



AValiação da Citotoxicidade, Genotoxicidade, Mutagenicidade IN VITRO DO Corante AZO Amido Black 10

Amanda Souza Scotti¹
Crislaine Maria Carvalho da Cruz Brambilla²
Juliana da Silva³

Resumo

Do ponto de vista ambiental, os corantes apresentam um grande potencial de poluição, dados seus elevados consumos em processos de coloração juntamente com a adição de aditivos. O corante Amido Black 10B está entre os corantes mais utilizados em todo o mundo em indústrias como têxteis, curtimento e gráficas. Devido à falta de dados toxicológicos sobre o corante azo Amido Black 10B, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade do mesmo para induzir danos em células HepG2 através do Teste MTT, Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo. No Teste MTT não apresentou baixa citotoxicidade, apresentando viabilidade celular acima de 70% em todas as concentrações utilizadas. Os resultados no Ensaio Cometa demonstraram que o corante Amido Black 10B foi capaz de induzir danos significativos em todas as concentrações testadas em relação ao controle negativo nas células HepG2. No entanto os resultados para o Teste de Micronúcleos o corante não foi capaz de induzir mutagenicidade, somente nas concentrações maiores. Os dados gerados nesta pesquisa indicam que o corante Amido Black 10B apresenta efeito genotóxico e mutagênico sobre células de mamífero. No entanto, são necessários mais estudos sobre este corante e outros corantes azo, a fim de que se possa estabelecer os riscos de sua liberação ao ambiente.

Palavras chave: //; ; ; ; ;

INTRODUÇÃO

As águas superficiais tais como, rios, lagos e mares, recebem grandes quantidades de rejeitos de fontes industriais, agrícolas e domésticas, sendo que a indústria é a atividade que mais contribui para a contaminação ambiental. Do ponto de vista ambiental, os corantes apresentam um grande potencial de poluição, dados seus elevados consumos em processos de coloração juntamente com a adição de aditivos (ligantes, espessantes, resinas) nas etapas de pré-coloração. Os corantes e pigmentos orgânicos podem ser definidos como substâncias intensamente coloridas, que quando aplicadas a um material, lhe conferem cor (GUARATINI; ZANONI, 2000).

O corante Amido Black 10B (Figura 1) está na lista dos corantes mais utilizados mundialmente. Não existem estudos de mutagenicidade com esse corante, mas existe uma revisão de Chung e Cerniglia (1992) relacionando mutagenicidade e estrutura atômica de outros corantes com estrutura similar ao Amido Black 10B, onde todos que tem essa estrutura similar demonstraram ser mutagênicos.

1 Aluno do curso de graduação – Bolsista PROBIC/FAPERGS – amanda_scotti15@hotmail.com

2 Aluna do Pós Graduação – Bolsista Capes – cris289cruz@hotmail.com

3 Professor do curso de graduação Juliana da Silva – julianadasilva@uol.com.br

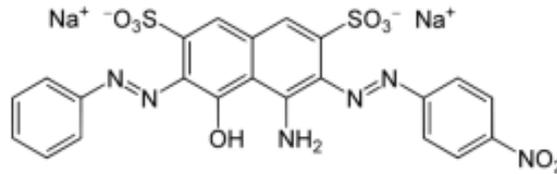


Figura 1: Estrutura química do corante Amido Black 10B.

O presente estudo teve por objetivo geral avaliar a capacidade do corante azo Amido Black 10B, amplamente utilizado na indústria gráfica, de couro e têxtil, em induzir danos ao material genético.

METODOLOGIA

Para realização do estudo foi cultivada em meio DMEM High Glucoso acrescido de 10% de soro fetal bovino, uma linhagem celular de hepatoma humano (Hep G2) e mantidas em atmosfera de CO₂ 5% em temperatura de 37°C. A partir destas células foram realizados os testes: MTT, Ensaio Cometa e Micronúcleo.

O teste MTT teve por objetivo avaliar a citotoxicidade do corante Amido black 10. As células foram semeadas e cultivadas durante 24 h. Amido Black 10B foi dissolvido em água e meio de cultura celular. Em seguida, as células foram expostas durante 3h a sete concentrações diferentes de Amido Black 10B (0,03125 mg.mL⁻¹ A 2 mg.mL⁻¹). A dose máxima foi escolhida de acordo com a recomendação de OCDE para os ensaios de produtos químicos e teste de Micronúcleos (2014). No final do tratamento, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e incubadas. Após a incubação, o MTT foi removido e foi adicionado 200 µL de DMSO. A suspensão foi lida no espectrofotômetro e a densidade óptica (OD). A presença de células viáveis é visualizada pelo desenvolvimento da cor roxa devido à formação de Cristais de formazan. O controlo positivo foi DMSO a 20% E o controlo negativo foram células com DMEM. A viabilidade celular foi determinada usando a equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Média de tratamento OD}}{\text{Controlo negativo OD}} \times 100\%$$

O ensaio foi realizado em duplicata.

O Ensaio cometa (KAPCZINSKI et al., 2004) visa avaliar os danos genéticos causados em decorrência a exposição a agentes genotóxicos. As células Hep G2 advindas do cultivo celular são expostas ao Azo corante Amido Black 10B por 3 horas. Após, a amostra é dispensada em lâminas pré-cobertas com agarose. Levadas a solução lise por 1 hora e meia. E levadas a eletroforese, onde é passada uma corrente elétrica, como o DNA possui carga, caso esteja rompido irá migrar para fora do núcleo, parecendo assim com um cometa, que pode ir desde a classe 0 até a 4. Após, as lâminas são neutralizadas, fixadas e coradas com nitrato de prata. A análise das lâminas é feita em duplicata, com 100 células por poço.

O Teste de Micronúcleos (Andrade et al., 2004) é capaz de identificar danos ao DNA, causados por agentes físicos, químicos ou biológicos. O micronúcleo é resultado da perda de um fragmento ou de um cromossomo inteiro, do núcleo principal, formando um pequeno núcleo independente na célula. Esse Micronúcleo é originado por erro na fase mitótica, causado por aneugênese ou clastogênese. A metodologia do Teste consiste na inserção da amostra advinda da Cultura celular na Citocentrífuga, por 5 minutos à 700 RPMs. Após as lâminas são coradas e então analisadas. Nas análises são verificadas em 500 células as divisões celulares (mono, bi, tri e poli celulares) e em 1000 os danos celulares: Micronúcleos, Brotos Celulares (BUD) e as Pontes nucleares. Além de apoptose e necrose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A citotoxicidade do Amido Black 10B foi avaliada pelo método que se baseia na medida da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial que, quando ativa, é capaz de metabolizar o reagente MTT. Os resultados para o Teste MTT indicam que nenhuma das concentrações conduz a uma citotoxicidade elevada, um vez que todas as doses mostraram viabilidade celular acima de 70% (Figura 2).

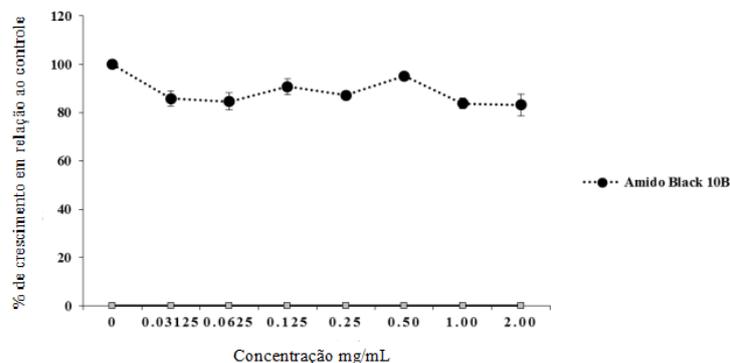
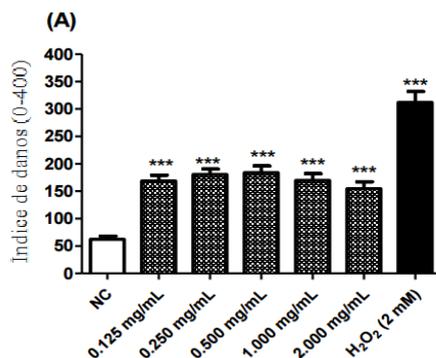


Figura 2: Citotoxicidade de Amido Black 10B em células HepG2 por ensaio MTT.

Os resultados para o Teste de Cometa expostas as concentrações de Amido Black 10B expressas em Índice de Danos (DI) e Frequência de Danos (DF), apresentaram-se significativas em relação ao controle negativo em DI e DF (Figura 3). Para o Ensaio Cometa a detecção do dano ao genoma das células HepG2 ocorreu apresentando diferenças significativas mesmo na concentração mais baixa em relação ao controle negativo. O Ensaio utilizado neste trabalho reflete a ação do agente em quebras simples e duplas do DNA, dano oxidativo, sítios álcali-lábeis, crosslinks DNA-DNA, DNA-proteína e indução de apoptose. (DUSINSKA & COLLINS, 2008).



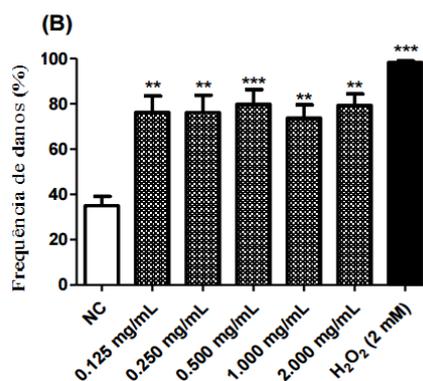


Figura 3: Genotoxicidade para HepG2 exposta a diferentes concentrações de Amido Black 10B. *** p <0,001, significativamente diferente em relação ao controle negativo.

Para o Ensaio Micronúcleo foram analisadas frequência de Micronúcleos (MN), Pontes celulares (NPB) e brotos nucleares (NBUD) foram encontrados em 1000 células binucleadas e analisada a proliferação pelo índice de divisão nuclear (NDI). Necrose e apoptose (Tabela 1). O Teste de Micronúcleos além de identificar danos genotóxicos, também pode identificar citotoxicidade através da análise do índice de divisão nuclear (IDN). No entanto o teste MN demonstrou que houve aumento significativo de danos ao DNA através do aumento de MN nas 2 concentrações maiores, mas não se observou aumento de morte celular para qualquer das concentrações testadas em células HepG2. Aumento de MN representam efeito mutagênico induzido pelo corante. Aumento de MN está relacionado com aumento no desenvolvimento de câncer (GOLKA, et al., 2004).

Tabela 1: Detecção de Frequência de Micronúcleos (MN), Pontes Nucleoplasmáticas (NPB), Botões Nucleares (NBUD), Divisão Nuclear(NDI), Células Binucleadas (BN), Células Apoptóticas e Necróticas em CBMN Ensaio com culturas de células HepG2 tratadas com Corante Amido Black 10B.

Parâmetros	Controle Negativo ^a	Concentração					Controle Positivo
		2.0 mg/ml	1.0mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/ml	0.125mg/ml	
Proliferação celular (1000 células)							
NDI	1.33 ± 0.19	1.17 ± 0.07	1.19 ± 0.05	1.31 ± 0.15	1.34 ± 0.16	1.31 ± 0.16	1.22 ± 0.10
BN	306.30 ± 181.10	140.80 ± 53.80	163.80 ± 30.20	273.80±129.60	309.50±155.20	299.30±157.90	201.50±104.10
Danos ao DNA (1000 binucleadas)							
MN	1.75 ± 0.50	8.50 ± 5.80	5.75 ± 5.50	6.25 ± 2.87	3.75 ± 2.50	3.00 ± 0.82	12.50 ± 4.35*
NPB	2.00 ± 0.82	9.75 ± 9.74	3.75 ± 2.50	2.50 ± 3.00	4.00 ± 3.16	2.00 ± 0.81	4.25 ± 4.57
NBUD	3.50 ± 2.51	16.75 ± 9.98	9.25 ± 6.50	10.75 ± 9.57	8.25 ± 7.09	5.75 ± 2.87	19.00 ± 4.24*
Morte celular (1000 células)							
Apoptose	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.58	0.75 ± 0.96	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50
Necrose	1.00 ± 1.41	0.50 ± 1.00	1.50 ± 1.29	1.75 ± 1.71	1.00 ± 0.82	0.50 ± 0.58	0.25 ± 0.50

^a Meio de Cultura; ^b Benzo [a] pireno (10 μ L); * Significativo de P <0,05 em relação ao controle negativo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados gerados nesta pesquisa indicam que o corante Amido Black 10B apresenta efeitos genotóxicos e mutagênicos em células de mamíferos na sua forma pura. Esse corante pode estar parcialmente relacionado com a toxicidade observada nos estudos realizados com animais e com linhagens celulares expostos a efluentes de indústrias gráficas, de couro e têxtil

que utilizam corantes azo em seus processos de tingimento. No entanto, mais estudos voltados aos corantes azo são necessários a fim de que se possa estabelecer critérios para o descarte seguro desses xenobióticos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE VM, SILVA J da, SILVA FRda, HEUSER VD, DIAS JF, YONEAMA ML, FREITAS TRO. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the comet assay and micronucleus test. **Environ Mol Mutagen.** v. 44, p. 459-68, 2004.

CHUNG KT, E CERNIGLIA CE. Mutagenicity of azo dyes: Structure-activity relationships. **Mutat Res,** v.277 p.201-20, 1992.

DA SILVA J, HERRMANN S M, HEUSER V, PERES W, MARRONI P N, GONZ_ALEZ-GALLEGO J, ERDTMANN B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food Chem. Toxicol,** v. 40, p. 941-947, 2002

DUSINSKA M, COLLINS A R. The comet assay in human biomonitoring: gene environment interactions. **Mutagen,** v.23, p.191-205, 2008.

FENECH M, HOLLAND N, CHANG WP, ZEIGER E, BONASSI S. The Human Micronucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mut Res.** v.428, p.271-83, 1999.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols,** p.1084-1104, 2007.

GUARATINI CCI, ZANONI MVB. Textile dyes. **Quim Nova,** v.23, p.71-8, 2000.

GOLKA K, KOPPS S, MYSLAK ZW. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicology letters,** v.151, p.203-210, 2004

KAPCZINSKI F, FREY B N, FONSECA MMR, VIEIRA R M, SOARES J. Neuropathological and neurochemical abnormalities in bipolar disorder. **Rev Bras Psiquiatria,** v.26, p.180-8, 2004

SENTHILKUMAR S, PERUMALSAMY M, PRAHBU H.J. Decolourization potential of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on synthetic dye bath effluent containing amido black 10B. **Journal of Saudi Chemical Society,** v.18, p.845- 853, 2011.