

14º Congresso Nacional de

MEIO AMBIENTE

Poços de Caldas

26 a 29 SET 2017

www.meioambientepocos.com.br

**POÇOS DE ÁGUAS
TERMAIS E MINERAIS**

**2º Simpósio de Águas Termais,
Minerais e Naturais de Poços de Caldas**

PRESENÇA DE METAIS PESADOS EM ÁGUA SUBTERRÂNEA DO SISTEMA AQUÍFERO SERRA GERAL PROVOCA DANO GENÉTICO NA ESPÉCIE *Daniorerio*

Katiuska Marins¹

Luan Marcos ValentiniLazarotto²

Anna Maria Siebel³

Jacir Dal Magro⁴

Leila Zanatta⁵

Resumo

Metais pesados como Ferro (Fe) e Manganês (Mn) estão presentes na água de beber, sendo necessários ao funcionamento de diversas reações biológicas, porém podendo também ocasionar doenças neurodegenerativas, devido à exposição crônica. Foi analisado o encéfalo, fígado e músculo de *Daniorerio* expostos a Fe, Mn e águas subterrâneas do Sistema Aquífero Serra Geral (SASG), focando em danos ao DNA e bioacumulação. Os resultados demonstraram potencial genotóxico, através do ensaio de micronúcleo, para todos os tecidos e grupos analisados. Bem como, bioacumulação destes metais no fígado e músculo.

Palavras Chave: Manganês; Ferro; Micronúcleo; Bioacumulação; *Daniorerio*

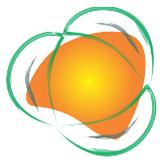
INTRODUÇÃO

Segundo a Resolução nº 396 do CONAMAo Valor Máximo Permitido (V.M.P) de Fe e Mn em águas subterrâneas destinadas ao consumo humano é de 0,3 mg/L e 0,1 mg/L, respectivamente. Estudos na área de doenças cerebrais degenerativas associadas ao Fe correlacionaram algumas doenças neurodegenerativas crônicas como doença de Alzheimer, Huntington e Mal de Parkinson ao acúmulo de Fe no cérebro (SCHNEIDER; HARDY; BHATIA, 2012). Enquanto, a exposição ambiental e ocupacional a altos níveis de Mn pode levar a distúrbio neurodegenerativo, que assemelha-se à Doença de Parkinson, conhecido como manganismo (EPA, 2004).

¹Mestranda do Programa de Pós-graduação stricto sensu em Ciências Ambientais da Unochapecó (PPGCA Unochapecó) - katiuska@unochapeco.edu.br

²Acadêmico do curso de Ciências Biológicas da Unochapecó - luan.lazarotto@unochapeco.edu.br³Prof.^a e coordenadora do PPGCA Unochapecó - annasiebel.siebel@gmail.com

³Prof. do PPGCA Unochapecó - jacir@unochapeco.edu.br ⁵Prof.^a do PPGCA Unochapecó - leila.zanatta@unochapeco.edu.br



Pesquisas (CARASEK, 2016) encontraram níveis acima do V.M. para Fe e Mn em águas subterrâneas do município de Chapecó (Santa Catarina, Brasil) o que caracteriza uma fonte de consumo crônico destes metais. Neste contexto, o presente trabalho visou avaliar danos ao DNA ocasionados pela exposição crônica de Mn e Fe, bem como sua bioacumulação em tecido animal. Para tanto, o modelo experimental escolhido é o peixe da espécie *Danio rerio*, conhecido como paulistinha ou zebrafish.

Danio rerio passou a ser utilizado como modelo experimental para estudo de diversas doenças, principalmente devido ao sequenciamento detalhado do genoma desta espécie demonstrando homologia de 70-80% com seres humanos (HOWE et al., 2013), sendo um ótimo modelo animal translacional.

METODOLOGIA

Para a seleção do poço tubular profundo, os valores de Fe e Mn foram previamente analisados na água por espectrometria de absorção atômica. O poço selecionado apresentava 0,72 µg Fe/L e 0,18 µg Mn/L. Sendo assim, estipulou-se que as concentrações de metais aplicados como controle positivo seriam 0,8 µg Fe/L e 0,2 µg Mn/L, na forma de FeSO₄ e MnCl₂, respectivamente.

Os peixes-zebra adultos jovens (CEUA/Unochapecó nº 005/2016), de ambos os sexos, foram expostos de forma crônica (30 dias) a água deionizada suplementada com sais base (Controle Negativo -CN), ou água suplementada acrescida de Fe (CPFe), ou acrescida de Mn (CPMn) ou somente água subterrânea (AS). Eles foram mantidos na proporção de 5 peixes/L de água, renovada diariamente, ciclo claro/escuro de 14h/10h e os parâmetros de temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido e pH verificados diariamente.

Após a exposição os animais foram eutanasiados em solução de MS222 500 mg/L, pH 7,00, e encéfalo, fígado e músculo do pedúnculo caudal dissecados.

Para quantificação dos metais (pool = 2; n = 5), os tecidos foram transferidos para tubos de digestão, adicionado 2mL de HNO₃ 65%, levados a bloco digestor a 140 °C por 5 horas, e o volume completado para 2 mL com água ultrapura.

Bioacumulação nos tecidos foi quantificada por espectrofotômetro de absorção atômica modelo AANALYST 800 AAS, Perkin Elmer®, método forno de grafite. As curvas analíticas foram preparadas por diluição seriada a partir de solução estoque padrão de 100 µg Fe/L e 50 µg Mn/L.

Os danos ao DNA foram avaliados pelo ensaio de micronúcleo (1 peixe = 1 n, n = 10), analisando células com micronúcleos (MN), pontes nucleares ou ampliações do tipo *Bud*. Os tecidos foram suspensos em PBS, adicionados em solução fixadora e KCl 5,6% (1:3:1). Foi realizado esfregaço em lâminas histológicas coradas com Giemsa 50%. A determinação da frequência foi realizada pela contagem de 500 células por lâmina, perfazendo 1000 células, em microscópio óptico em aumento 1000x.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios obtidos para os parâmetros que avaliavam a qualidade da água dos aquários dos grupos CN, CPFe 0,8 µg/L, CPMn 0,2 µg/L e AS foram: temperatura 26,51 ± 0,33 °C; condutividade 216,48 ± 4,79 µmhos/cm; oxigênio dissolvido 9,28 ± 0,16 mg/L e pH 8,07 ± 0,23.



Pelo método de forno de grafite foram obtidos limites de detecção de 1,36 µg Fe/L e 0,69 µg Mn/L; limites de quantificação de 4,55 µg Fe/L e 2,30 µg Mn/L; e coeficiente de correlação de 0,9965 para Fe e 0,9973 para Mn.

Nos resultados de bioacumulação para Fe, todos os grupos e tecidos apresentaram valores acima do limite de detecção e quantificação. Dado que a AS (2386,4 µg Fe/g) apresentou diferença significativa de $p < 0,01$, quando relacionado ao CN, bem como diferença em relação ao CPFe ($p < 0,05$).

Enquanto os três tecidos do CN e encéfalo da AS para o Mn ficaram abaixo do limite de quantificação. A quantidade de Mn presente no fígado (15,05 µg Mn/g) e músculo (8,91 µg Mn/g) para o CPMn demonstrou diferença significativa de $p < 0,05$, quando comparado ao CN.

Para as análises de dano ao DNA, o ensaio de micronúcleo, demonstrou a presença de células com MN nos tecidos analisados (encéfalo, fígado e músculo) para CPFe, CPMn e AS com diferença estatística de $p < 0,0001$, quando comparados ao grupo CN. Para a AS foi observado semelhança significativa ao CPMn, em relação a presença de MN no fígado. Para os grupos que apresentaram MN a média das estruturas contadas para o encéfalo, fígado e músculo foi de 113, 116 e 135, respectivamente. Sendo que, todos os grupos testados não apresentaram diferença significativa em relação à presença de pontes e *Buds*.

Nossos resultados demonstraram a presença de MN no encéfalo, fígado e músculo de *Daniorerio* expostos aos metais Fe, Mn e água subterrânea do SASG. Para os ensaios de bioacumulação, foi observado maior concentração de Fe no fígado da AS, e de Mn no fígado e músculo do CPMn.

Fe e Mn em concentrações ambientais também induziram a acumulação destes metais em girinos *Lithobates beianus* com consequente alteração no desenvolvimento e efeitos genotóxicos (VERONEZ et al., 2016). Sendo de fundamental importância pesquisas que utilizam como parâmetros amostras reais, pois desta forma é possível reproduzir resultados ambientalmente relevantes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bioquímica de *Daniorerio* pode ser afetada pela exposição de substâncias nocivas, como metais pesados, resultando na perda da integridade do DNA. Dado observado pela presença de MN no encéfalo, fígado e músculo da espécie. Sugerindo-se que a bioacumulação destes metais nos tecidos pode estar relacionada com a presença dos MN observados.

REFERÊNCIAS

SCHNEIDER, S. A.; HARDY, J.; BHATIA, K. P.

Syndromes of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA):

an update on clinical presentations, histological and genetic underpinnings, and treatment considerations.

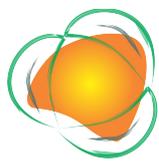
Mov. Disord. v. 27, p. 42–53, 2012.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Drinking water health advisory for manganese. 2004.

CARASEK, F. **Qualidade da água subterrânea do sistema aquífero serrageral na região oeste do estado de Santa Catarina, Brasil.** 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Unochapecó, Chapecó, 2016.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome.

Nature. v. 496, p. 498-503, 2013.



14º Congresso Nacional de

MEIO AMBIENTE

Poços de Caldas

26 a 29 SET 2017

www.meioambientepecos.com.br

**POÇOS DE ÁGUAS
TERMAIS E MINERAIS**

**2º Simpósio de Águas Termais,
Minerais e Naturais de Poços de Caldas**

VERONEZ, A. C. S. et al. Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. **Aquatic Toxicology**. v. 174, p. 101-108, 2016.