

## Avaliação da atividade citotóxica em cultura de células das águas de Rios de Francisco Beltrão-PR

### Evaluation of cytotoxic activity in cell culture from the waters of the Francisco Beltrão Rivers-PR

Mariah Pereira Rosa da Silva<sup>1</sup>, Patricia Aline Bressiani<sup>2</sup>, Ana Paula de Oliveira Schmitz<sup>3</sup>, Eduardo Michel Vieira Gomes<sup>4</sup>, Elisângela Düsman<sup>5</sup>

#### RESUMO

A qualidade da água é um dos maiores desafios mundiais. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar a citotoxicidade das águas do Rio Marrecas, da foz do Rio Lonqueador e da foz do Rio Urutago, coletadas em alta vazão (após um evento chuvoso), além da água de uma residência abastecida pelas águas do Rio Marrecas, tratada pela Estação de Tratamento de Água do Município de Francisco Beltrão. Foi utilizado o teste do MTT com células de fígado humano (Huh7.5). A análise estatística mostrou que a maior concentração [1:10] (72 horas) do ponto 3 (localizado na região central da cidade) e as concentrações de [1:100] e [1:1000] (24 horas) do ponto 8 (água tratada pela ETA) apresentaram atividade proliferativa, com viabilidade celulares de 163,16%, 131,66 e 131,95%, respectivamente. Somente a menor concentração [1:1000] (48 horas) do ponto 5 (foz do Rio Urutago) apresentou atividade citotóxica, com viabilidade celular de 52,33%. Estas alterações possuem correlação com a presença de hormônios estrogênicos e do agroquímico 2,4D nas amostras. Assim, os principais fatores para a progressiva degradação dos Rios de Francisco Beltrão são os rejeitos agrícolas, industriais e domésticos descartados erroneamente, visto que as alterações mais significativas foram de caráter antrópico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Água; citotoxicidade; cultura celular.

#### ABSTRACT

Water quality is one of the world's biggest challenges. Therefore, the objective of this study was to evaluate the cytotoxicity of the waters of the Marrecas River, the mouth of the Lonqueador River and the mouth of the Urutago River, collected at high flow (after a rainy event), and the water of a residence supplied by the waters of the Marrecas River, treated by the Water Treatment Plant of the Municipality of Francisco Beltrão. The MTT test with human liver cells (Huh7.5) was used. The statistical analysis showed that the highest concentration [1:10] (72 hours) of point 3 (located in the central region of the city) and the concentrations of [1:100] and [1:1000] (24 hours) of point 8 (water treated by WTP) showed proliferative activity, with cell viability of 163.16%, 131.66 and 131.95%, respectively. Only the lowest concentration [1:1000] (48 hours) of point 5 (mouth of the Urutago River) showed cytotoxic activity, with cell viability of 52.33%. These changes correlate with the presence of estrogen hormones and the agrochemical 2,4D in the samples. Thus, the main factors for the progressive degradation of the Francisco Beltrão Rivers are agricultural, industrial and domestic waste discarded erroneously, since the most significant changes were anthropic.

**KEYWORDS:** Water, cytotoxicity; cell culture.

<sup>1</sup> Bolsista da Fundação Araucária, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: mariahrosae@gmail.com. ID Lattes: 0913936358448698.

<sup>2</sup> 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.

<sup>3</sup> Docente no Departamento Acadêmico de Engenharia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: anapoliveira@utfpr.edu.br. ID Lattes: 1398449639185785.

<sup>4</sup> Docente no Departamento Acadêmico de Física, Estatística e Matemática. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: eduardogomes@utfpr.edu.br. ID Lattes: 7293677011271209.

<sup>5</sup> 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

Apesar das leis que garantem a qualidade dos recursos hídricos, a poluição, a destruição de habitats e a perda de biodiversidade ameaçam os rios em todo o mundo, devido ao descarte inadequado de resíduos prejudiciais, que podem liberar poluentes nas águas (CARVALHO et al., 2002).

Entre 2014 e 2019 Francisco Beltrão enfrentou aproximadamente 89 desastres hidrológicos (CAPRARIO et al., 2017), com destaque para o Rio Marrecas, apresentando riscos de inundação (FARIAS, 2019). Além disso, o rápido crescimento populacional e desenvolvimento urbano transformaram a cidade em uma das mais populosas do Paraná, causando a degradação dos rios, devido à perda de mata ciliar, habitações precárias e descarte de detritos no leito dos rios (SALDARRIAGA-HERNANDEZ, 2020).

Assim, é crucial avaliar a qualidade da água dos rios, por análises físico-químicas (BIANCHI et al., 2019) e testes ecotoxicológicos. Ensaios *in vitro* de ecotoxicidade detectam substâncias prejudiciais, como agroquímicos, metais pesados, hormônios e outros contaminantes (OHE et al., 2004).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar citotoxicidade das águas do Rio Marrecas, da foz do Rio Lonqueador e da foz do Rio Urutago, coletadas em alta vazão, além da água de uma residência abastecida pelas águas do Rio Marrecas, tratadas pela Estação de Tratamento de Água do Município de Francisco Beltrão, por meio do teste do MTT com células de fígado humano (Huh7.5).

## METODOLOGIA

### *Caracterização do local de estudo*

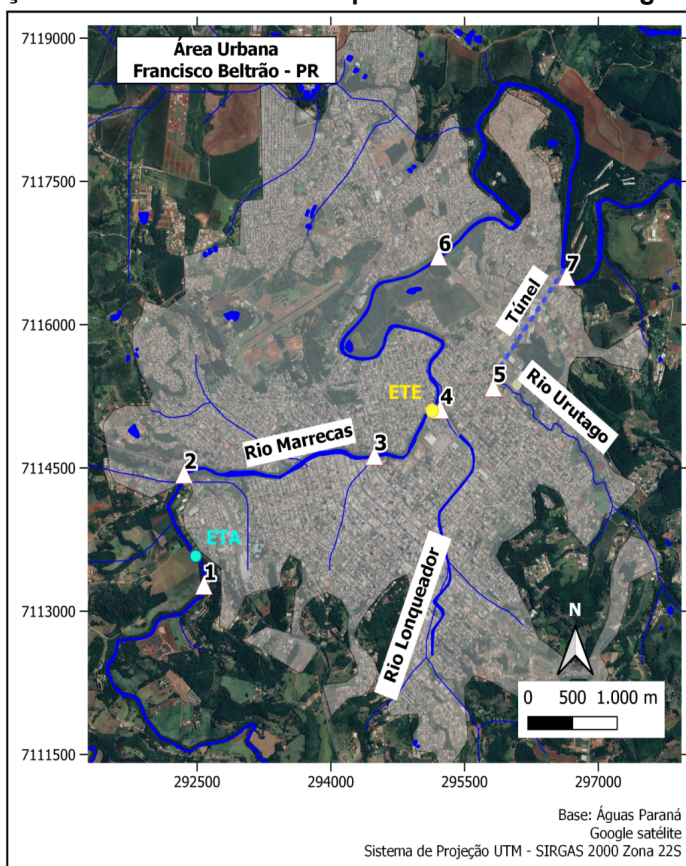
As amostras foram coletadas durante a alta vazão ( $254,12 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ) do Rio Marrecas, após um período chuvoso.

O ponto 1 de coleta está localizado no Rio Marrecas (Figura 1) próximo a Lacto no bairro Marrecas, antes da captação da Estação de Tratamento de Água do município. O ponto 2, localizado no Rio Marrecas, encontra-se sob a ponte na Avenida Duque de Caxias. A área tem tráfego de veículos, casas e vegetação nas margens do rio. O ponto 3, localizado no Rio Marrecas, está sob a ponte na Avenida General Osório, em uma área urbana central, com fluxo intenso de veículos. O ponto 6, também no Rio Marrecas, fica próximo à UPA 24 horas, embaixo da ponte da rodovia Olivo Zanella. Nesse trecho existem casas, vegetação considerável e tráfego de veículos até chegar ao local de coleta. O ponto 7, no Rio Marrecas, está localizado no bairro Padre Ulrico, em terreno íngreme, contendo casas e vegetação.

O ponto 4 trata-se da foz do Rio Lonqueador, que desagua no Rio Marrecas e, foi coletado na ponte do Arrudão. O ponto 5 trata-se das águas do rio Urutago, e localiza-se dentro do Parque de Exposições, este foi canalizado, tendo como deságue o ponto 7 do presente estudo, também no Rio Marrecas.

A coleta da água do ponto 8 foi de uma residência abastecida pela água do Rio Marrecas, tratada pela Estação de Tratamento de Água de Francisco Beltrão-Paraná-Brasil.

Figura 1 – Localização do Rio Marrecas e dos pontos de coleta das águas analisadas.



1: Ponto 1; 2: Ponto 2; 3: Ponto 3; 4: Ponto 4; 5: Ponto 5;  
6: Ponto; 7: Ponto 7.

Fonte: Autoria própria.

#### Teste de citotoxicidade do MTT com cultura de células humana

As células Huh7.5, cedidas pela UEL (Universidade Estadual de Londrina), foram cultivadas em meio DMEM com 15% de soro bovino fetal a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para o cultivo deste tipo celular não é preciso a aprovação do Comitê de Ética. O ensaio de citotoxicidade MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo) seguiu o protocolo de Mosmann (1983) em placas de 96 poços, cada poço semeado com aproximadamente 1x10<sup>4</sup> células. Foram testados: controle negativo (meio de cultura), controle positivo (agente citotóxico MMS 500 µM) e concentrações de 1:10, 1:100 e 1:1000 (v/v, amostra/meio) de água filtrada com poro de 0,22 µm.

Após incubação por 24, 48 e 72 horas, o meio foi substituído por meio não suplementado com MTT (0,167 mg mL<sup>-1</sup>). Após 4 horas, o meio foi removido, adicionado dimetilsulfóxido e as absorbâncias lidas a 492 nm. Resultados apresentados como média e desvio padrão das absorbâncias. Análise estatística incluiu ANOVA, teste de normalidade e teste de comparação de médias de Dunnett (n=4) usando Action Stat, com significância para p<0,05. A viabilidade celular foi calculada pela razão entre a absorbância do tratamento e do controle negativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise estatística mostrou que a maior concentração [1:10] do ponto 3 (P3 – região central da cidade), após 72 horas, apresentou atividade proliferativa, com viabilidade celular de 163,16% em relação ao controle negativo (Tabela 1). As concentrações de [1:100] e [1:1000] do ponto 8 (P8 – água de uma residência abastecida pela água tratada pela ETA), no tempo de 24 horas, também apresentaram atividade proliferativa, com absorvâncias médias estatisticamente maiores que a do controle negativo, e com viabilidade celular de 131,66 e 131,95%, respectivamente.

**Tabela 1 – Percentual de viabilidade celular (VC) de células Huh7.5 tratadas com as concentrações (1:10, 1:100, 1:1000) das amostras de água coletadas em alta vazão, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT.**

Grupos	Célula Huh7.5		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	57,79*	47,01*	30,24*
P1 [1:10]	84,94	88,64	108,22
P1 [1:100]	80,60	86,96	96,28
P1 [1:1000]	89,58	68,34	117,23
P2 [1:10]	94,98	106,70	100,55
P2 [1:100]	106,08	86,42	109,72
P2 [1:1000]	94,59	73,03	124,39
P3 [1:10]	97,97	101,75	163,16*
P3 [1:100]	117,57	101,14	88,81
P3 [1:1000]	102,41	89,11	105,77
P4 [1:10]	95,27	103,03	134,88
P4 [1:100]	104,92	103,03	93,14
P4 [1:1000]	113,03	99,40	101,92
P5 [1:10]	105,50	105,44	94,50
P5 [1:100]	93,05	97,77	91,07
P5 [1:1000]	92,37	52,33*	65,87
P6 [1:10]	108,88	94,44	133,70
P6 [1:100]	120,94	115,85	111,62
P6 [1:1000]	100,87	94,44	95,65
P7 [1:10]	116,60	93,48	99,43
P7 [1:100]	121,52	111,96	94,50
P7 [1:1000]	114,28	110,53	107,79
P8 [1:10]	115,15	121,05	100,26
P8 [1:100]	131,66*	106,40	100,73
P8 [1:1000]	131,95*	110,82	104,47

CO-: Controle negativo; CO+: Controle positivo; P1: Ponto 1; P2: Ponto 2; P3: Ponto 3; P4: Ponto 4; P5: Ponto 5; P6: Ponto; P7: Ponto 7; P8: Ponto 8.

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

Fonte: Autoria própria.

Somente a menor concentração avaliada [1:1000] do ponto 5 (P5 – foz do Rio Urutago), no tempo de 48 horas, apresentou atividade citotóxica, com absorbâncias médias estatisticamente menores que a do controle negativo, e com viabilidade celular de 52,33%. As demais concentrações dos outros pontos avaliados não apresentaram diferença estatisticamente do controle negativo.

De acordo com Bressiani (2023), o ponto 3 apresentou elevada turbidez ( $183,20 \pm 11,1$  NTU) (acima do permitido pela legislação), o P5 apresentou elevada condutividade ( $94,00 \pm 0,00$  mS  $\text{cm}^{-1}$ ) e os pontos (P3, P5 e P8) apresentaram sólidos totais dissolvidos (P3:  $30,00 \pm 2,24$  g  $\text{L}^{-1}$ , P5:  $61,00 \pm 0,00$  g  $\text{L}^{-1}$ , P8:  $0,122 \pm 0,00$  g  $\text{L}^{-1}$ ), acima do permitido pelas legislações CONAMA N°357/2005 (BRASIL, 2005). Além disso, apresentaram elevados teores dos hormônios E1, E2, EE2 (P3, P5 e P8) e E3 (P5) e do agroquímico 2,4D (P3, P5 e P8). Agroquímicos e hormônios são considerados desreguladores endócrinos, podem persistir em ambientes aquáticos após o tratamento de água e esgoto, representando riscos à saúde (SANTOS et al., 2020).

## CONCLUSÕES

Os dados do presente estudo indicam alterações nas divisões celulares das células de fígado humano tratadas com as águas do Rio Marrecas (no ponto 3 – região central do município), do Rio Urutago (ponto 5) e da água tratada pela ETA do município (ponto 8). Estas alterações possuem correlação com a presença de hormônios estrogênicos e do agroquímico 2,4D nas amostras. Os dados indicam que estas águas estão sendo afetadas pela ação antrópica e, estimulam ações de conscientização e mudança de hábitos pela população e pelo poder público.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Fundação Araucária pela bolsa de Iniciação Científica, ao NAPI-SUDOESTE, à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) 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

BIANCHI, E. **Water quality monitoring of the Sinos River Basin, Southern Brazil, using physicochemical and microbiological analysis and biomarkers in laboratory-exposed fish.** *Ecohydrology & Hydrobiology*, v.19, p. 328-338, 2019.

BRASIL. RESOLUÇÃO N° 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.

BRESSIANI, P. A. **Efeito da vazão do rio Marrecas nos parâmetros físico-químicos e ecotoxicológicos de suas águas.** Qualificação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2023.

CAPRARIO, J.; RECH, A.S.; CAPRARIO, G.N.; FINOTTI, A.R. **Hydrosedimentological simulation of the quatorzeriver watershed,** Francisco Beltrão (Paraná, Brazil). Anuário do Instituto de Geociências-UFRJ, v.40(1), p. 102–114, 2017.

CARVALHO, C.E.V.; SALOMÃO, M.S.M.B.; MOLISANI, M.M.; REZENDE, C.E.; LACERDA, L.D. **Contribution of a medium-sized tropical river to the particulate heavy-metal load for the South Atlantic Ocean.** *Science Of The Total Environment*, v. 284, p.85-93, 2002.

FARIAS, A.S. **Inundações urbanas em Francisco Beltrão-PR: riscos e vulnerabilidades socioambientais.** 2019. Tese. Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento, Universidade Federal do Paraná–UFPR, Curitiba, 2019.

MOSMANN, T. **Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

OHE, T. **Mutagens in surface waters: a review.** *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 567, p.109-149, 2004.

SALDARRIAGA-HERNANDEZ, S.; HERNANDEZ-VARGAS, G.; BARCELÓ, D.; PARRA-SALDÍVAR, R. **Bioremediation potential of Sargassum sp. biomass to tackle pollution in coastal ecosystems: Circular economy approach.** *Science Of The Total Environment*, v. 715, 2020.

SANTOS, A.V.; COUTO, C.F.; LEBRON, Y.A.R.; MOREIRA, V.R.; FOUREAUX, A.F.S.; REIS, E.O.; SANTOS, L.V.S.; ANDRADE, L.H.; AMARAL, M.C.S.; LANGE, L.C. **Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in water supply systems in Brazil.** *Science Of The Total Environment*, v. 746, p. 141011, 2020.