas (STRAPAZZON e MELLO, 2015) e, nele estão presentes as nascentes da bacia hidrográfica do Rio Chopim, juntamente com propriedades familiares que exercem práticas de cultivo, as quais fazem uso de fertilizantes e agrotóxicos (STRAPAZZON, 2015).

As características e o bem-estar dos corpos d'água são diretamente afetados devido à contaminação causada pelos resíduos trazidos com a chuva e irrigação nessas áreas, trazendo à tona diversas nocividades à fauna e à flora local (FILIZOLA et al., 2006).

Desta forma, é imprescindível que se tenha o desenvolvimento de técnicas para avaliação da qualidade dos recursos, a fim de mensurar estas irregularidades. Dentre elas, destacam-se os testes de citotoxicidade. A citotoxicidade *in vitro* consiste no contato entre uma amostra e a cultura de células, tendo como finalidade indicar os padrões de toxicidade baseando-se na proliferação ou morte das mesmas (HE et al., 2020). Junto a esse ensaio, o MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolin] é frequentemente usado por ser um método versátil e de fácil acesso, sendo sua função constatar a toxicidade de uma substância analisando o crescimento, viabilidade e metabolismo celular por meio da redução do sal amarelo solúvel para um produto formazan roxo insolúvel (MOSMANN, 1983).

Á vista disso, esse estudo buscou analisar a atividade citotóxica das águas e dos sedimentos do Rio Chopim, tanto dentro quanto fora do Refúgio de Vida Silvestre de Palmas, em cultura de células hepáticas humanas, linhagem HuH7.5.

METODOLOGIA

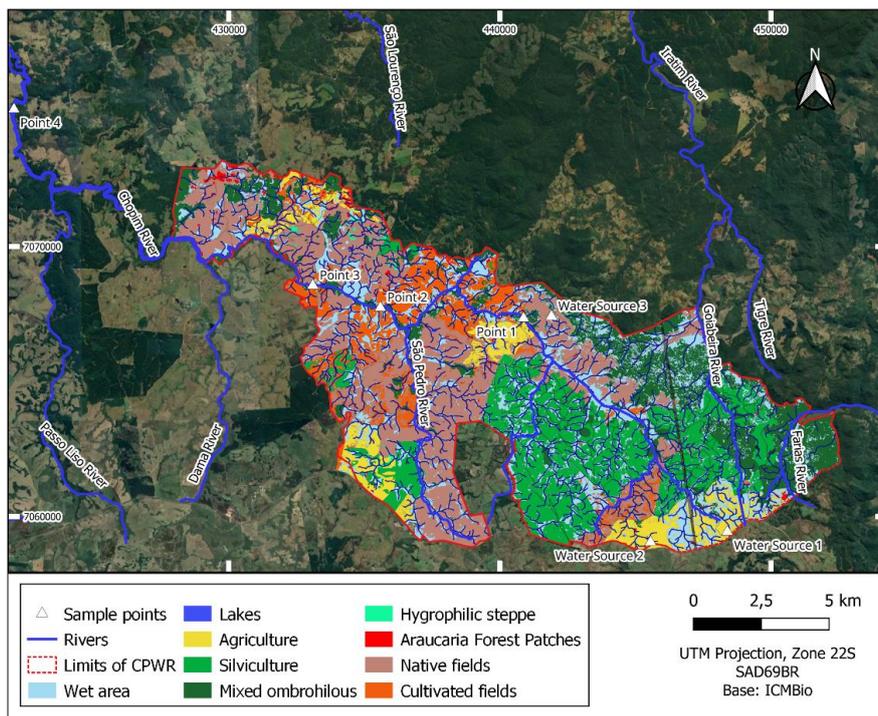
PONTOS DE COLETA

As amostras de água e sedimentos foram coletadas dentro dos limites do RVS-CP e no seu entorno. As amostras foram coletadas em sete pontos ao longo do Rio Chopim: Nascentes 1 (N1), 2 (N2) e 3 (N3) e Pontos 1 (P1), 2 (P2) 3 (P3) – dentro do RVS-CP, sendo o P3 pouco antes do limite da Unidade – e Ponto 4 (P4) – localizado fora dos limites do RVS-CP (Figura 1). O Ponto 1 está em um local com predominância de ocupação do solo por campo nativo e cultivo agrícola. O Ponto 2 é cercado por área de campo nativo e pastagens, sendo que em uma das margens é possível observar mata ciliar típica (mata de galeria). O Ponto 3 está bem próximo à área habitada por uma família e, no entorno, há área de pastagem, campo nativo e mata ciliar típica. No Ponto 4 observou-se áreas com campo nativo, floresta com presença de araucárias e cultivo de pinus.

A Nascente 1 está situada em uma área de campo, com gramíneas nativas e pouco alteradas. Nessa região há presença de cursos de água com cerca de 50 cm de largura escondidas em meio à vegetação e num raio de aproximadamente 200 m há uma área de

reflorestamento com pinus. A Nascente 2 está próxima a lavouras de plantio de batata. Essa nascente está totalmente antropizada, com solo revolvido e nas proximidades foi feito um pequeno barramento para construção de uma estrada, deixando uma canalização para a água escoar. Nesse ponto também foram encontrados galões de agroquímicos vazios. A Nascente 3 é uma área alagada de baixo gradiente topográfico. No seu entorno pode-se observar presença de áreas de silvicultura, campos nativos e pastagens, sendo que no ponto onde foi realizada a coleta existe uma pequena barragem.

Figura 1 – Localização dos pontos de coleta de água e sedimento do Rio Chopim e limites do RVS-CP.



Fonte: Autoria própria.

ATIVIDADE CITOTÓXICA

O ensaio de citotoxicidade do MTT foi realizado de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações. As células HuH7.5 foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm², contendo 10 mL de meio de cultura DMEM, suplementado com 15% de soro bovino fetal e incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

Para o tratamento foram utilizadas placas de cultura de 96 poços, onde foram cultivadas 1x10⁵ células/poço. Após estabilização por 24 horas, o meio de cultura foi descartado e em seguida, adicionado 100 µL de meio completo com os seguintes tratamentos: meio de cultivo (controle negativo: CO-), agente citotóxico metil metanosulfonato (MMS – 150 µM), (controle positivo: CO+) e tratamentos com as concentrações de 1:10, 1:100 e 1:1000 (v/v, amostra/meio) das amostras filtradas de água e de sedimento do Rio Chopim. O sedimento foi preparado utilizando 250 gramas de cada sedimento para 1000 mL de água destilada, sendo agitado mecanicamente por 5 minutos e deixado em repouso por sete dias. Após esse período, fez-se a remoção dos sólidos grosseiros e a filtração do sobrenadante para a obtenção do extrato do sedimento.



Após 24 h, 48 h e 72 h de incubação, o tratamento foi substituído por meio de cultura contendo de MTT (0,167 mg/mL) (4 horas), seguido da adição de 100 µL de dimetilsulfóxido para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitora de microplacas (Thermo Plate) a 490 nm utilizando o espectrofotômetro UV-Vis. A análise estatística foi realizada pelo teste de normalidade e ANOVA, seguida do teste de comparação de médias de Dunnet ($\alpha = 0,05$; $p < 0,05$; $n = 4$), por meio software Action 6.2.

Os percentuais de viabilidades celulares foram calculados pela razão da absorbância média do tratamento pelo controle negativo.

RESULTADO E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos da Tabela 1 representam o percentual de viabilidade celular para as amostras de água e sedimento do Rio Chopim.

Tabela 1 - Percentual de viabilidade de células (VC) HuH7.5 tratadas com as amostras de água e sedimento do Rio Chopim, por 24 h, 48 h e 72 h, pelo teste do MTT.

Grupos	Água			Sedimento		
	24 h	48 h	72 h	24h	48h	72h
CO-	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
CO+	62,41*	47,01*	30,24*	12,92*	48,13*	0,00*
P1 1:10	79,20	109,93	88,81	81,04	73,83	83,23
P1 1:100	98,19	135,83	105,22	102,26	77,42	89,20
P1 1:1000	102,01	121,47	85,37	86,76	81,63	80,44
P2 1:10	89,25	112,12	90,06	77,65	69,04	76,95
P2 1:100	83,75	130,44	88,04	145,34	76,64	90,06
P2 1:1000	86,13	121,65	89,88	85,17	90,01	85,76
P3 1:10	89,52*	130,26	98,30	130,93	75,86	73,72
P3 1:100	133,87	68,34	102,63	100,53	91,83	71,90
P3 1:1000	89,65	106,14	104,17	89,30	90,32	79,20
P4 1:10	102,24	89,00	105,93	130,19	80,19	70,39
P4 1:100	99,90	127,39	99,05	85,81	144,22	76,73
P4 1:1000	103,22	124,58	104,43	118,01	84,18	86,19
N1 1:10	101,51	97,61	103,24	225,21*	77,26	81,30
N1 1:100	104,12	148,15*	103,87	109,75	92,56	85,06
N1 1:1000	93,97	108,55	91,30	95,66	80,65	79,10
N2 1:10	94,97	94,80	91,13	301,69*	84,29	103,06
N2 1:100	115,18	125,18	109,49	96,08	91,78	97,74
N2 1:1000	120,00	100,72	124,62	95,55	84,24	86,03
N3 1:10	92,86	111,18	112,53	84,32	88,24	85,81
N3 1:100	87,74	110,89	98,18	93,50	74,40	83,99
N3 1:1000	113,27	101,75	113,60	90,78	83,77	85,49

CO-: Controle negativo; CO+: Controle positivo; P1: Ponto 1; P2: Ponto 2; P3: Ponto 3; P4: Ponto 4; N1: Nascente 1; N2: Nascente 2; N3: Nascente 3.

*Resultado estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria



Para as amostras de água, a análise estatística mostrou que somente a concentração de 1:10 do P3 (último ponto ainda dentro dos limites do RVS-CP) no tempo de 24 horas e a concentração de 1:100 da N1 (nascente 1) apresentaram absorvâncias médias diferentes das do controle negativo. No caso do P3 a viabilidade celular foi reduzida para 89,52%, com indicativo de citotoxicidade. De acordo com Teles (2023), o P3 apresentou valores de pH (5,98), oxigênio dissolvido (4,12 mgO₂/L), cor (124,96 mgPtCo/L) e demanda bioquímica de oxigênio (5,95 mgO₂/L) fora dos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005 para a Classe 2 de águas doces (BRASIL, 2005), além da presença do pesticida Tebuconazol (0,017 mg/kg).

Para a N1 (nascente 1) observou-se um estímulo da proliferação celular para 148,15%. Este aumento da viabilidade celular observado somente no tempo de 48 horas para a N1 pode ter sido causado pelo estresse provocado pelos componentes presentes nas amostras, considerando que as células, com o intuito de se defenderem, iniciam um processo de divisão celular. Teles (2023) identificou na N1 concentrações dos hormônios estrona (0,805 mg/L) e etinilestradiol (0,099 mg/L), além dos valores de oxigênio dissolvido (4,250 mgO₂/L) e demanda bioquímica de oxigênio (6,596 mgO₂/L) estarem fora do padrão estabelecido na legislação.

Com relação as células HuH7.5 tratadas com as diferentes concentrações das amostras de sedimentos do Rio Chopim pode-se observar que a concentração de 1:10 das amostras das nascentes 1 (N1) e 2 (N2) apresentaram absorvâncias médias estatisticamente maiores e diferentes do controle negativo, no tempo de 24 horas. As viabilidades celulares foram de 225,21% (N1) e 301,69% (N2). Novamente, como observado para a amostra de água da N2, é possível que este aumento da proliferação celular seja devido ao estresse causado pela exposição destas células aos poluentes. De acordo com Teles (2023) os sedimentos das nascentes 1 e 2 apresentaram elevado teor de zinco, acima do limite estabelecido pela legislação do CONAMA No 454/2012 (BRASIL, 2012).

CONCLUSÃO

Com base no estudo realizado, conclui-se que nas amostras de água o ponto 3 [1:10] e a nascente 1 [1:100] demonstraram percentuais de absorvância média diferentes do controle negativo. Para as amostras de sedimentos, as Nascentes 1 e 2 nas concentrações [1:10] expressaram altas taxas de viabilidade celular. É notável, através dos resultados obtidos, que a presença de práticas de cultivo com o uso de agrotóxicos e pesticidas dentro e nos entornos do RVS-CP, prejudica diretamente o bem-estar das águas do Rio Chopim, o que causa diversos danos a fauna e flora local, além de efeitos nocentes à saúde humana. Cabe ressaltar também, que este tipo de análise é suma importância para realizar o biomonitoramento de nascentes, tendo em vista que é um parâmetro para evitar uma futura intensificação destes malefícios e alertar sobre o assunto.

Agradecimentos

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), em especial ao Câmpus Francisco Beltrão, pela bolsa de Iniciação Científica, aos Novos Arranjos de Pesquisa e Inovação (NAPI-SUDOESTE), à Fundação Araucária e Fundação Grupo Boticário, pelo



apoio do Projeto Águas dos Campos de Palmas e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela Bolsa Produtividade concedida à Profa. Dra. Elisângela Düsman (CNPq#305029/2022-3).

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 454**, de 1º de novembro de 2012. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2012/res_conama_454_2012_materia_ser_dragado_em_aguas_jurisdicionais_brasileiras.pdf>.

BRASIL. RESOLUÇÃO Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento [...]**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 02 de set. 2021.

FILIZOLA, H.F.; GOMES, M.A.F.; SOUZA, M.D. **Manual de procedimentos de coleta de amostras em áreas agrícolas para análise da qualidade ambiental: solo, água e sedimentos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006.

HE, H; LUO, N; HUANG, B; LI, B; ZHANG, Z; XU, Z; PAN, X. Optical characteristics and cytotoxicity of dissolved organic matter in the effluent and sludge from typical sewage treatment processes. **Science of The Total Environment**, v. 725, 138381, 2020.

MOSMANN, T. Ensaio colorimétrico rápido para crescimento e sobrevivência celular: aplicação a ensaios de proliferação e citotoxicidade. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, ed. 1–2, p. 55-63, 1983.

STRAPAZZON, M.C.; MELLO, N.A. Um convite à reflexão sobre a categoria de Unidade De Conservação Refúgio de Vida Silvestre. **Ambiente e Sociedade**, v. 18, n. 4, p. 161-178, 2015.

STRAPAZZON, M.C. **Reflexões acerca das racionalidades em Unidades de Conservação: o caso do Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas**. 2015. 157 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

TELES, AGDX. **Avaliação da ecotoxicidade das águas e dos sedimentos do Rio Chopim no Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas e seu entorno**. 2023. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão.