

Efeito de efluentes industriais sobre biomarcadores em peixes

Carlos Filipe Camilo-Cotrim¹(IC)*, Max Miller Bicudo dos Reis¹(IC), Fabrício Barreto Teresa¹(PQ), Luciana de Souza Ondeí¹(PQ)

*carlosfcamilo@gmail.com

1: Universidade Estadual de Goiás - Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas - Henrique Santillo, BR 153, n. 3105, Fazenda Barreiro do Meio, Anápolis - GO. 75132-903. Tel: (62) 3328-1160. Fax (62)3328-1177.

Resumo: O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de efluentes industriais sobre biomarcadores de peixes, comparando a peroxidação lipídica e os danos genotóxicos. Para isso, foi feita a exposição de lambaris da espécie *Astyanax lacustris* em um trecho do córrego Barreiro que recebe efluente industrial e em um trecho de nascente que não recebe efluente. Para o teste de genotoxicidade adotamos a técnica de micronúcleo e anomalias nucleares, usando sangue dos lambaris para confeccionar esfregaços sanguíneos. Para o teste de peroxidação lipídica utilizamos a avaliação do produto formado entre o molondialdeído (MDA), marcador bioquímico decorrente da peroxidação lipídica, e o ácido 2-tiobarbitúrico. Para avaliar o efeito dos riachos (que recebe efluentes industriais e a nascente) os valores de MDA e micronúcleo foram comparados por meio da Análise de Variância Fatorial (Two-Way ANOVA). Os resultados indicam que houve efeito genotóxico para o riacho que recebe efluente, já que o teste de anormalidades nucleares e micronúcleo apresentou resultado significativo ($p < 0,05$). Já o teste de peroxidação lipídica não apresentou resultado significativo para níveis de MDA tanto no fígado quanto nas brânquias ($p = 0,30$ e $p = 0,68$, respectivamente). Os resultados obtidos mostram que biomarcadores são importantes ferramentas para avaliar respostas de organismos aquáticos em ambientes impactados.

Palavras-chave: Genotoxicidade. Micronúcleo. Anomalias nucleares. Molondialdeído. Peroxidação lipídica. Monitoramento.

Introdução

A produção de radicais livres em um organismo é um processo natural e fisiológico. Contudo, sua produção excessiva pode acarretar em danos oxidativos (BARBOSA et. al., 2010) a lipídios da membrana, proteínas, enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). De acordo com Sies (1986) o desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e antioxidantes pode causar o estresse oxidativo.

As causas deste desequilíbrio e a produção em excesso de radicais livres, muitas vezes, pode estar ligada ao estresse que o organismo sofre em seu meio devido ao estado de excitação e perturbação da homeostase, o que desencadeia diversas manifestações sistêmicas, tais como distúrbios fisiológicos (MARGIS et. al., 2003). Dentre os fatores que podem causar alterações nos organismos estão as variações naturais como oxigênio, pH, temperatura, bem como as alterações causadas pela ação antrópica, como poluição (ESPÍRITO-SANTO et al., 2009). Os níveis de compostos xenobióticos, oriundos de atividade antropogênicas, aumentaram de forma significativa nos ambientes aquáticos durante os últimos anos. Em decorrência deste aumento, a biota aquática está sujeita a um grande número de substâncias tóxicas que acabam prejudicando sua qualidade de vida (ARIAS et. al., 2007). Tais compostos podem levar os organismos a apresentarem distúrbios bioquímicos, como o estresse oxidativo em espécies que vivem em locais poluídos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULER, 2003).

Desta forma, peixes podem servir como indicadores de poluição em ambientes aquáticos, por meio da avaliação de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos (WALKER et. al., 1996). Os peixes são, portanto, ótimos candidatos para o biomonitoramento ambiental por estarem expostos aos estressores xenobióticos e por serem muito sensíveis a alterações ambientais no meio aquático (LEMOS et. al., 2007). A avaliação de biomarcadores em peixes pode fornecer dados sobre o prejuízo ambiental de áreas poluídas, ajudando no monitoramento dos ambientes aquáticos.

Sendo assim, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito de ambientes poluídos por efluentes industriais sobre biomarcadores de peixes. Mais especificamente, pretendeu-se comparar a peroxidação lipídica e os danos genotóxicos entre peixes de locais que recebem efluentes industriais e locais sem poluição.

Material e Métodos

A área de estudo incluiu trechos de riachos localizados na reserva ecológica do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas – Henrique Santillo da Universidade Estadual de Goiás, situada às margens do Km 98 da BR-153, município de Anápolis/GO. A área corresponde a um trecho do córrego Barreiro que recebe efluentes industriais e um trecho de nascente que forma um afluente do

córrego Barreiro. As exposições dos animais e coletas das amostras foram realizadas entre os meses de março e junho.

As características ambientais dos locais de amostragem foram avaliadas por meio da mensuração das variáveis limnológicas: oxigênio dissolvido (OD), pH, temperatura, potencial de óxido redução (ORP) e condutividade elétrica (CE), analisadas por meio de sonda multiparâmetro (YSI Professional Plus) e da profundidade, medida com profundímetro.

Para avaliar o efeito da poluição sobre biomarcadores foram utilizados lambaris da espécie *Astyanax lacustris* (lambari do rabo amarelo), espécie da nossa Bacia hidrográfica, obtidos de um estabelecimento comercial especializado em comercialização de iscas vivas e peixes ornamentais e transportados de acordo com as recomendações para transporte de peixes. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA da Universidade Estadual de Goiás com protocolo nº 004/2016.

Os lambaris foram colocados em viveiros de nylon, com 38cm de altura e 24cm de largura e introduzidos nos riachos. Para cada condição, trecho que recebe efluentes industriais e de nascente foram depositados, respectivamente, 10 e 13 viveiros com nove peixes em cada. Cada viveiro constituiu um *pool* de amostra. Os peixes tinham comprimento médio de $6,15 \pm 0,71$ cm no riacho que recebe efluente e $5,49 \pm 0,85$ cm na nascente. O período e exposição dos animais foi de aproximadamente 72 horas e, durante este período, os peixes não foram alimentados.

Para a coleta das amostras (sangue, brânquias e fígados) os animais foram anestesiados com eugenol diluído em água ($200\mu\text{L}/1000\text{mL}$). O sangue foi coletado por meio de veno punção com seringa heparinizada e transferido para um microtubo. Os fígados e as brânquias foram retirados e congelados no campo em nitrogênio líquido e transferidos, no laboratório, para freezer -80°C .

Para o teste de micronúcleo e demais anormalidades nucleares, foram confeccionadas lâminas pela técnica de esfregaço (extensões sanguíneas) as quais foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos e, após 24 horas, submetidas à reação de Feulgen que possui duas etapas importantes. A primeira etapa é uma hidrólise ácida em que as lâminas são colocadas em cubas e imersas em HCL a 10% durante 11 minutos em temperatura de 60°C . Na segunda etapa as lâminas são

colocadas nas cubas e imersas em reativo de Schiff (corante) por duas horas em local escuro e, posteriormente, lavadas por três vezes.

A análise de micronúcleo e demais anormalidades nucleares foram realizadas com auxílio de microscópio óptico sob objetiva de imersão (100x). De cada viveiro foram analisadas duas lâminas de um único. Ao todo foram analisados 3.000 eritrócitos de cada peixe (1.500 por lâmina) e, posteriormente, a frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares foram calculadas. As alterações nucleares foram classificadas de acordo com Carrasco (1990) e constituíram a análise de genotoxicidade.

Para a análise da peroxidação lipídica (marcador bioquímico) foi utilizado o produto formado entre o malondialdeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica, e o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (HEATH; PACKER, 1968). Para isso, os tecidos obtidos a partir de brânquias e fígados foram homogeneizados (1:3 massa:volume) em tampão Tris-HCl 0,1M, pH8,0. Após a homogeneização foram adicionados 150µL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) nas amostras. As mesmas foram incubadas em meio ácido, em temperatura de 90°C por 40 minutos. Posteriormente, as amostras foram resfriadas e adicionou-se 500µL de butanol. Após a centrifugação a 5.000rpm por 10 minutos para a extração do produto formado entre o MDA e o TBA no butanol, foram retirados 200uL da porção sobrenadante.

Os níveis de peroxidação lipídica foram então mensurados a partir da leitura por espectrofotometria em 535nm. A quantificação foi realizada pela comparação com uma curva padrão, de diferentes concentrações, de MDA obtida pela hidrólise de tetrametoxipropano (TEP) reagido com o TBA submetido às mesmas condições que as amostras. Os dados foram expressos em pmol/mg de tecido, ou seja, a absorbância obtida referente a 50mg de tecido.

Para comparar os valores das variáveis ambientais entre os riachos, utilizou-se o Teste *t* independente. Para avaliar o efeito dos riachos (que recebe efluentes industriais e a nascente) e das estações em que as amostras foram coletadas (março e abril que corresponde à seca e julho que corresponde à chuva) os valores de MDA, micronúcleo e demais anormalidades nucleares foram comparados por meio da Análise de Variância Fatorial (Two-Way ANOVA).

Resultados e Discussão

Os valores obtidos para as variáveis limnológicas e para profundidade nos trechos da nascente e nos trechos do riacho que recebe efluentes industriais estão apresentados na Tabela 1.

Verificou-se que houve diferença significativa entre os riachos para os valores de ORP, CE e profundidade. Os valores de ORP, também conhecido com potencial redox, foram maiores no riacho que recebe efluentes industriais ($p < 0,02$).

Tabela 1: Valores médios $\pm$ desvio padrão das variáveis ambientais nos riachos avaliados.

	Nascente	Riacho com efluentes
ORP (mV)	108,64 $\pm$ 35,56	76,46 $\pm$ 18,49 *
CE (μ S)	4,60 $\pm$ 1,13	39,18 $\pm$ 1,42 *
Profundidade (cm)	22,41 $\pm$ 2,60	45,05 $\pm$ 8,17 *
OD (mg/L)	7,96 $\pm$ 0,55	7,67 $\pm$ 0,15
pH	7,44 $\pm$ 0,76	7,37 $\pm$ 0,29
Temperatura ($^{\circ}$ C)	21,84 $\pm$ 0,58	21,29 $\pm$ 1,75

* Diferença estatisticamente significativa.

O valor de ORP representa a tendência de uma substância receber elétrons e pode ser usada para determinar o caráter redutor ou oxidante do corpo d'água (VALLE JUNIOR et al., 2013). Contudo o ORP não tem limite máximo ou mínimo exigidos pela resolução do CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005). Jardim (2014) afirma que os dados de ORP devem ser analisados com cautela uma vez que a cinética dos sistemas aquáticos naturais não permite condições de equilíbrio termodinâmico.

Os valores de CE obtidos nesta pesquisa para a nascente (4,60 $\pm$ 1,13 μ S/cm) e para o córrego que recebe efluente (39,18 $\pm$ 1,42 μ S/cm) estão dentro dos limites de condutividade para águas naturais estabelecidos pelo Ministério da Saúde. Segundo a resolução do CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005) não há limites para a CE. Contudo, segundo o Ministério da Saúde, águas naturais devem apresentar CE entre 10 a 100 μ S/cm, enquanto águas poluídas por esgotos domésticos ou industriais apresentam valores que podem chegar a 1.000 μ S/cm (BRASIL, 2014). Renovato, Sena e Silva (2013) afirmam que CE acima de 100 μ S/cm indica que a água sofreu algum impacto. Em relação à profundidade, embora os ambientes avaliados tenham apresentado diferenças, não há limites mínimos ou máximos segundo a legislação brasileira, até porque há uma enorme variação nos rios e riachos.

Os dados de OD para nascente (7,96 $\pm$ 0,55) e para o riacho que recebe efluentes industriais (7,67 $\pm$ 0,15) estão de acordo com os padrões preconizados pela Resolução 375/05 do CONAMA, que estabelece como limites mínimos igual a 6mg/L para recursos hídricos classe I, que inclui a nascente, e 5mg/L para recursos hídricos

classe II, que inclui o riacho que recebe efluentes industriais (BRASIL, 2005). O OD é o parâmetro mais significativo para analisar a qualidade de um ambiente aquático, pois avalia as condições naturais da água e detecta impactos ambientais como eutrofização e poluição orgânica (PINTO, 2007; VALLE JUNIOR et al., 2013; BRASIL, 2014).

O valores de pH obtidos na nascente ($7,44 \pm 0,76$) e no córrego que recebe efluentes ($7,37 \pm 0,29$) também estão dentro dos limites estabelecidos pela nossa legislação, que segundo a Resolução do CONAMA 375/05, valores de pH adequados para recursos hídricos de classe I e II devem estar entre 6 e 9 (BRASIL, 2005).

Em relação à temperatura, obtivemos uma média de $21,84 \pm 0,58$ na nascente e de $21,29 \pm 1,75$ no córrego poluído, temperaturas normais comparadas às temperaturas dos ambientes aquáticos brasileiros que apresentam valores entre 20°C e 30°C . Contudo, em regiões frias a temperatura pode chegar a valores entre 5°C e 15°C (BRASIL, 2014). Na Resolução do CONAMA N^o 357/05 não há limites de temperatura estabelecidos.

Não houve efeito da estação para os valores de micronúcleo e demais anormalidades nucleares, bem como para MDA ($p > 0,15$ e $p > 0,43$, respectivamente). Portanto, não houve variação dos dados em relação ao período em que as amostras foram coletadas.

A avaliação de genotoxicidade foi realizada pela técnica de micronúcleo, que são estruturas visíveis no citoplasma de células interfásicas resultantes de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que não se ligaram a fibra do fuso no processo de divisão celular (HEDDLE et al. 1983). Sua presença é um fenômeno natural, contudo exposições a compostos genotóxicos aumentam a sua frequência nas células após ciclos de divisão celular (SALVADORI et al., 2003; VILCHES, 2009).

Além da análise de micronúcleo também foram analisadas alterações morfológicas do núcleo. Essas alterações são chamadas de anormalidades nucleares (Figura 1) e são decorrentes de erros durante a divisão celular (FENECH, 2000).

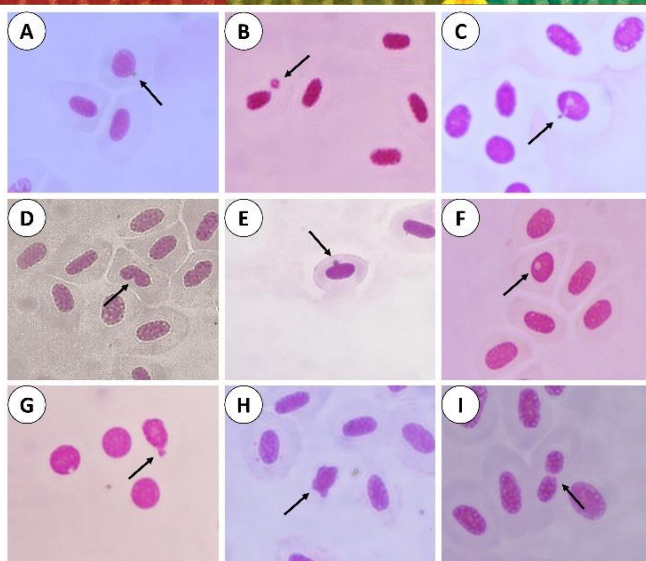


Figura 1: Micronúcleos e alterações nucleares em eritrócitos de *Astyanax lacustris*. A-C. micronúcleos; D. núcleo *notched*; E. núcleo *lobed*; F. vacúolo; G. núcleo *broken-eggs*; H. núcleo *blebbed*; I. célula binucleada.

A frequência de micronúcleos mostrou diferença significativa entre a nascente e o riacho que recebe efluentes industriais ($p=0,01$). Nas análises das anormalidades nucleares, *notched*, *lobed*, *blebbed* e células binucleadas não houve diferença significativa ($p>0,06$). Contudo os valores de vacúolos e *broken-eggs* apresentaram diferença

significativa ($p<0,01$ e $p=0,02$, respectivamente). Em relação ao total de anormalidades, encontramos

diferença significativa ($p<0,01$), indicando efeito da exposição ao riacho que recebe efluentes industriais.

A concentração de MDA foi analisada no tecido branquial, que possui relação direta com o ambiente aquático, sendo o primeiro órgão de contato com o ambiente e também no tecido hepático que, segundo Jimenez e Stegeman (1990), apresenta sensibilidade a xenobióticos e apresenta função importante no acúmulo, biotransformação e excreção de xenobióticos em peixes.

Os resultados de MDA obtidos em fígados e brânquias de *Astyanax lacustris* estão apresentados na Tabela 2. Não encontramos diferença

Tabela 2: Valores médios, $\pm$ desvio padrão, mínimo e máximo de MDA em brânquia e fígado de *Astyanax lacustris*.

Fígado	Brânquia	Riacho com efluentes	
		Fígado	Brânquia
71,31 $\pm$ 36,45	62,15 $\pm$ 20,53	64,81 $\pm$ 16,07	54,71 $\pm$ 7,85
40,83-132,67	37,12-119,75	35,55-88,33	43,56-65,25

significativa tanto para fígado quanto para brânquia entre a nascente e o riacho que recebe efluentes industriais ($p=0,31$ e $p=0,68$ respectivamente).

Entre as espécies de peixes, o nível de peroxidação lipídica pode variar bastante devido a diversidade nos mecanismos antioxidantes (AHMAD *et. al.*, 2000). Devido a isso não há valores fixos de MDA para peixes, o que faz com que a análise seja feita com a comparação de um grupo controle.

Considerações Finais

Nossos resultados mostram que a análise de micronúcleo e demais anormalidades nucleares é um importante biomarcador de alterações ambientais e que a presença de possíveis efluentes industriais pode causar o aumento dessas alterações em peixes, embora não tenha causado aumento nos valores de MDA. A avaliação das características ambientais, comparada aos valores de referência, é de grande importância, pois complementam as informações dos biomarcadores genotóxicos e biquímicos.

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Estadual de Goiás pela oportunidade de estar vinculado ao Programa de Bolsas de Iniciação Científica (PBIC). Somos gratos ainda a Felipe José Silva Xavier, Suellem Santana Ribeiro, Saulo Fernando de Oliveira Afonso, Naiane Ester Rezende Cruz Malagoli, Felipe Bonifácio de Souza, Pedro Paulino Borges e Lucas Guilherme Fonseca Silva pela ajuda de grande importância em laboratório e em campo.

Referências

AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA, M.; CHAND, H.S.; JAIN, S.K.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1523: 37-48, 2000.

ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBURQUERQUE, C.D.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M.; BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 12(1): 61-72, 2007.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.D.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, 23(4): 629-643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29(1): 113-126, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS** / Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. – Brasília: Funasa, 2014. 112 p.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005**. Brasília, 2005.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MAYERS, M.S. Assessment of the piscine micronuclei test as in situ biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, 47: 2123-2136, 1990.

ESPÍRITO-SANTO, H.M.V.; MAGNUSSON, W.E.; ZUANON, J.; MENDONÇA, F.P.; LANDEIRO, V.L. Seasonal variation in the composition of fish assemblages in small Amazonian forest streams: evidence for predictable changes. **Freshwater Biology**, 54(3): 536-548, 2009.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, 455: 81-95, 2000.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, 125(1): 189-198, 1968.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J.T.; NEWELL, G.W.; SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, 123(1): 61-118, 1983.

JARDIM, W.F. Measurement and interpretation of redox potential values (EH) in environmental matrices. **Quimica Nova**, 37(7): 1233-1235, 2014

JIMINEZ, B.D.; STEGEMAN, J.J. "Detoxification enzymes as indicator of environmental stress on fishes." **American Fish Society Symposium**, 8:69-79, 1990.

LEMOES, C.T.; RÖDEL, P.M.; TERRA, N.R.; DE OLIVEIRA, N.C.D.A.; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 66(3): 391-401, 2007.

MARGIS, R.; PICON, P.; COSNER, A.F.; SILVEIRA, R.D.O. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, 25(1), 65-74, 2003.

PINTO, M.C.F. Manual medição in loco: Temperatura, pH, Condutividade Elétrica e Oxigênio Dissolvido. Site da CPRM, 2007. Disponível em: <http://www.cprm.gov.br/publique/media/geologia_medica/manual_medicoes_T_%20pH_OD.pdf>. Acesso em: 10 julho de 2017

RENOVATO, D.C.C; SENA, C.P.S.; SILVA, M.M.F. Análise de parâmetros físico-químicos das águas da barragem pública da cidade de pau dos ferros (rn)–pH, cor, turbidez, acidez, alcalinidade, condutividade, cloreto e salinidade. **IX Congresso de Iniciação Científica do IFRN**. 2013.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste de micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Orgs.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 201-220. 2003

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie International Edition in English**, 25: 1058-1071, 1986.

VALLE JUNIOR, R.F.; ABDALA, V.L.; GUIDOLINI, J.F.; SIQUEIRA, H.E.; CANDIDO, H.G. Diagnóstico temporal e espacial da qualidade das águas superficiais do rio Uberaba – MG. **Caminhos de Geografia Uberlândia**, 14(45): 01-11, 2013.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13(2): 57-149, 2003.

VILCHES, M. **Análise genotóxica do rio cadeia/RS através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores**. Novo Hamburgo: Centro universitário Feevale, 2009.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of cotoxicology**. London: Taylor & Francis, 1996, 321 p.