

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 Marins<sup>1</sup>

Luan Marcos ValentiniLazarotto<sup>2</sup>

Anna Maria Siebel<sup>3</sup>

Jacir Dal Magro<sup>4</sup>

Leila Zanatta<sup>5</sup>

### **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**

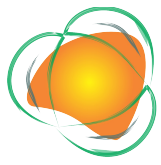
Segundo a Resolução nº 396 do CONAMA o Valor Máximo Permitido (V.M.P) de Fe e Mn em águas subterrâneas destinadas ao consumo humano é de 0,3 mg/L e 0,1 mg/L, respectivamente. Estudos na área de doenças cerebrais degenerativas associadas ao Fe correlacionaram algumas doenças neurodegenerativas crônicas 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).

---

<sup>1</sup>Mestranda do Programa de Pós-graduação stricto sensu em Ciências Ambientais da Unochapecó (PPGCA Unochapecó) - [katiuska@unochapeco.edu.br](mailto:katiuska@unochapeco.edu.br)

<sup>2</sup>Acadêmico do curso de Ciências Biológicas da Unochapecó - [luan.lazarotto@unochapeco.edu.br](mailto:luan.lazarotto@unochapeco.edu.br) <sup>3</sup>Prof.<sup>a</sup> e coordenadora do PPGCA Unochapecó - [annasiebel.siebel@gmail.com](mailto:annasiebel.siebel@gmail.com)

<sup>4</sup>Prof. do PPGCA Unochapecó - [jacir@unochapeco.edu.br](mailto:jacir@unochapeco.edu.br) <sup>5</sup>Prof.<sup>a</sup> do PPGCA Unochapecó - [leila.zanatta@unochapeco.edu.br](mailto: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 FeSO<sub>4</sub> e MnCl<sub>2</sub>, 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.

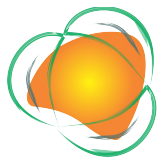
Para quantificação dos metais (pool = 2; n = 5), os tecidos foram transferidos para tubos de digestão, adicionado 2mL de HNO<sub>3</sub> 65%, levados a bloco digestor a 140 °C por 5 horas, e o volume completado para 2 mL com água ultrapura.

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.

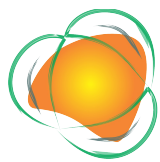
**Mov. Disord.** v. 27, p. 42–53, 2012.

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](http://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.