



Citotoxicidade das águas do Rio Marrecas para células renais de *Macaca mullata* (in vitro)

Cytotoxicity of Marrecas River waters to Macaca mullata Kidney cells (in vitro)

Mariana Tonello Biffi*, Eduardo Michel Vieira Gomes[†], Ana Paula de Oliveira Schmidt\$,
Liliane Hellmann[&], Franciele Ani Caovilla Follador[@], Gisele Arruda[¥], Elisangela Dusman[‡]

RESUMO

A falta de tratamento dos recursos hídricos disponíveis para a população é um dos grandes problemas enfrentados por países em desenvolvimento e, ele é agravado pela falta de monitoramento por parte dos órgãos responsáveis. O monitoramento das fontes de água quando feito por métodos analíticos pode ser ineficaz, pois os poluentes químicos muitas vezes estão em baixa quantidade. Nesse caso, uma forma mais eficaz de análise são as que utilizam bioindicadores para identificar possíveis danos desses poluentes sobre a biota exposta a esses recursos. Com o objetivo de monitorar a citotoxicidade das águas do Rio Marrecas-Francisco Beltrão-Paraná foram coletadas amostras da nascente à foz deste rio e submetidas ao teste do MTT com cultura de células renais de *Macaca mullata* (LLC-MK2). Cada amostra (ponto de coleta) foi filtrado e diluído em meio de cultura nas concentrações de 1:10, 1:100 e 1:100 (amostra/meio). De acordo com os dados obtidos, os pontos 2, 3, 5 e 6 induziram proliferação celular ou maior atividade mitocondrial, com absorbâncias médias maiores que a do controle negativo, em pelo menos uma das concentrações avaliadas. Apesar de não ser identificada correlação com os parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados, é possível que haja fontes pontuais de poluição nessas áreas, mostrando a necessidade de intensificação do monitoramento das atividades nessas áreas.

Palavras-chave: Poluentes, Teste MTT, Recursos Hídricos.

ABSTRACT

The lack of treatment of water resources available to the population is one of the great problems faced by developing countries and it is aggravated by the lack of monitoring by the responsible agencies. Monitoring water sources when done by analytical methods can be ineffective, as chemical pollutants are often in low amounts. In this case, a more effective form of analysis is those that use bioindicators to identify possible damage from these pollutants on the biota exposed to these resources. In order to monitor the cytotoxicity of the waters of the Marrecas-Francisco Beltrão-Paraná River, samples were collected from the source to the mouth of this river and submitted to the MTT test with *Macaca mullata* kidney cell culture (LLC-MK2). Each sample (collection point) was filtered and diluted in culture medium at concentrations of 1:10, 1:100 and 1:100 (sample/medium). According to the data obtained, points 2, 3, 5 and 6 induced cell proliferation or greater mitochondrial activity, with mean absorbances greater than that of the negative control, in at least one of the concentrations evaluated. Although no correlation was identified with the physicochemical and microbiological parameters analyzed, it is possible that there are point sources of pollution in these areas, showing the need to intensify the monitoring of activities in these areas.

Keywords: Pollutants, MTT Test, Water Resources.

* Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; mariana__biffi@hotmail.com

[†] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; eduardogomes@utfpr.edu.br

\$ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; anapoliveira@utfpr.edu.br

& Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; lilianehellmann@utfpr.edu.br

@ Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Francisco Beltrão; francaovilla@hotmail.com

¥ Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Francisco Beltrão; giselearrudabioq@gmail.com

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; edusman@professores.utfpr.edu.br



1. INTRODUÇÃO

Um dos problemas de países em desenvolvimento como o Brasil é a falta de tratamento dos recursos hídricos disponíveis para o consumo da população. Os baixos níveis de monitoramento dos recursos hídricos pelos órgãos responsáveis acabam dificultando a sua manutenção e, segundo a Agência Nacional de Águas (ANA), apenas 17 das 27 unidades federativas enviam dados de monitoramento regularmente (BRASIL, 2020).

A água é dita potável quando análises microbiológicas confirmam a ausência de agentes que poderiam colocar em risco a saúde dos seres humanos (PRINSLOO et al., 2013). Porém, esses limites não levam em conta os riscos que os contaminantes podem oferecer a biota aquática, além disso, diversos testes com diferentes bioindicadores vem sendo realizados e comprovam que a exposição a longo prazo a esses recursos hídricos pode apresentar consideráveis níveis de citotoxicidade para os seres vivos em geral (ŽEGURA et al., 2009).

Os ensaios de citotoxicidade que mensuram a atividade mitocondrial são utilizados para detectar danos precoces, pois os contaminantes da água têm dois efeitos principais sobre as células, efeitos tóxicos que levam essas células à morte ou ainda efeitos proliferativos que podem indicar sequelas carcinogênicas na biota exposta à tais recursos hídricos (TRINTINAGLIA et al., 2015).

Com o intuito de avaliar os efeitos citotóxicos das águas do Rio Marrecas, o qual é a principal fonte de abastecimento para a população da região sudoeste do estado do Paraná, foram realizados ensaios de citotoxicidade, pelo teste do MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazolium bromide], com cultura de células renais de *Macaca mullata* (LLC-MK2). Além disso, o grande volume de informações produzido pelas análises químicas, ecológicas e toxicológicas requerem uma correta e profunda análise de dados. Assim, o objetivo do presente estudo também foi realizar a tabulação, análise e interpretação dos dados obtidos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O rio Marrecas nasce em Marmeleiro, município limítrofe a 11 km de distância de Francisco Beltrão e deságua no Rio Santana. As amostras de água foram coletadas na estação do verão em nove pontos, previamente selecionados, para identificar possíveis alterações na qualidade da água ao longo do rio, os quais estão identificados na Figura 1. Os pontos 1 e 2 (P1 e P2) localizam-se na região de nascentes ou montante do Rio Marrecas. O ponto 3 (P3) localiza-se 14km antes do rio entrar no perímetro urbano da cidade. O ponto 4 (P4) encontra-se nos limites da área urbana, e os pontos 5, 6 e 7 (P5, P6 e P7), situam-se ao longo do trecho urbano do rio. O ponto 8 (P8) localiza-se nos limites jusante entre cidade e zona rural, e o ponto 9 (P9) 17 km a jusante da cidade de Francisco Beltrão.

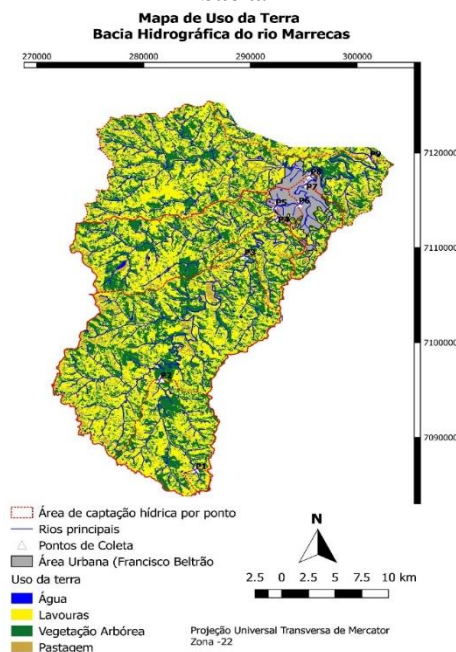
A coleta e preservação/armazenamento de amostras de água foram realizadas de acordo com as instruções e métodos contidos no "Standard Methods" (APHA, 2012). No momento do uso, as amostras foram filtradas utilizando microfiltros com um tamanho de poro de 0,22 μm , para máxima retenção de microrganismos que pudessem estar contidos nessas. Cada amostra (ponto de coleta) foi diluída em meio de cultura, nas concentrações 1:10, 1:100 e 1:1000 (v/v, amostra/meio).

As células LLC-MK2, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Wander Pavanelli da Universidade Estadual de Londrina, foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm^2 , contendo 10 mL de meio de cultura DMEM, suplementando com 15% de soro bovino fetal, e incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 . O ensaio de citotoxicidade do MTT foi realizado de acordo com o protocolo sugerido (MOSMANN, 1983), com



modificações. Foram utilizadas placas de cultura de 96 poços onde, foram cultivadas 1×10^5 células/poço. Após estabilização por 24 horas, o meio de cultura foi descartado e adicionado 100 μL de meio completo com os seguintes tratamentos: meio de cultivo (controle negativo - CO-), agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS – 150 μM), (controle positivo - CO+) e tratamentos com as diferentes concentrações de cada ponto de coleta de água do Rio Marrecas.

Figura 1. Localização dos nove pontos de coleta do Rio Marrecas com a descrição do uso e ocupação do solo da bacia.



Fonte: Adaptado de SANTOS et al. (2021)

Após 24, 48 e 72 horas de incubação, o tratamento foi substituído por meio de cultura contendo de MTT ($0,167\text{mg mL}^{-1}$). As placas foram incubadas por mais quatro horas antes do descarte do meio contendo MTT, seguido da adição de 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para 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. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão das absorbâncias.

Os valores percentuais de viabilidade celular (VC) foram estimados por meio da Equação 1.

$$VC = \left(\frac{ABS_T}{ABS_{CO-}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

VC = Viabilidade celular [%];

ABS_T = Absorbância do tratamento.

ABS_{CO-} = Absorbância do controle negativo.

Os valores das absorbâncias de cada repetição ($n=6$), de todas as concentrações e de todos os pontos de coleta, para cada tempo de avaliação (24, 48 e 72 horas) foram submetidos ao teste de normalidade e à análise de variância (*one way ANOVA*). Após, para cada tempo de avaliação foi realizado o teste de comparação de médias de Dunnet ($\alpha=0,05$), pelo *software Action Stat*. As diferenças foram consideradas sendo estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05. Além disso, também foi analisado

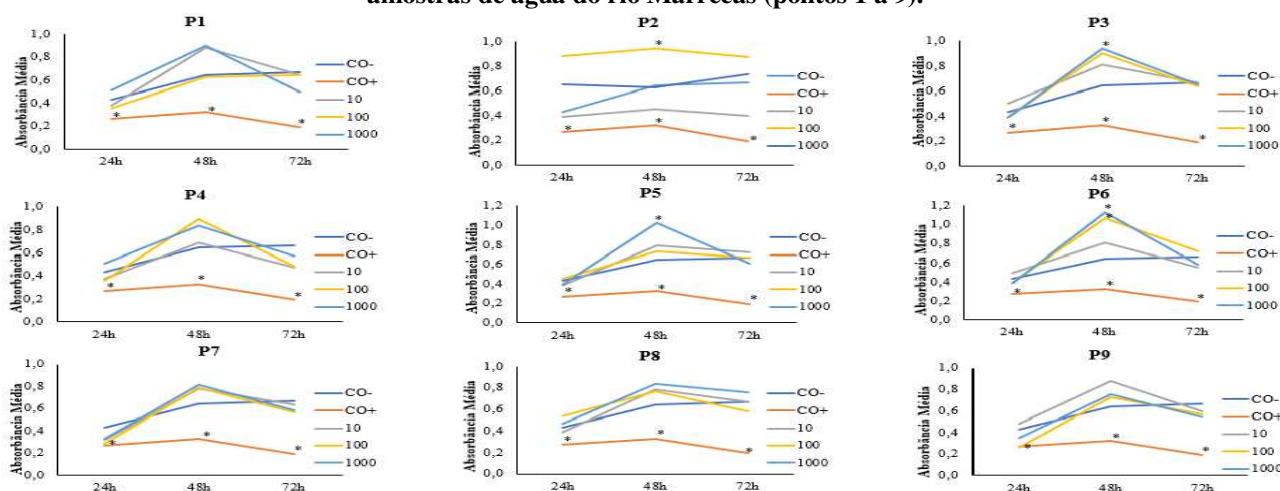


o grau de correlação entre a absorbância média e alguns parâmetros físico-químicos e microbiológicos das amostras de água, com o auxílio do Programa *Action Stat*.

3. RESULTADOS

Os dados da Figura 2 apresentam os valores médios de absorbância obtidos com as células LLC-MK2 tratadas com as diferentes concentrações de amostras de água coletadas em nove pontos ao longo do rio Marrecas nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os dados mostram que não houve uma mudança expressiva nos níveis de absorbância em relação ao controle negativo para os pontos 1, 4, 7, 8 e 9, o que significa que não houve uma significativa taxa de morte celular nem tão pouco proliferação das células nesses pontos. Já para os outros pontos, no tempo de 48 horas, pode-se notar um aumento da absorbância média para algumas concentrações: no ponto 2 (1:100), ponto 3 (1:1000), ponto 5 (1:1000) e ponto 6 (1:100 e 1:1000). Esse aumento pode indicar um aumento na divisão celular ou ainda um aumento da atividade mitocondrial dessas células. Inclusive, os dados da viabilidade celular indicam que houve aumento dessa em praticamente todos os pontos no tempo de 48 horas.

Figura 2. Absorbâncias médias de células normais LLC-MK2, tratadas por 24, 48 e 72 horas com as amostras de água do rio Marrecas (pontos 1 à 9).



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; 1×10^5 células por poço.

*Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$)

Fonte: Autoria propria (2021)

Santos et al. (2021), avaliando as alterações nucleares, pelo teste do micronúcleo com girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos às mesmas amostras dos nove pontos de coleta de água do Rio Marrecas também confirmaram a citotoxicidade das águas dos Pontos 2, 5 e 6. Os autores alegam essas amostras apresentaram valores maiores que o aceitável pelo CONAMA (BRASIL, 2005) para DBO, alumínio, manganês, ferro, cobre e arsênio, o que pode justificar esta citotoxicidade. Os dados das análises físico-químicas e microbiológicas dessas amostras de água (Tabela 1), também identificaram altos níveis de coliformes totais no ponto 2 (>240 NMP mL^{-1}) e 6 (24 NMP mL^{-1}) e *Escherichia coli* no ponto 6 (>300 UFC), o que poderia justificar o aumento da absorbância nesses pontos, visto que o teste do MTT sofre alterações quando aplicados em amostras contendo micróbios, pois esses metabolizam o sal ocultando assim o efeito citotóxico das amostras sobre as células (PRINSLOO et al., 2013). Além disso, as análises físico-químicas



demonstraram elevado nível de condutividade nos pontos 5 (200,67 ms cm⁻¹ a 20°C) e 6 (227,33 ms cm⁻¹ a 20°C), o que pode indicar elevada poluição e matéria orgânica nestas águas, que pode ter conduzido à maior proliferação células ou aumento da atividade mitocondrial provocada por um estresse celular. Santos et al. (2021) também confirmaram a mutagenicidade da água do Ponto 6, sendo que este foi o ponto que apresentou maior percentual médio de micronúcleos, dentre todos os grupos avaliados, indicando alguma contaminação mais evidente nesta região do rio nesta estação.

Entretanto, nenhum dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados apresentou correlação com a absorbância média (das três concentrações avaliadas) do tempo de 48 horas (tempo em que foi observada alteração estatística com o controle negativo) (pH: p valor=0,28, r²=0,158; turbidez: p valor=0,72, r²=0,018; condutividade: p valor=0,95, r²=0,000; coliformes totais: p valor=0,35, r²=0,122; coliformes fecais: p valor=0,70, r²=0,021; *E. coli*: p valor=0,62, r²=0,036).

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos e biológicos das amostras de água do Rio Marrecas*.

Pontos	pH	Turbidez NTU	Condutividade ms cm ⁻¹ a 20°C	Coliformes Totais NMP mL ⁻¹	Coliformes Fecais NMP mL ⁻¹	<i>Escherichia coli</i> colônias
Ponto 1	6,77	48,37	3,73	<0,3	<0,3	0
Ponto 2	6,81	62,26	12,69	>240	2,3	75
Ponto 3	6,71	57,7	68,5	2,3	24	12
Ponto 4	6,76	46,7	244	0,4	>240	>300
Ponto 5	7,43	56,28	200,67	<0,3	<0,3	0
Ponto 6	7,05	55,47	227,33	24	24	+>300
Ponto 7	6,7	60,33	222	6,4	24	>300
Ponto 8	6,62	77,37	237,33	<0,3	<0,3	0
Ponto 9	6,78	63,57	68	2,3	0,4	145

NMP: Número mais provável. * Dados gentilmente cedidos pelas Prof^a. Dr^a. Gisele Arruda e Prof^a. Dr^a. Franciele Ani Caovilla Folador, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo identificou alterações na viabilidade celular ou atividade mitocondrial das células LLC-MK2 expostas às amostras de água dos Pontos 2, 3, 5 e 6 do Rio Marrecas, na estação do verão. Apesar de não ser identificada correlação com alguns parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados, é possível que alguma atividade/poluição/contaminação dessas águas esteja afetando a atividade das células renais de *Macaca mulata*, mostrando a necessidade de intensificação do monitoramento das atividades nessas áreas.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Tecnológica Federal Do Paraná, por me proporcionar a oportunidade de participar desse projeto de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS



APHA - American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22., 2012. Washington: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation, 2012.

BRASIL. Fundação Joaquim Nabuco. **Poluição dos recursos hídricos e a responsabilidade social**. Ministério da educação, 2020.

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

PRINSLOO, S.; PIETERS, R.; BEZUIDENHOUT, C. C. A cell viability assay to determine the cytotoxic effects of water contaminated by microbes. **South African Journal of Science**. Pretória, v. 109, n. 7-8, p. 01-04, 2013.

SANTOS, F. I. DOS *et al.* Citotoxicidade e mutagenicidade das águas do rio Marrecas (Paraná, Brasil) para rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 17, p. 21742–21753, 2021.

TRINTINAGLIA, L. *et al.* Cytotoxicity assays as tools to assess water quality in the Sinos River basin. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2 suppl, p. 75–80, maio. 2015. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842015000300013&lng=en&tlng=en>.

ŽEGURA, B. *et al.* Combinação de bioensaios *in vitro* para a determinação do potencial citotóxico e genotóxico de amostras de águas residuais, águas superficiais e de água potável. **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1453–1460, jun. 2009.