



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

LUIZA FLAVIA VEIGA FRANCISCO

**EFEITOS TOXICOGENÉTICOS DE CONTAMINANTES QUÍMICOS
DETECTADOS EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS UTILIZANDO ENSAIOS *IN VITRO***

**DOURADOS- MS
2019**

LUIZA FLAVIA VEIGA FRANCISCO

**EFEITOS TOXICOGENÉTICOS DE CONTAMINANTES QUÍMICOS
DETECTADOS EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS UTILIZANDO ENSAIOS *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Área de concentração: Ciência Ambiental.

Orientadora: Profa. Dr. Alexeia Barufatti Grisolia

**DOURADOS- MS
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

F818e Francisco, Luiza Flavia Veiga
Efeitos toxicogenéticos de contaminantes químicos detectados em águas subterrâneas utilizando ensaios in vitro [recurso eletrônico] / Luiza Flavia Veiga Francisco. -- 2019.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Alexeia Barufatti Grisolia.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Água para consumo humano. 2. Metais. 3. Contaminantes emergentes. 4. Citotoxicidade. 5. Genotoxicidade. I. Grisolia, Alexeia Barufatti. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA,
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL

Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Efeitos toxicogénéticos de contaminantes químicos detectados em águas subterrâneas utilizando ensaios *in vitro*”**, de autoria de **Luiza Flavia Veiga Francisco**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof.^a Dr.^a Alexeia Barufatti Grisolia
Presidente da banca examinadora

Prof. Dr. Henrique César Santejo Silveira (participação remota)
Membro Examinador (Fundação Pio XII)

Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos
Membro Examinador (UFGD)

Dr. Bruno do Amaral Crispim
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 18 de abril de 2019.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

UFGD
Universidade Federal
da Grande Dourados

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA AMBIENTAL
LINHA DE PESQUISA: MONITORAMENTO FÍSICO, QUÍMICO E BIOLÓGICO PARA O
ESTUDO DE IMPACTOS AMBIENTAIS

**DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO À DISTÂNCIA - SÍNCRONA - EM BANCA DE DEFESA DE
MESTRADO/ UFGD**

Às 8h:00min do dia 18/04/2019, participei de forma síncrona com os demais membros que assinam a ata física deste ato público, da banca de Defesa da Dissertação de Mestrado do candidato **Luiza Flavia Veiga Francisco**, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Considerando o trabalho avaliado, as arguições de todos os membros da banca e as respostas dadas pelo candidato, formalizo para fins de registro, por meio deste, minha decisão de que o candidato pode ser considerado: _Aprovada_ (Aprovado(a) ou Reprovado(a)).

Atenciosamente,

Hospital de Câncer de Barretos

Programa de Pós-Graduação em Oncologia

*“O Senhor é a minha força e o meu escudo;
nele o meu coração confia, e dele recebo
ajuda. Meu coração exulta de alegria, e
com o meu cântico lhe darei graças”.*

Salmos 28:7

AGRADECIMENTOS

A **Deus** em primeiro lugar pela minha vida, por me guiar, iluminar, me dar tranquilidade para seguir em frente em busca de meus sonhos e não me deixar desanimar com as dificuldades. Obrigada Pai por ser essencial na minha vida, meu guia e socorro nas horas difíceis, por me permitir errar, aprender e crescer, por seu amor infinito e por me manter firme e forte.

Aos meus pais, **Djaír** e **Valéria**, por sempre me apoiarem em minhas escolhas e sonhos, por se doarem muitas vezes para que eu pudesse realizá-los. Quero que saibam que esta conquista não é somente minha, mas nossa, pois, tudo que consegui alcançar só foi possível com a ajuda e apoio de vocês. Minha eterna gratidão!

Aos meus irmãos **Neto**, **Junior** e **Stéfani** e ao meu namorado **Thiago** meu muito obrigada por sempre me motivarem, entenderem minhas faltas e momentos longe, por serem pessoas parceiras e especiais, sempre dispostas a me ajudar e darem palavras de conforto e incentivo. Ao meu sobrinho **Fernando**, por esses dois anos me fazer querer voltar sempre para casa, para ver ele aprendendo a escrever e ler, ajudá-lo nas tarefas e ouvir ele me chamar de tia Lu (não há alegria maior), a minha sobrinha **Lavinia**, por me alegrar pela sua existência e por me fazer querer estar perto para vê-la falar e caminhar.

A minha querida orientadora **Alexeia**, pela orientação, confiança, dedicação e incentivo nas horas que me sentia confusa. A senhora sempre foi muito mais que orientadora, foi uma amiga, conselheira e mãe, tenho muito orgulho de tê-la como uma das responsáveis pela minha formação. Obrigada pelos ensinamentos, palavras de conforto, amizade, paciência e puxões de orelha quando necessários. Tenho o prazer em dizer que um dia fui sua orientada e me espelho na senhora na busca de sempre me tornar melhor no que faço.

Ao doutor **Bruno**, meu amigo e irmão de coração, pelo apoio e ajuda constante no laboratório, ensinamentos, orientações e dedicação desde a época da graduação. Agradeço todo tempo que passou do meu lado (que não foram poucos), por ser sempre aquela pessoa que eu podia contar em todas as horas e por nunca medir esforços para me ajudar independentemente do que eu precisasse. Você é um exemplo de dedicação, empenho e solidariedade. Muito obrigado por tudo!

Aos meus amigos, irmãos e companheiros de laboratório, **Felipe**, **Hélina** e **Milena** por deixarem o ambiente de trabalho mais alegre e esta jornada mais leve, pela amizade, apoio e ajuda quando necessitei. Agradeço por cada momento vivido e cada crise de risada compartilhada. Obrigada!

*As minhas amigas de mestrado e da vida, **Lidiany, Éliada e Fernanda**, por cada momento dividido, por serem sempre aquelas pessoas que eu podia recorrer quando triste, angustiada ou alegre. Por se tornarem mais que amigas, verdadeiras irmãs, que fizeram esses 2 anos se tornarem mais alegres. Obrigada por fazerem eu me divertir e relaxar mais, por cada conselho (sejam bons ou ruins) e por me fazer sentir que sempre poderei contar com vocês. Gratidão por essa amizade e por cada cerveja tomada!*

*A doutora **Débora**, pelos ensinamentos, amizade e risadas. Por me ensinar quase tudo que sei sobre cultivo celular e por ter tido muita paciência comigo nesse trajeto. Obrigada por ter se tornado uma amiga que sempre me lembrarei com muita doçura.*

*A doutora **Lucilene**, por sempre estar disposta a me ajudar e ensinar estatística, por ser dedicada aos trabalhos em parceria e por se tornar uma amiga que quero levar para o resto da vida.*

*Aos meus amigos, **Renan, Nathalia, Renata, Ana Caroliny e Gabriela** que trago comigo desde a época da graduação e sei que sempre poderei contar independente de tudo. Que mesmo distantes às vezes, por trilharmos caminhos diferentes, sempre foram pessoas dispostas a me ouvir e ajudar, pessoas que poderei contar sempre.*

*Ao Prof. Dr. **Edson Lucas dos Santos**, pela parceria estabelecida para que eu pudesse realizar parte dos meus experimentos em seu laboratório, pelo auxílio nas análises dos resultados e orientação.*

*A Prof^a. Dra. **Cassiana Carolina Montagner Raimundo**, pela realização das análises de contaminantes emergentes em seu laboratório na UNICAMP.*

*Ao Prof. Dr. **Valter Aragão do Nascimento**, pela análise de determinação de metais, em seu laboratório na UFMS.*

*Ao Prof. Dr. **Fabio Kummrow**, pelo auxílio na metodologia de avaliação de risco.*

*Ao doutorando **Julio Jub**, pela realização das análises de uso e cobertura de solo e mapas.*

*Ao Prof. Dr. **Jorge Luiz Raposo Junior** por ter nos concedido a solução padrão dos metais.*

Às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, analisando lâminas, doando e coletando sangue e ajudando nos experimentos, meu sincero obrigada.

À Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, pela infraestrutura e apoio para realização deste trabalho. A todos professores pelos conhecimentos passados.

À FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul), FUNASA (Fundação Nacional de Saúde) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro a pesquisa e bolsas concedidas.

Foi muito difícil escrever tantos sentimentos em palavras, mas quero deixar minha eterna gratidão a cada um de vocês que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Obrigada.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”.

Charles Chaplin

RESUMO

O aumento das atividades antrópicas proporcionado pelo crescimento populacional tem promovido maior descarga de resíduos no meio ambiente e conseqüentemente a contaminação química e biológica dos recursos hídricos. Os contaminantes químicos em níveis acima dos limites permitidos pela legislação nas águas subterrâneas podem gerar impactos negativos para a saúde pública, visto que, alguns compostos apresentam características de bioacumulação e biomagnificação, além da sua ação tóxica e genotóxica aos organismos expostos. Diante disso, este estudo teve como objetivos: 1) determinar metais e contaminantes emergentes em águas subterrâneas; 2) associar a presença destes contaminantes com o uso e ocupação do solo; 3) avaliar o risco para a população exposta a esta água; e, 4) avaliar os efeitos da citogenotoxicidade de concentrações de alumínio e manganês em células de CHO e CHO-XRS5. Para tanto, amostras de águas subterrâneas foram coletadas nas cidades de Caarapó e Itaporã no estado do Mato Grosso do Sul. Análises dos parâmetros físico-químicos e determinação de metais e contaminantes emergentes foram realizadas para avaliação da qualidade da água. O uso e cobertura do solo foi avaliado para determinar as possíveis fontes que influenciam na contaminação das águas subterrâneas. Os potenciais riscos à saúde humana dos elementos químicos identificados nessa água foram calculados por meio da avaliação de risco. Os resultados indicaram alumínio, ferro, manganês e níquel com valores superiores aos permitidos pelas legislações de referência e cromo, cobalto, manganês e níquel em concentrações acima do considerado seguro para saúde humana. Além dos metais, também foram identificados contaminantes emergentes. Considerando os resultados referentes às concentrações de alumínio e manganês, estes foram selecionados para análises de citogenotoxicidade. Os testes do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}, micronúcleo e ensaio do cometa em células de CHO e CHO-XRS5 foram utilizados para essas análises. Quando analisado os efeitos citotóxicos e genotóxicos nessas linhagens celulares, foi observado que tanto o alumínio quanto o manganês induziram a perda significativa da viabilidade celular e aumento dos danos genéticos nas células expostas, mesmo em baixas concentrações. Os resultados deste estudo podem contribuir com informações que auxiliem órgãos fiscalizadores para a melhoria dos limites padrões atualmente propostos pela legislação vigente e servirem como alerta para as pessoas que utilizam essa água para consumo.

Palavras-chave: Água para consumo humano; metais; contaminantes emergentes; alumínio; manganês; citotoxicidade; genotoxicidade, linhagem CHO, linhagem CHO-XRS5.

ABSTRACT

The increase of the anthropic activities provided by the population growth has promoted greater discharge of waste in the environment and consequently the chemical and biological contamination of the water resources. Chemical contaminants at levels above the limits permitted by legislation in groundwater may generate negative impacts on public health, since some compounds have characteristics of bioaccumulation and biomagnification, in addition to their toxic and genotoxic action to exposed organisms. Therefore, this study aimed to: 1) determine metals and emerging contaminants in groundwater; 2) to associate the presence of these contaminants with the land use and cover; 3) evaluate the risk to the population exposed to this water; and 4) to evaluate the effects of cyto-genotoxicity of aluminum and manganese concentrations on CHO and CHO-XRS5 cells. The groundwater was collected in 2015 in the cities of Caarapó and Itaporã in the state of Mato Grosso do Sul. For the evaluation of the water quality, the analysis of the physico-chemical parameters and determination of the metals and emerging contaminants was carried out. Soil use and cover has been evaluated to determine possible sources that influence groundwater contamination. The potential human health risks of the chemical elements identified in this water were calculated by means of the risk assessment. The results indicated aluminum, iron, manganese and nickel with values higher than those permitted by reference legislation and chromium, cobalt, manganese and nickel in concentrations above that considered safe for human health. In addition to metals, emerging contaminants were also identified. Considering the results regarding the concentrations of aluminum and manganese, these were selected for cytogenotoxicity analysis. MTT tests ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide], micronucleus and comet assay on CHO and CHO-XRS5 cells were used for these analyzes. When analyzing the cytotoxic and genotoxic effects in these cell lines, it was observed that aluminum and manganese induced significant loss of cell viability and increased genetic damage in exposed cells, even at low concentrations. The results of this study can contribute with data that helps watch agencies to improve the current limits proposed by current legislation and serve as an alert for people who use this water for consumption.

Keywords: Water for human consumption; metals; emerging contaminants; aluminum; manganese; cytotoxicity; genotoxicity; CHO cell line; CHO-XRS5 cell line.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| Fig. 1 Porcentagem de água consumida pelas principais atividades antrópicas no Brasil..... | 19 |
| Fig. 2 Aquíferos presentes no estado do Mato Grosso do Sul. | 21 |
| Fig. 3 Principais fontes de origem da contaminação dos mananciais subterrâneos. | 23 |
| Fig. 4 Exemplos da bioacumulação e biomagnificação de contaminantes químicos..... | 24 |
| Fig. 5 Etapas do processo de carcinogênese..... | 26 |
| Fig. 6 Etapas da análise e avaliação do risco. | 27 |
| Fig. 7 Micrografia de contraste de células de ovário de hamster chinês (CHO) em cultivo.... | 28 |
| Fig. 8 Formação do micronúcleo durante a divisão celular. | 30 |
| Fig. 9 Células com a) alterações cromossômicas (micronúcleo, brotamento nuclear e ponte nucleoplasmática). | 30 |
| Fig. 10 Micrografia do cometa ilustrando a cabeça do nucleóide pequena e a cauda..... | 31 |

CAPÍTULO II

| | |
|---|----|
| Fig. 1 Imagem aérea do Google Earth obtida pelo satélite GeoEye ⁻¹ e os pontos de coleta selecionados nas cidades de Itaporã (I01-I12) e Caarapó (C01-C11) localizados no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil..... | 40 |
| Fig. 2 Mapa de uso e ocupação do solo dos diferentes pontos de coleta de água analisados nas cidades de (A) Itaporã (I01-I12) e (B) Caarapó (C01-C11). | 44 |
| Fig. 3 Metais com concentrações quantificadas (CQ) e o cálculo do critério de qualidade de água (CQA) nos pontos das cidades de (A) Itaporã e (B) Caarapó. | 51 |

CAPÍTULO III

| | |
|--|----|
| Fig. 1 Viabilidade das células CHO e CHO- XRS5. As células foram tratadas com diferentes concentrações de Al (A) e Mn (B) durante 24 e 72 h..... | 66 |
| Fig. 2 Média de brotamento nuclear em 1000 células binucleadas de CHO e CHO-XRS5 tratadas com (A) Al e (B) Mn, durante os períodos de 24 h e 72 h de incubação..... | 68 |
| Fig. 3 Média de MN em 1000 células binucleadas de CHO e CHO-XRS5 tratadas com (A) Al e (B) Mn, durante os períodos de 24h e 72h de incubação..... | 69 |
| Fig. 4 Análise de Coordenadas Principais (PCoA) entre os metais Al e Mn para as células: A) CHO e B) CHO-XRS5. | 72 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Caracterização e dados físico-químicos dos poços de Itaporã e Caarapó..... | 46 |
| Tabela 2. Identificação e quantificação de metais em água coletadas nos poços de Itaporã e Caarapó..... | 47 |
| Tabela 3. Concentrações dos compostos emergentes em amostras de água de poços da cidade de Itaporã..... | 49 |
| Tabela 4. Concentrações de contaminantes emergentes detectados em amostras de água de poços da cidade de Caarapó..... | 50 |

CAPÍTULO III

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Danos no DNA mensurados pelo ensaio do cometa em células de CHO e CHO-XRS5 expostas a diferentes concentrações de Al e Mn por 24 e 72h..... | 71 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente

ANA- Agência Nacional de Águas

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

DNA- Ácido desoxirribonucleico

CHO- Células de ovário de hamster chinês

MS- Mato Grosso do Sul

MTT- Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio

VMP- Valor máximo permitido

CQA- Critério de qualidade de água

UNT- Unidade nefelométrica de turbidez

OD- Oxigênio dissolvido

CE – Condutividade elétrica

STD- Sólidos totais dissolvidos

pH- Potencial hidrogeniônico

LD- Limite de detecção

LQ- Limite de quantificação

MDL- Limite máximo detectado

MQL- Limite máximo quantificado

HAM F10- Mistura nutritiva

DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

SBF- Soro bovino fetal

CP- Controle positivo

CN- Controle negativo

MN- Micronúcleo

IDN- Índice de divisão nuclear

EROs- Espécies reativas de oxigênio

HT-29- Células de adenocarcinoma de colorretal humana

SH-SY5Y- Células de neuroblastoma humano

BV-2- Células 289 microgliais murinas

8-OHdG- 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine

mtDNA- Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

PCoA- Análise de coordenadas principais

LISTA DE SÍMBOLOS

%- porcentagem

°C – grau Celsius

< - menor que

> - maior que

Al- alumínio

Mn- manganês

Fe- ferro

Cr- cromo

Zn- zinco

Cu- cobre

Ni- níquel

Na- sódio

K- potássio

Co- cobalto

Cd- cádmio

CO₂- dióxido de carbono

NaOH- hidróxido de sódio

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

ng- nanograma

L- litro

µm- micromolar

mL – mililitro

mg- miligrama

nm- nanômetro

µg- micrograma

m- metro

mS- miliSiemens

ppt- partes por trilhão

min- minutos

h- horas

rpm- rotação por minuto

V- volt

mA- miliampère

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2 OBJETIVOS..... | 17 |
| 2.1 Objetivo geral | 17 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 17 |
| | |
| CAPÍTULO I..... | 18 |
| 1 Distribuição e consumo dos recursos hídricos superficiais e subterrâneos no Brasil | 19 |
| 2 Recursos hídricos subterrâneos no Mato Grosso do Sul (MS)..... | 20 |
| 3 Contaminação ambiental | 22 |
| 3.1 Contaminação por Metais..... | 23 |
| 3.2 Contaminantes emergentes..... | 24 |
| 4 Efeitos causados pelos contaminantes para a biota aquática e saúde humana | 25 |
| 5 Avaliação de risco e fontes poluidoras | 26 |
| 6 Ensaios biológicos para avaliação de danos citotóxicos e genotóxico..... | 28 |
| REFERÊNCIAS | 32 |
| | |
| CAPÍTULO II..... | 37 |
| Resumo | 38 |
| Abstract..... | 38 |
| 1. Introdução..... | 39 |
| 2. Material e métodos | 40 |
| 2.1. Área de estudo e caracterização dos poços estudados | 40 |
| 2.2. Análise do uso e cobertura do solo | 41 |
| 2.3. Caracterização físico-química de águas subterrâneas | 42 |
| 2.4. Análises químicas | 42 |
| 2.4.1. Amostragem de águas subterrâneas e determinação de metais | 42 |
| 2.4.2. Amostragem de águas subterrâneas e determinação de contaminantes emergentes | 42 |
| 2.5. Critérios de qualidade da água subterrânea (CQA) para consumo humano e avaliação de risco | 43 |
| 3. Resultados e discussão | 44 |
| 3.1. Perfil do uso e cobertura do solo | 44 |
| 3.2. Caracterização físico-química | 45 |
| 3.3. Determinação de metais em amostras de águas subterrâneas..... | 47 |

| | |
|---|----|
| 3.4. Determinação de contaminantes emergentes em águas subterrâneas..... | 49 |
| 3.5. Avaliação de risco humano de contaminantes encontrados em água subterrânea | 50 |
| 4. Conclusão..... | 52 |
| Referências | 53 |
| MATERIAL SUPLEMENTAR | 57 |
| | |
| CAPÍTULO III | 60 |
| Resumo | 61 |
| Abstract..... | 61 |
| 1. Introdução..... | 62 |
| 2. Material e Métodos..... | 63 |
| 2.1 Cultura celular | 63 |
| 2.2 Determinação das concentrações e tratamentos | 63 |
| 2.3 Ensaio de citotoxicidade..... | 63 |
| 2.4 Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese..... | 64 |
| 2.5 Ensaio de eletroforese em gel de célula única alcalino (Ensaio do cometa)..... | 64 |
| 2.6 Análises estatísticas | 65 |
| 3. Resultados e Discussão | 65 |
| 3.1 Citotoxicidade..... | 65 |
| 3.2 Teste do micronúcleo (MN) | 68 |
| 3.3 Ensaio do cometa..... | 70 |
| 4. Conclusão..... | 73 |
| Referências | 73 |
| Considerações finais..... | 77 |
| ANEXO | 78 |

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que detém a maior reserva hidrológica no mundo, porém, os resíduos gerados pelo crescimento acelerado das atividades antrópicas têm ocasionado a contaminação do meio ambiente, principalmente dos recursos hídricos por meio do processo de percolação e/ou lixiviação (KUMAR et al., 2017; PATEL et al., 2016). Essa contaminação compromete a qualidade da água e pode causar o desequilíbrio do ecossistema.

Os metais e contaminantes emergentes são compostos que estão presentes na água são oriundos tanto de processos geológicos como de contaminação humana (SZYCZEWSKI et al., 2009; LI et al., 2017). Alguns destes elementos apresentam propriedades de bioacumulação e biomagnificação, persistindo no meio ambiente e atingindo os seres humanos (KOKI et al., 2015; STANKOVIC; STANKOVIC, 2013). Devido a isso, a atuação de órgãos governamentais é de extrema importância, pois regulamentam a presença e quantidade destes elementos químicos no ambiente. No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (BRASIL, 2008) estabelece os valores limites para compostos químicos na água subterrânea. Porém, alguns compostos (principalmente contaminantes emergentes) não apresentam valores de referência nas legislações vigentes, o que pode estar relacionado a falta de dados sobre esses elementos na matriz aquática e seus possíveis efeitos (MONTAGNER et al. 2017).

Diante disso, a identificação de fontes poluidoras torna-se uma análise relevante para o biomonitoramento da qualidade da água. Com isso, a avaliação do uso e cobertura do solo no entorno dos recursos hídricos constitui uma importante ferramenta, pois, as atividades realizadas próximas do ambiente aquático podem afetar a qualidade da água (DING et al., 2016; PARK et al., 2014; YU et al., 2016).

Outra análise aplicada nos estudos de avaliação da qualidade da água é a avaliação de risco. Essa metodologia consiste em estimar a probabilidade da ocorrência de efeitos adversos à saúde humana exposta a ingestão oral de químicos presentes na água (UMBUZEIRO et al., 2010). Dentre os diversos compostos químicos presentes no ambiente aquático podem-se destacar os metais.

O Al e Mn são exemplos de metais amplamente distribuídos nos compartimentos ambientais, principalmente por serem muito utilizados na indústria, mineração, agricultura e tratamento de água. Estes metais em concentrações elevadas podem representar riscos à saúde humana, causando efeitos de toxicidade, aumento da incidência de problemas

neurodegenerativos e danos genéticos (ALIMBA et al., 2016; DJOUINA et al., 2016; WANG et al., 2016).

Testes para avaliar a proliferação celular, viabilidade das células e danos genotóxicos são essenciais para identificação e detecção de danos causados a células após exposição a compostos químicos. Um dos testes mais utilizados para avaliação da viabilidade celular em testes *in vitro* é o teste do MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il), no qual se baseia na redução do sal tetrazólio em cristais de formazan (DJOUINA et al., 2016; RAJIV et al., 2016; RIZVI et al., 2014). O teste do micronúcleo (MN) é um dos mais utilizados para avaliar danos genéticos em linhagens celulares de mamíferos/ humanos, ocasionados pela exposição a substâncias genotóxicas. Este teste permite também, analisar a formação de pontes nucleoplasmáticas, brotamentos nucleares, necrose, apoptose e o índice de divisão nuclear (proliferação celular) (ALIMBA et al., 2016; FENECH, 2007). Outro teste para avaliação de efeitos genotóxicos, é o ensaio do cometa, que quantifica lesões no DNA para fora do núcleo. As células lesadas são identificadas por uma cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA e podem se apresentar em diferentes tamanhos (AZQUETA; COLLINS, 2013; COLLINS, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar *in vitro* os efeitos toxicogénicos de contaminantes químicos detectados em águas subterrâneas.

2.2 Objetivos específicos

Capítulo II

- Detectar e quantificar metais e contaminantes emergentes em águas subterrâneas destinadas ao consumo humano;
- Analisar o uso e ocupação do solo entorno dos pontos amostrais;
- Avaliar o risco adverso à saúde humana da população exposta aos contaminantes químicos pelo consumo diário destas águas.

Capítulo III

- Avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do Al e Mn em células CHO e CHO-XRS5 utilizando concentrações no limite e acima do limite estabelecido pelo CONAMA.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

1 Distribuição e consumo dos recursos hídricos superficiais e subterrâneos no Brasil

O Brasil contém a maior reserva hidrológica no mundo. Calcula-se que possua aproximadamente 12% da água doce do planeta. No país, 46,1% dos municípios são abastecidos exclusivamente por águas superficiais, 39,5% por águas subterrâneas e 14,4% pelos dois tipos de abastecimento (misto) (ATLAS, 2010a).

Do total de águas superficiais brasileiras, 68% estão na região Norte (45,3% do território nacional), 3,3% estão no Nordeste (18,3% do território), 15,7% estão no Centro-Oeste (18,8% do território), 6% estão no Sudeste (10,8% do território) e outros 6,5% estão na região Sul (6,8% do território) (MMA, 2006). Tendo em vista o conflito de oferta e demanda por água, muitas cidades que enfrentam crises hídricas, recorrem às águas subterrâneas, que por sua vez servem como fonte alternativa as águas superficiais (ANA, 2018).

A água é utilizada em diferentes atividades, como, no abastecimento da população, geração de energia, irrigação, produção industrial, recreação e lazer. A intensidade da utilização da água em diversos países, apresenta variação conforme a região do país, pois, áreas com densidade populacional e grau de urbanização elevado consomem mais água. Porém, tanto no mundo como no Brasil, a maior parte da água doce (mais de 60%) é utilizada na agricultura (WWAP, 2018; ANA, 2018). De acordo com ANA (2018), no Brasil, as principais atividades que consomem água são: agricultura (68,4%), abastecimento animal (10,8%), urbano e rural (11%), indústria (8,8%), mineração (0,8%) e termelétricas (9,2%) (Fig.1).

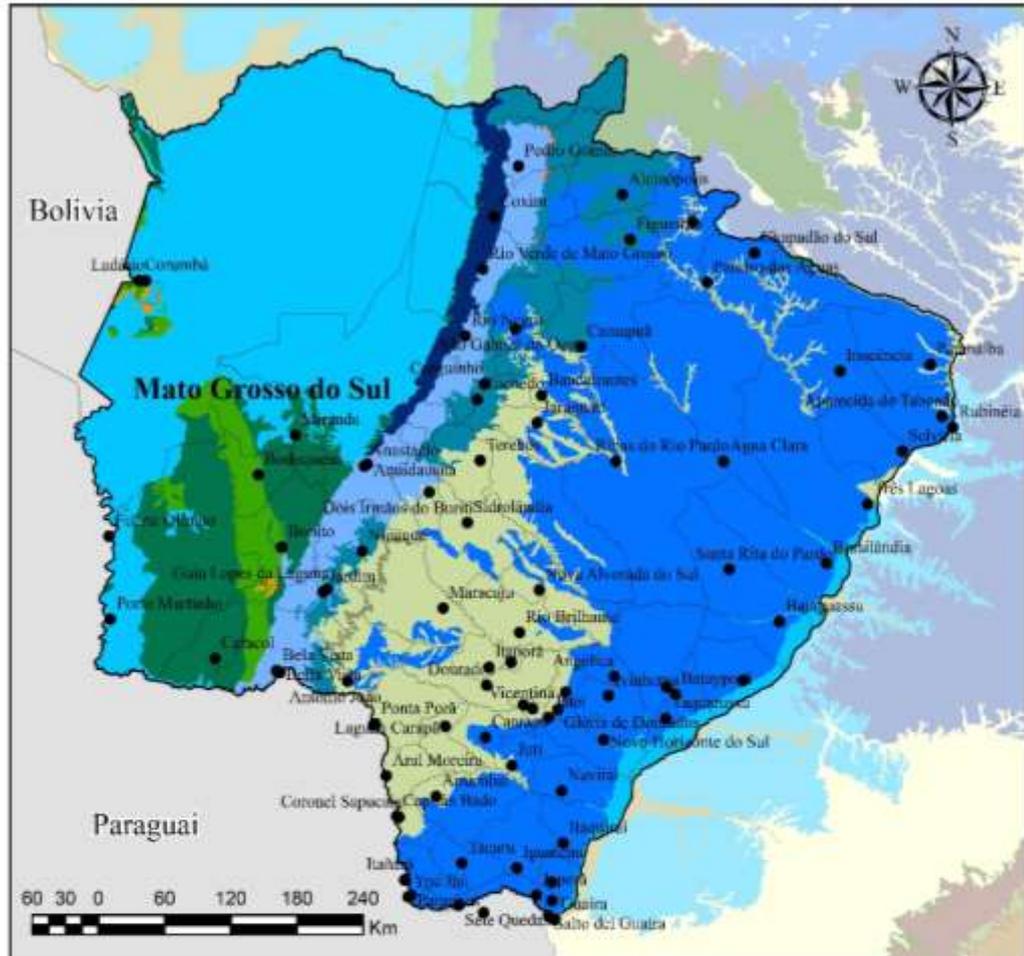


Fig. 1 Porcentagem de água consumida pelas principais atividades antrópicas no Brasil. Fonte: ANA, 2018.

2 Recursos hídricos subterrâneos no Mato Grosso do Sul (MS)

De acordo com o IBGE (2018), o estado do MS tem uma população com aproximadamente de 2.750.000 habitantes, distribuída em 79 municípios. O MS é um dos estados em que a maioria de seus municípios são predominantemente abastecidos por águas subterrâneas, devido a existência de aquíferos com elevado potencial hídrico. Aproximadamente 79% dos municípios são abastecidos exclusivamente por águas provenientes de poços, os demais 21% apresentam abastecimento por captações em mananciais superficiais, ou de forma mista (águas superficiais e subterrâneas).

No MS consideram-se dez unidades aquíferas presentes, sendo elas: Sistema Aquífero Cenozoico, Bauru, Serra Geral, Guarani, Aquidauana-Ponta Grossa, Furnas, Pré-cambriano Calcários, aquífero Pré-Cambriano, Xaraiés e Palermo (Fig. 2). Dentre estes, os Aquíferos Bauru e Cenozóico são os de maior área de afloramento, ambos aquíferos livres, com respectivamente 37% e 27% da área total de Mato Grosso do Sul (IMASUL, 2010). Os aquíferos Guarani, Serra Geral e Bauru- Caiuá são três grandes sistemas sobrepostos distribuídos na região hidrográfica do Paraná (ATLAS, 2010b). A importância desses últimos aquíferos está relacionada ao fato de estarem localizados nas duas microrregiões mais densamente habitadas do estado, Campo Grande e Dourados (LASTORIA et al., 2006).



Legenda

- | | | | |
|---|------------------------------|--|--|
| • | Cidades | | Sistema Aquífero Aquidauana Ponta Grossa |
| | Municípios | | Sistema Aquífero Pre-cambriano |
| | Sistema Aquífero Cenozóico | | Sistema Aquífero Pre-cambriano Calcárico |
| | Sistema Aquífero Bauru | | Sistema Aquífero Furnas |
| | Sistema Aquífero Serra Geral | | Sistema Aquífero Xaraíes |
| | Sistema Aquífero Guarani | | Sistema Aquífero Palermo |

Fig. 2 Aquíferos presentes no estado do Mato Grosso do Sul. Fonte: Julio Solórzano.

Visto que a água subterrânea é o único sistema de captação de água para abastecimento da população em grande parte dos municípios do estado, torna-se necessária a avaliação da qualidade desta água para que seja garantida a sua potabilidade para o consumo humano. No ano de 2017, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) classificou o MS como sétimo estado que mais comercializa agrotóxicos no país. O aumento do consumo de agrotóxicos no estado, está relacionado com a expansão da atividade

agrícola, que por sua vez, pode estar contribuindo para a contaminação dos mananciais subterrâneos no estado. Por isso, faz-se importante a análise do uso e cobertura do solo, para identificar as possíveis fontes de contaminação da água baseado nas atividades desenvolvidas no solo.

3 Contaminação ambiental

A qualidade da água é essencial para o equilíbrio e funcionamento dos ecossistemas, bem como para a vida do ser humano. Quando essa qualidade é alterada, a água pode gerar impactos negativos na saúde pública. Muitas atividades antrópicas são responsáveis por afetar a qualidade e a disponibilidade do recurso hídrico. O crescimento populacional e, conseqüentemente, o consumo da água, juntamente com a falta de saneamento básico em muitas localidades no país e o despejo de resíduos gerados pelas atividades antrópicas como, mineração, indústria e agricultura, ocasionam a poluição das águas superficiais e subterrâneas (SUI, et al., 2015; ETTLER, 2016; MACHADO et al., 2016). Outros fatores que contribuem para a deterioração da qualidade da água é a poluição do ar e do solo.

A poluição atmosférica é responsável por danos causados à saúde humana e aos ecossistemas. O crescimento populacional promoveu o aumento de depósitos de lixo e veículos que transitam pelas cidades, que lançam gases tóxicos e material particulado na atmosfera (STANKOVIC et al., 2014; CHEN et al., 2016). A contaminação do solo ocorre, principalmente, por meio da poluição do ar, uso de fertilizantes na agricultura e deposição de resíduos sólidos no ambiente (STANKOVIC et al., 2014). Os poluentes do ar e do solo que apresentam alta solubilidade em água podem ser carregados para os corpos hídricos pelas águas de chuva, levando a uma redução na qualidade da água dos mananciais. Já a contaminação nos mananciais subterrâneos por resíduos gerados pelas atividades humanas se dá por meio do processo de lixiviação, o qual é caracterizado pela infiltração das substâncias químicas presentes nas camadas superficiais do solo, que atingem as camadas mais profundas, comprometem a qualidade da água e os seus potenciais de usos (DONG, et al., 2015; AHAMAD et al., 2018; PATEL et al., 2016) (Fig. 3). O descarte de resíduos como metais e contaminantes emergentes, quando não gerenciados corretamente, passam a ser ameaça à saúde pública e principalmente aos recursos naturais.



Fig. 3 Principais fontes de origem da contaminação dos mananciais subterrâneos. Fonte: <http://helenfarias.blogspot.com.br/2012/03/preservar-agua-o-solo-as-plantas-os.html>

3.1 Contaminação por Metais

Os metais estão presentes em diversos compartimentos no ambiente, como na água, ar e sedimento. Esses elementos tendem a se acumular na biota aquática e atingir os seres vivos. No ambiente eles geralmente estão associados a outros componentes, como minerais e rochas. A origem destes elementos pode ser oriunda de dois processos: litogênico e antropogênico. No primeiro processo, os metais são originados de fontes naturais, geoquímicos, advindo de rochas, minérios e vulcões (SZYCZEWSKI et al. 2009; ALLOWAI, 2013). No segundo processo, sua ocorrência é derivada das atividades antrópicas, como, esgoto doméstico, indústrias, agricultura e poluentes atmosféricos (LI 2017; KUMAR et al., 2017).

Alguns metais são considerados elementos essenciais, por desempenhar funções importantes nas reações bioquímicas, metabólicas e enzimáticas e demais processos fisiológicos nos seres vivos (KUMAKLI et al. 2017; PRASHANTH et al. 2015). Metais essenciais como Fe, Cr, Zn, Cu, Ni, Mn, Na e K, são necessários em baixas concentrações, sendo que a sua deficiência ou excesso pode afetar os organismos vivos (STANKOVIC et al., 2014; ANNANGI et al. 2016; CARVALHO et al. 2014). Os demais metais não essenciais para os organismos são considerados tóxicos aos seres vivos, mesmo em baixas concentrações,

cuja toxicidade dependerá da intensidade do uso, concentração, distribuição, capacidade de formar complexos, oxidação e tempo de exposição ao mesmo (STANKOVIC et al., 2014).

Os metais são elementos que, quando liberados no ambiente, não desaparecem, devido a suas propriedades de não-biodegradação. Tais elementos podem ser bioacumulados e biomagnificados na cadeia alimentar, além de serem persistentes no ambiente e nos seres vivos (KOKI et al., 2015; STANKOVIC; STANKOVIC, 2013) (Fig. 4).

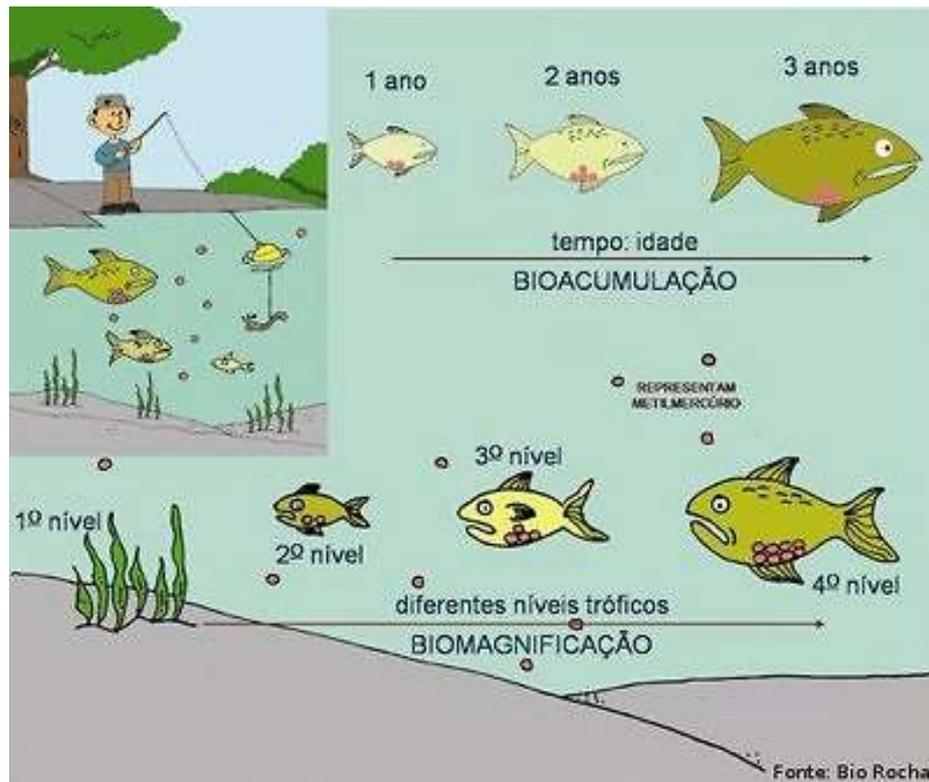


Fig. 4 Exemplos da bioacumulação e biomagnificação de contaminantes químicos. Fonte: <http://biorocha.blogspot.com/2011/>

3.2 Contaminantes emergentes

Os contaminantes emergentes são definidos como substâncias de diferentes origens (natural, sintética e microorganismos) e natureza química, com efeitos ainda pouco conhecidos para o meio ambiente e para os seres humanos. Dentre essas substâncias, se pode destacar: hormônios, fármacos, produtos de higiene pessoal, pesticidas, fertilizantes, compostos de uso industrial e drogas ilícitas (MONTAGNER et al. 2017).

Tais compostos podem ser encontrados na água, sendo provenientes de diversas vias de contaminação, como: falta de saneamento básico, despejo de efluentes industriais, hospitalares e agrícolas, ou por processos de tratamento ineficiente dos mesmos, uma vez que, não se consegue remover completamente as substâncias orgânicas, durante os processos mais comuns

(ANA, 2013; MONTAGNER et al. 2017; STACKELBERG et al., 2007). Estes compostos orgânicos, quando presentes no solo, podem ser transportados para as águas superficiais, por meio de escoamento superficial e/ou, atingir as águas subterrâneas, pelo processo de lixiviação.

Efeitos adversos à biota e seres humanos têm sido relatados devido a exposição crônica a esses compostos, mesmo quando em concentrações muito baixas na matriz aquática. Devido a esse fato, esses compostos têm sido objetos de estudos de ecotoxicologia e avaliação dos efeitos à saúde humana, para que possam ser inseridos nas regulamentações vigentes, uma vez que, poucos deles são legislados por órgãos fiscalizadores (BRASIL, 2008). A regulamentação destes contaminantes é feita baseada nos efeitos individuais dos mesmos, porém, se sabe que estes não são encontrados individualmente no ambiente. Assim sendo, os valores de referência destes não abrange os efeitos das misturas dos contaminantes (efeitos sinérgicos) (STACKELBERG et al., 2007).

4 Efeitos causados pelos contaminantes para a biota aquática e saúde humana

Alguns contaminantes químicos (metais e contaminantes emergentes) não são biodegradáveis e tendem a se acumular na biota aquática e ao longo da cadeia alimentar. Deste modo, predadores de topo estão sujeitos a apresentarem maiores concentrações dos mesmos (DHANAKUMAR, et al., 2015; YI et al., 2012). No ambiente aquático podem afetar populações e comunidades inteiras, alterar a expressão gênica, os processos fisiológicos, o comportamento e até mesmo causar letalidade (FONG et al., 2016).

A inibição da taxa de crescimento e fotossíntese de produtores primários, bem como, mudanças no comportamento de peixes e invertebrados, que comprometem sua capacidade de defesa contra predadores, podem ser causadas pela exposição a estes compostos químicos (MUÑOZ et al., 2015). Pérez-Alvarez et al. (2018) observaram efeitos como malformação, estresse oxidativo e inibição de crescimento, em anfíbios em peixes. Alguns compostos podem ainda provocar efeitos neurotóxicos, distúrbios como, baixa fertilidade, alteração do crescimento e desenvolvimento, além de redução das defesas imunológicas e efeitos no desenvolvimento hormonal (FONG et al., 2016).

Em relação à saúde humana, a exposição do indivíduo aos metais e contaminantes emergentes pode ocasionar causar distúrbios gastrointestinais, lesões renais e hepáticas, distúrbios do sistema nervoso central e problemas respiratórios, além de danos genéticos, como, desregulação do crescimento celular, estresse oxidativo, toxicidade, inibição do mecanismo de reparo de danos no DNA, ocasionando o aparecimento de alterações genéticas, inativação de

processos apoptóticos e desenvolvimento de tumores (Fig. 5) (BEYERSMANN; HARTWIG, 2008; INCA, 2012; IZAH et al., 2016; MARTIN; GRISWOLD, 2009; OLIVEIRA et al., 2007; PAZ et al., 2017; RAJIV et al., 2016).

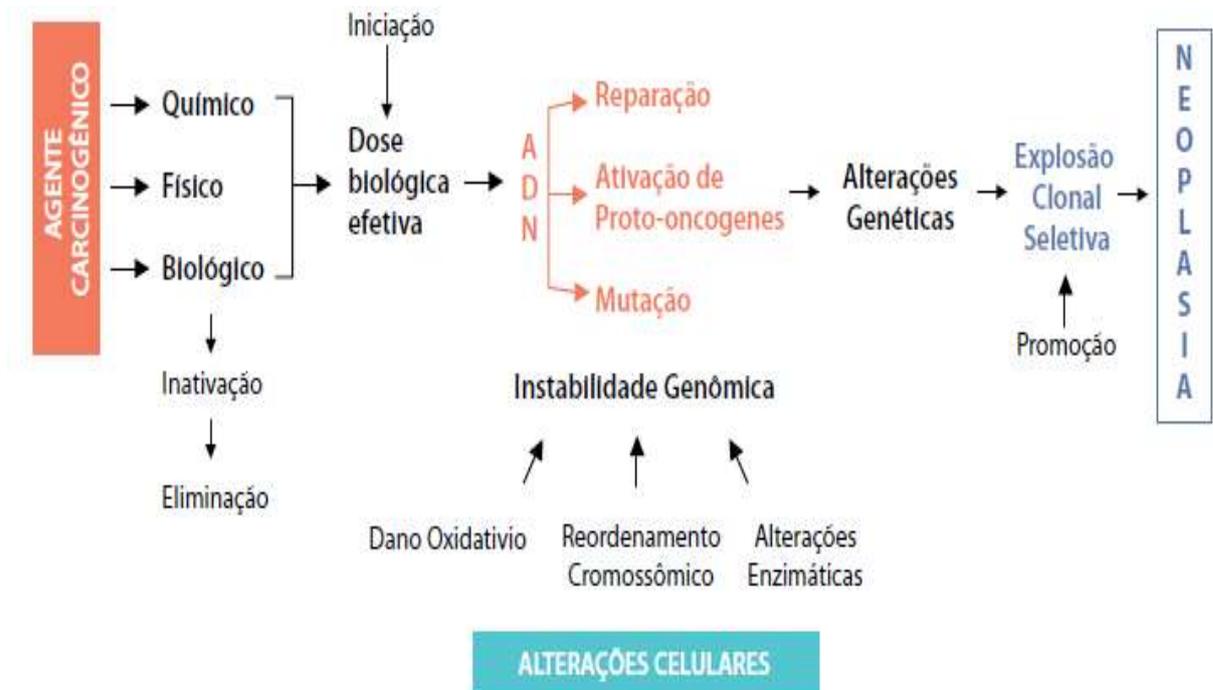


Fig. 5 Etapas do processo de carcinogênese. Fonte: INCA, 2012.

Há relatos também de problemas de efeitos dérmicos, cefaleia, doenças cardíacas, efeitos neurológicos, doenças crônicas como asma, diabetes, câncer em seres humanos (KOUTROS et al., 2015; LI et al., 2014; INCA, 2012; RAANAN et al., 2014; STARLING et al., 2014) e desregulação endócrina (WILKINSON et al., 2016). Diante do exposto, torna-se necessário a realização de monitoramento dos recursos hídricos, para que estes não sejam cenários de contaminação por químicos e afetem os seres vivos, bem como para que seja possível estabelecer medidas preventivas, a fim de amenizar os possíveis impactos causados.

5 Avaliação de risco e fontes poluidoras

A avaliação de risco consiste em uma ferramenta que compreende caracterizar quantitativa e qualitativamente a incidência de um agente e estimar a probabilidade de ocorrência de quaisquer potenciais efeitos adversos à saúde humana, durante um período de exposição a fatores de risco de natureza distinta (agentes físicos, químicos, microbiológicos e situações) (UMBUZEIRO et al., 2010). Ela está inserida no processo de análise do risco, que compreende três procedimentos: 1) avaliação do risco; 2) gerenciamento do risco (processo que controla os riscos avaliados na etapa anterior, buscando alternativas e ações apropriadas) e 3)

comunicação de risco (informar autoridades públicas e comunidade em geral sobre os riscos) (BRASIL, 2006a) (Fig. 6).

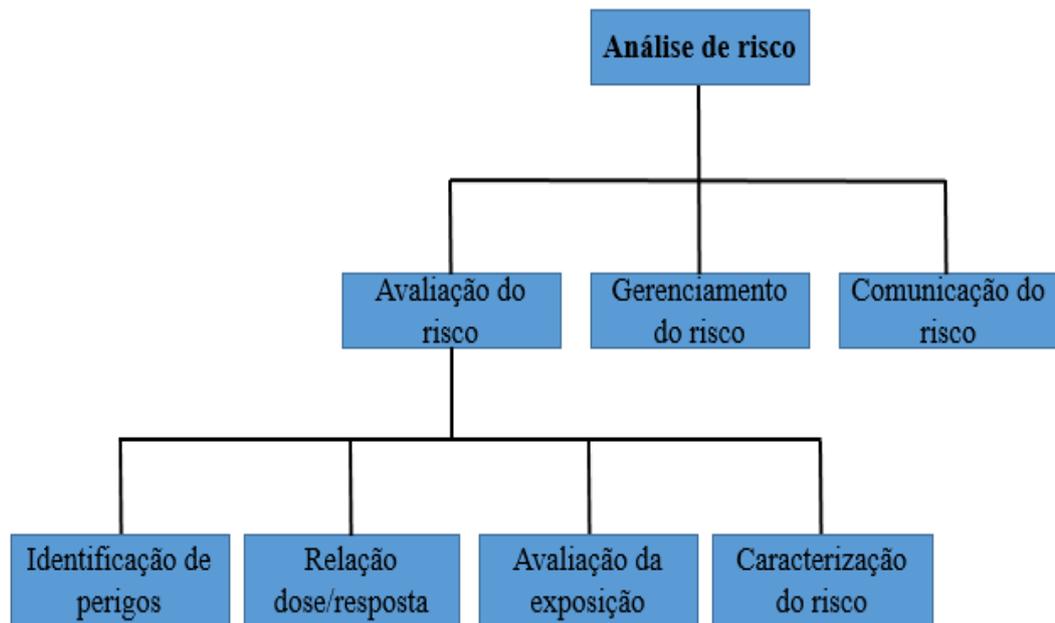


Fig. 6 Etapas da análise e avaliação do risco. Fonte: Francisco, 2019.

Essa metodologia compreende quatro etapas fundamentais: 1) identificação de perigos; 2) avaliação da relação entre a dose de exposição e incidência de efeitos; 3) avaliação da exposição existente e 4) caracterização do risco (BRASIL, 2006b) (Fig. 6). A exposição a um composto/substância pode ser por diferentes vias, como, oral, inalatória e dérmica e, a mesma pode variar quanto à duração e frequência (UMBUZEIRO et al., 2010). Com isso, essa metodologia pode ser considerada como uma ferramenta preventiva que assegura um cenário de exposição considerado seguro à população exposta.

A análise do uso e ocupação do solo serve como parâmetro relevante para caracterizar como as atividades antrópicas, desenvolvidas no entorno dos recursos hídricos, influenciam a qualidade da água alterada pela existência de contaminantes químicos que podem implicar em riscos para a saúde da população que consome essa água (DING et al., 2016; PARK et al., 2014). De acordo com Dellamatrice e Monteiro (2014), a ausência da cobertura vegetal, durante a estação chuvosa em solos tropicais, pode intensificar a entrada de compostos no meio aquático.

Com isso, pode-se ressaltar a importância da mata ciliar, visto que, a mesma tem como função ambiental preservar os recursos hídricos. As matas ciliares atuam como mecanismo de filtragem (retenção de sedimentos), servindo como barreira física e química, minimizando

processos de assoreamento dos corpos d'água e a contaminação por lixiviação ou escoamento superficial de defensivos agrícolas e fertilizantes (AGUIAR et al., 2015; YU et al., 2016).

6 Ensaios biológicos para avaliação de danos citotóxicos e genotóxico

Diferentes ensaios biológicos podem ser utilizados para avaliação de potencialidade de efeitos genotóxico de contaminantes ambientais, tanto em modelos *in vivo* (peixes e roedores) quanto *in vitro* (cultivo celular). Ensaios biológicos realizados com cultura de células são considerados ferramenta valiosa para as áreas biomédica e biotecnológica, quanto para o monitoramento de substâncias que comprometem a instabilidade do DNA (DUESBERG et al. 1998). Este tipo de ensaio apresenta algumas vantagens em relação aos testes *in vivo*, como por exemplo: (1) a possibilidade de limitação do número de variáveis experimentais; (2) maior facilidade de obtenção de dados significativos; (3) alta reprodutibilidade; (4) realização do experimento em um curto período de tempo; (5) alta sensibilidade em relação a outros testes e (6) baixos custos, quando comparados com os testes *in vivo* (ROGERO et al. 2003).

As células de CHO (oriundas de ovário de hamster chinês) (Fig. 7), dentre as várias linhagens disponíveis, é uma das mais utilizadas em ensaios *in vitro* para estudos de toxicidade e mutagenicidade de diversos agentes físicos e químicos. Essa linhagem apresenta período curto de proliferação (12-14h), cromossomos grandes e em pequeno número (20-22), não necessita de estimulação mitótica para o crescimento já que a maioria das células está em divisão e, podem ser congeladas e armazenadas para serem usadas em ensaios futuros (AARDEMA et al 2006; PRESTON, 1981).

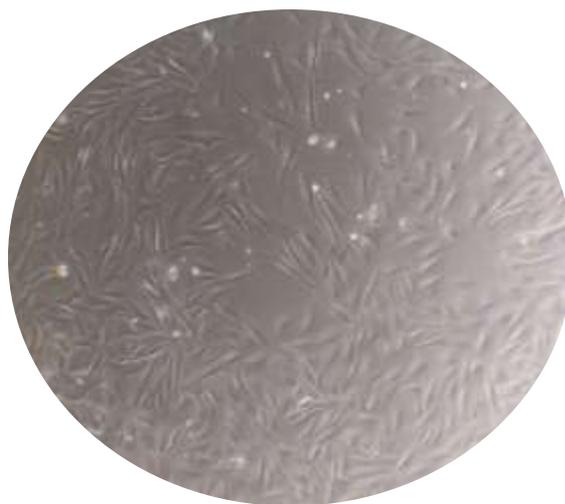


Fig. 7 Micrografia de contraste de células de ovário de hamster chinês (CHO) em cultivo. Fonte: Francisco, 2019.

Mutações na linhagem de CHO são de grande importância para a investigação dos mecanismos de reparo do DNA. As células de CHO-XRS5 representam a primeira linhagem celular de mamíferos mutantes com a deficiência na capacidade de reparar fitas dupla de DNA, sendo mais eficientes na reparação de quebras de fita simples (COSTA; BRYANT, 1988; DARROUDI; NATARAJAN, 1987). Devido a essa deficiência de realizar a recombinação corretamente, essa linhagem pode servir como ferramenta valiosa na investigação do papel da quebra da fita do DNA e o mecanismo de rearranjo dessas quebras na produção de alterações cromossômicas (KEMP; JEGGO, 1986; SOUZA et al., 2016). Esta propriedade de déficit de reparo pode tornar possível a avaliação de mecanismos relacionados a ação toxicológicas de metais, por exemplo.

Ensaio colorimétricos, fluorimétricos e luminescentes (CHAN et al., 2013; WEYERMANN et al., 2005) foram desenvolvidos para medir a proliferação celular, viabilidade e a citotoxicidade de células devido exposição a compostos. Dentre os testes colorimétricos, o teste do MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio), é um dos ensaios mais utilizados na avaliação da viabilidade celular em testes *in vitro* (DJOUINA et al., 2016; RAJIV et al., 2016; RIZVI et al., 2014).

O teste do MTT foi descrito e desenvolvido pela primeira vez por Mosmann (1983). Este teste é baseado na atividade redutiva do sal tetrazólio em cristais de formazan insolúveis em água, devido à atividade de desidrogenases mitocondriais de células vivas (VAN TONDER et al., 2015). Os cristais de formazan, quando dissolvidos em solvente orgânico (por exemplo, dimetilsulfóxido), podem ser mensurados por meio da análise colorimétrica de espectroscopia de absorção quantitativa (STEPANENKO; DMITRENKO, 2015), onde a quantidade do produto mensurado é uma estimativa do número de células viáveis (LU et al., 2012).

Para avaliação de danos genotóxicos, pode-se destacar o teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese e o ensaio do cometa. O teste do micronúcleo (MN) permite avaliar danos genéticos ocasionados pela exposição a substâncias genotóxicas em linhagens celulares de mamíferos/humanos. Neste teste, a marcação de MN é restringida às células binucleadas, pois, são as células que se dividiram uma única vez, que podem então expressar os MN (FENECH, 2006). Diversos estudos realizam o teste do MN para avaliar os efeitos causados por componentes químicos, dentre estes os metais, pois, trata-se de um teste eficaz e rápido, além de permitir avaliar as alterações cromossômicas (NOVOTNIK et al., 2016; PAZ et al., 2017; VIDYA et al., 2017).

O MN corresponde a um pequeno núcleo arredondado disperso no citoplasma de células em divisão celular, que sofreram a ação de agentes clastogênicos promotores de quebras cromossômicas, e/ou aneugênicos, que induzem a perda ou a não disjunção de cromossomos inteiros na anáfase da divisão celular (BORTOLI et al., 2009; FENECH, 2007; OCAMPO et al., 2016; VILLARINI et al., 2016) (Fig. 8).

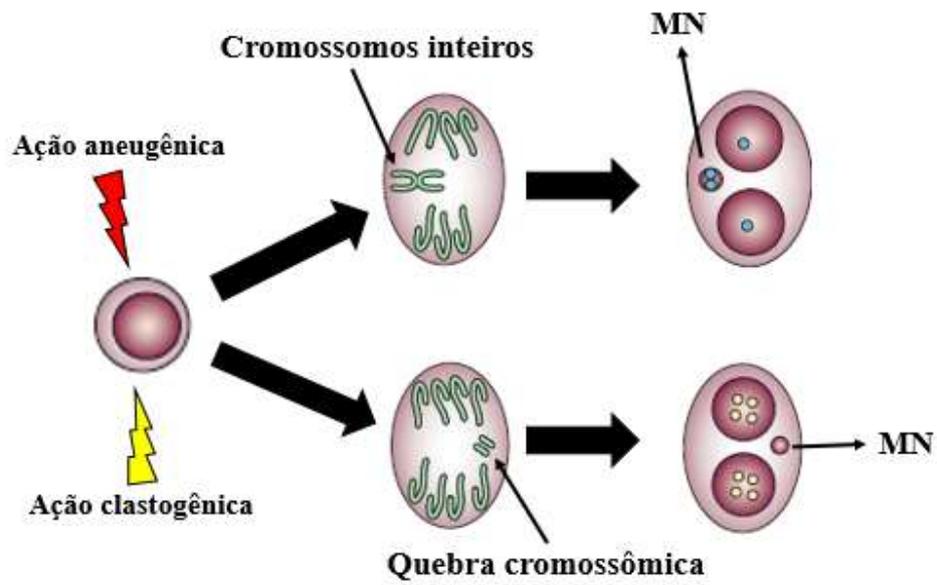


Fig. 8 Formação do micronúcleo durante a divisão celular. Fonte: Fenech, 2007 adaptado pela autora.

Por meio deste teste, também é possível analisar outros danos genéticos (Fig. 9), como, pontes nucleoplasmáticas, formadas por cromossomos dicêntricos, brotamentos nucleares, resultantes da amplificação de genes, necrose e apoptose, além de efeitos citostáticos, por meio do índice de divisão nuclear que estima a proporção de células com 1-4 núcleos (ALIMBA et al., 2016; FENECH, 2007).

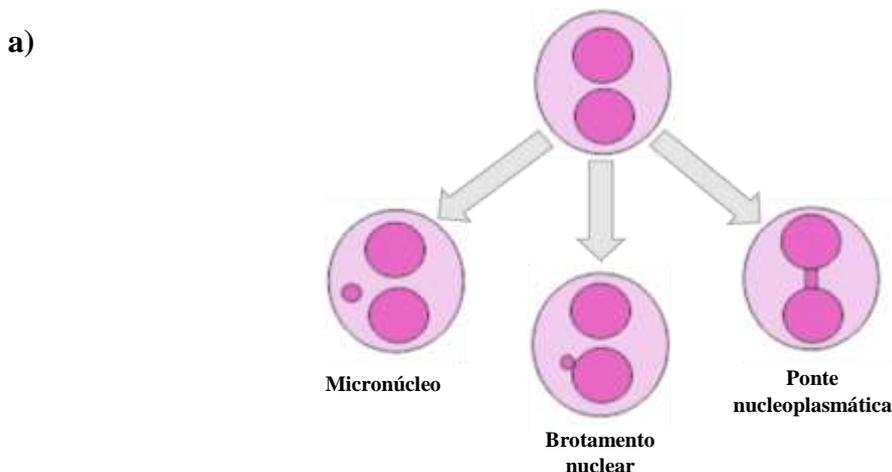


Fig. 9 Células com a) alterações cromossômicas (micronúcleo, brotamento nuclear e ponte nucleoplasmática). Fonte: Francisco, 2019.

O ensaio cometa ou “eletroforese em gel de célula única”, é uma técnica rápida e sensível para avaliação de danos no DNA em células eucarióticas associados a exposições a agentes genotóxicos (COLLINS, 2014; MOLLER et al., 2010). Este ensaio tem sido amplamente usado na avaliação dos efeitos genotóxicos ocasionado por químicos em cultivo celular (CALDERÓN-SEGURA et al., 2018; JIMÉNEZ-VILLARREAL et al., 2017; STEPHENSON et al., 2013).

A técnica consiste em passar uma corrente elétrica pelas células dispostas em lâminas com gel de agarose, proporcionando a migração dos fragmentos degradados de DNA, resultantes de quebras, para fora do nucleóide (AZQUETA; COLLINS, 2013; COLLINS, 2014). Com isso, as células com dano irão apresentar uma “cauda” semelhante a um cometa. As medidas mais utilizadas para avaliação destes danos são realizadas pelos parâmetros de extensão da cauda e porcentagem de DNA contida na mesma. Os cometas com um nucleóide pequeno (cabeça) e cauda grande e larga estão associados a células muito danificadas (AZQUETA et al., 2011; LORENZO et al., 2013).

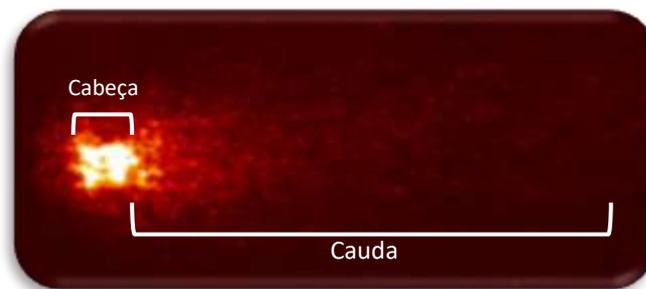


Fig. 10 Micrografia de cometa ilustrando a cabeça do nucleóide pequena e a cauda. Fonte: Francisco, 2019.

REFERÊNCIAS

- AARDEMA, M. J. *et al.* SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test: III. Using CHO cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 607, n. 1, p. 61-87, 2006.
- AGUIAR, T. R. *et al.* Zonas ripárias como filtros de pesticidas de plantio direto. **Ciência Ambiental e Pesquisa sobre Poluição**, v. 22, n. 14, p. 10618-10626, 2015.
- AHAMAD, A. *et al.* Impact of non-engineered Bhalswa landfill on groundwater from Quaternary alluvium in Yamuna flood plain and potential human health risk, New Delhi, India. **Quaternary International**, 2018.
- ALIMBA, C. G. *et al.* Genotoxicity and cytotoxicity of chromium, copper, manganese and lead, and their mixture in WIL2-NS human B lymphoblastoid cells is enhanced by folate depletion. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 798, p. 35-47, 2016.
- ALLOWAY, B. J. Sources of heavy metals and metalloids in soils. **Heavy metals in soils**. Springer, Dordrecht, p. 11-50, 2013.
- ANA - Agência Nacional das Águas. Cuidando das Águas - Soluções para melhorar a qualidade dos recursos hídricos, 2013. Disponível em: <http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2013/CuidandoDasAguas415>. Acessado em 22 nov. 2017.
- ANA - Agência Nacional das Águas. Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil, 2018. Disponível em: http://www.snirh.gov.br/portal/snirh/centrais-de-conteudos/conjuntura-dos-recursos-hidricos/informe_conjuntura_2018.pdf. Acessado em 22 fev. 2019.
- ANA - Agência Nacional das Águas. Panorama da quantidade das águas, 2018. Disponível em: <http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/panorama-das-aguas/colecao-panorama-das-aguas>. Acessado em 30 set. 2018.
- ANNANGI, B. *et al.* Biomonitoring of humans exposed to arsenic, chromium, nickel, vanadium, and complex mixtures of metals by using the micronucleus test in lymphocytes. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 140-161, 2016.
- ATLAS BRASIL: Abastecimentos urbano de água: panorama nacional/ Agência Nacional de Águas; Engecorps/Cobrape – Brasília: ANA: Engecorps/ Cobrape, 2010a.
- ATLAS BRASIL: Abastecimentos urbano de água: resultado por estado/ Agência Nacional de Águas; Engecorps/Cobrape – Brasília: ANA: Engecorps/ Cobrape, 2010b.
- AZQUETA, A. *et al.* Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1, p. 41-45, 2011.
- AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 6, p. 949-968, 2013.
- BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Archives of toxicology**, v. 82, n. 8, p. 493, 2008.
- BORTOLI, G. M.; AZEVEDO, M. B.; SILVA, L. B. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 675, n. 1, p. 1-4, 2009.
- Brasil a. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de procedimentos de vigilância em saúde ambiental relacionada à qualidade da água para consumo humano / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 284 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- Brasil b. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Inspeção sanitária em abastecimento de água. Brasília. Ministério da Saúde, 2006. 84 p.
- Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). (2008). Resolução nº 396, de 3 de Abril de 346 2008. <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>. Acessado em: 10 out. 2017.

- CALDERÓN-SEGURA, M. E. *et al.* In vitro cytotoxicity and genotoxicity of Furia® 180 SC (zeta-cypermethrin) and Bulldock 125® SC (β -cyfluthrin) pyrethroid insecticides in human peripheral blood lymphocytes. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 28, n. 4, p. 268-278, 2018.
- CARVALHO, C. F. *et al.* Elevated airborne manganese and low executive function in school-aged children in Brazil. **Neurotoxicology**, v. 45, p. 301-308, 2014.
- CHAN, G. K. Y. *et al.* A simple high-content cell cycle assay reveals frequent discrepancies between cell number and ATP and MTS proliferation assays. **PLoS one**, v. 8, n. 5, p. e63583, 2013.
- CHEN, J. *et al.* Do green spaces affect the spatiotemporal changes of PM 2.5 in Nanjing?. **Ecological processes**, v. 5, n. 1, p. 7, 2016.
- COLLINS, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 794-800, 2014.
- COSTA, N. D.; BRYANT, P. E. Repair of DNA single-strand and double-strand breaks in the Chinese hamster xrs 5 mutant cell line as determined by DNA unwinding. **Mutation Research/DNA Repair Reports**, v. 194, n. 2, p. 93-99, 1988.
- DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Cytological characterization of Chinese hamster ovary X-ray-sensitive mutant cells xrs 5 and xrs 6: I. Induction of chromosomal aberrations by X-irradiation and its modulation with 3-aminobenzamide and caffeine. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 177, n. 1, p. 133-148, 1987.
- DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 12, p. 1296-1301, 2014.
- DHANAKUMAR, S.; SOLARAJ, G.; MOHANRAJ, R. Heavy metal partitioning in sediments and bioaccumulation in commercial fish species of three major reservoirs of river Cauvery delta region, India. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 113, p. 145-151, 2015.
- DING, J. *et al.* Influences of the land use pattern on water quality in low-order streams of the Dongjiang River basin, China: a multi-scale analysis. **Science of the Total Environment**, v. 551, p. 205-216, 2016.
- DJOUINA, M. *et al.* Toxicological consequences of experimental exposure to aluminum in human intestinal epithelial cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 91, p. 108-116, 2016.
- DONG, W. *et al.* Risk assessment of organic contamination in shallow groundwater around a leaching landfill site in Kaifeng, China. **Environmental Earth Sciences**, v. 74, n. 3, p. 2749-2756, 2015.
- DUESBERG, P. *et al.* Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 23, p. 13692-13697, 1998.
- ETTLER, V. Soil contamination near non-ferrous metal smelters: a review. **Applied Geochemistry**, v. 64, p. 56-74, 2016.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 600, n. 1, p. 58-66, 2006.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084, 2007.
- FONG, S. *et al.* Contaminant Effects on California Bay–Delta Species and Human Health. **San Francisco Estuary and Watershed Science**, v. 14, n. 4, 2016.
- IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Histórico de comercialização de Químicos e Biológicos: 2000 – 2017. <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>. Acessado em: 21 set. 2018.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2018). <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ms/panorama>. Acessado em: 21 set. 2018.
- IMASUL- Instituto de Meio Ambiente de Mato Grosso do Sul. Plano estadual de recursos hídricos de Mato Grosso do Sul: resumo executivo, 2010. Disponível em: <http://www.imasul.ms.gov.br/recursos-hidricos/plano-estadual-de-recursos-hidricos-perhms>. Acessado em: 30 out. 2018.
- INCA (Instituto Nacional do Câncer). Diretrizes para a vigilância do câncer relacionado ao trabalho. 2012.

- IZAH, S. C.; CHAKRABARTY, N.; SRIVASTAV, A. L. A review on heavy metal concentration in potable water sources in Nigeria: Human health effects and mitigating measures. **Exposure and Health**, v. 8, n. 2, p. 285-304, 2016.
- JIMÉNEZ-VILLARREAL, J. *et al.* Detection of damage on single-or double-stranded DNA in a population exposed to arsenic in drinking water. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 16, n. 2, 2017.
- KEMP, L. M.; JEGGO, P. A. Radiation-induced chromosome damage in X-ray-sensitive mutants (xrs) of the Chinese hamster ovary cell line. **Mutation Research/DNA Repair Reports**, v. 166, n. 3, p. 255-263, 1986.
- KOKI, I. B. *et al.* Health risk assessment of heavy metals in water, air, soil and fish. **African journal of pure and applied chemistry**, v. 9, n. 11, p. 204-210, 2015.
- KOUTROS, S. *et al.* Occupational exposure to pesticides and bladder cancer risk. **International journal of epidemiology**, v. 45, n. 3, p. 792-805, 2015.
- KUMAKLI, H. *et al.* Environmental biomonitoring of essential and toxic elements in human scalp hair using accelerated microwave-assisted sample digestion and inductively coupled plasma optical emission spectroscopy. **Chemosphere**, v. 174, p. 708-715, 2017.
- KUMAR, M. *et al.* A study of trace element contamination using multivariate statistical techniques and health risk assessment in groundwater of Chhaprola Industrial Area, Gautam Buddha Nagar, Uttar Pradesh, India. **Chemosphere**, v. 166, p. 135-145, 2017.
- LASTORIA, G. *et al.* Hidrogeologia da Formação Serra Geral no Estado de Mato Grosso do Sul. **Águas Subterrâneas**, v. 20, n. 1, 2006.
- LI, H. H. *et al.* Pollution characteristics and risk assessment of human exposure to oral bioaccessibility of heavy metals via urban street dusts from different functional areas in Chengdu, China. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 1076-1084, 2017.
- LORENZO, Y. *et al.* The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. **Mutagenesis**, v. 28, n. 4, p. 427-432, 2013.
- LU, L. *et al.* Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 4, p. 636-644, 2012.
- MACHADO, K. C. *et al.* A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 138-146, 2016.
- MARTIN, S.; GRISWOLD, W. Human health effects of heavy metals. **Environmental Science and Technology briefs for citizens**, v. 15, p. 1-6, 2009.
- MMA (Ministério do Meio Ambiente). Água: Manual de Uso. Brasil. Brasília – DF. v. 1, p. 18 – 21, 2006.
- MOLLER, P. *et al.* Assessment and reduction of comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group. **Mutagenesis**, v. 25, n. 2, p. 109-111, 2010.
- MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094-1110, 2017.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MUÑOZ, I. *et al.* Effects of Emerging Contaminants on Biodiversity, Community Structure, and Adaptation of River Biota. **Emerging Contaminants in River Ecosystems**. Springer, Cham, p. 79-119, 2015. p. 79-119, 2015.
- NOVOTNIK, B. *et al.* Cytotoxic and genotoxic potential of Cr (VI), Cr (III)-nitrate and Cr (III)-EDTA complex in human hepatoma (HepG2) cells. **Chemosphere**, v. 154, p. 124-131, 2016.
- OCAMPO, I. Z. *et al.* In vitro cytotoxic and genotoxic evaluation of peptides used in nuclear medicine (DOTATATE and Ubiquicidin 29-41) in CHO-K1 cells. **Cytotechnology**, v. 68, n. 6, p. 2301-2310, 2016.
- OLIVEIRA, P. A. *et al.* Chemical carcinogenesis. **Anais da academia brasileira de ciências**, v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007.
- PARK, Y. S. *et al.* Characterizing effects of landscape and morphometric factors on water quality of reservoirs using a self-organizing map. **Environmental Modelling & Software**, v. 55, p. 214-221, 2014.

- PATEL, P. *et al.* Geochemical processes and multivariate statistical analysis for the assessment of groundwater quality in the Swarnamukhi River basin, Andhra Pradesh, India. **Environmental Earth Sciences**, v. 75, n. 7, p. 611, 2016.
- PAZ, L. N. F. *et al.* Evaluation of in vivo and in vitro toxicological and genotoxic potential of aluminum chloride. **Chemosphere**, v. 175, p. 130-137, 2017.
- PÉREZ-ALVAREZ, I. *et al.* Determination of metals and pharmaceutical compounds released in hospital wastewater from Toluca, Mexico, and evaluation of their toxic impact. **Environmental Pollution**, v. 240, p. 330-341, 2018.
- PRASHANTH, L. *et al.* A review on role of essential trace elements in health and disease. **Journal of dr. ntr university of health sciences**, v. 4, n. 2, p. 75, 2015.
- PRESTON, R. J. *et al.* Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of the US EPA's Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 87, n. 2, p. 143-188, 1981.
- RAANAN, R. *et al.* Early-life exposure to organophosphate pesticides and pediatric respiratory symptoms in the CHAMACOS cohort. **Environmental health perspectives**, v. 123, n. 2, p. 179-185, 2014.
- RAJIV, S. *et al.* Comparative cytotoxicity and genotoxicity of cobalt (II, III) oxide, iron (III) oxide, silicon dioxide, and aluminum oxide nanoparticles on human lymphocytes *in vitro*. **Human & experimental toxicology**, v. 35, n. 2, p. 170-183, 2016.
- RIZVI, S. H. M. *et al.* Aluminium induced endoplasmic reticulum stress mediated cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cell line is independent of p53. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e98409, 2014.
- ROGERO, S. O. *et al.* Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
- SOUZA, T. A. J. *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines. **Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 795, p. 70-83, 2016.
- STACKELBERG, P. E. *et al.* Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds. **Science of the Total Environment**, v. 377, n. 2-3, p. 255-272, 2007.
- STANKOVIC, S.; STANKOVIC, A. R. Bioindicators of toxic metals. **Green materials for energy, products and depollution**. Springer, Dordrecht, p. 151-228, 2013.
- STANKOVIC, S.; KALABA, P.; STANKOVIC, A. R. Biota as toxic metal indicators. **Environmental Chemistry Letters**, v. 12, n. 1, p. 63-84, 2014.
- STARLING, A.P. *et al.* Pesticide use and incident diabetes among wives of farmers in the Agricultural Health Study. **Occupation e Environmental Medicine**, v. 71, p. 629-635, 2014.
- STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, v. 574, n. 2, p. 193-203, 2015.
- STEPHENSON, A. P. *et al.* Manganese-induced oxidative DNA damage in neuronal SH-SY5Y cells: attenuation of thymine base lesions by glutathione and N-acetylcysteine. **Toxicology letters**, v. 218, n. 3, p. 299-307, 2013.
- SUI, Q. *et al.* Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: a review. **Emerging Contaminants**, v. 1, n. 1, p. 14-24, 2015.
- SZYCZEWSKI, P. *et al.* Research on heavy metals in Poland. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 18, n. 5, p. 755, 2009.
- UMBUZEIRO, G. A.; KUMMROW, F.; CARDOZO REI, F. F. Toxicologia, padrões de qualidade de água e a legislação. **InterfaceHS-Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 5, n. 1, 2010.
- VAN TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC research notes**, v. 8, n. 1, p. 47, 2015.
- VIDYA, P. V.; GEORGE, A.; CHITRA, K. C. An *in vitro* study on the induction of micronuclei and other nuclear anomalies in peripheral blood lymphocyte culture by metal oxide nanoparticles. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2017.

VILLARINI, M. *et al.* Occupational exposure to cytostatic/antineoplastic drugs and cytogenetic damage measured using the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay: a systematic review of the literature and meta-analysis. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 35-45, 2016.

WANG, Zengjin *et al.* Chronic exposure to aluminum and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. **Neuroscience letters**, v. 610, p. 200-206, 2016.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **International journal of pharmaceutics**, v. 288, n. 2, p. 369-376, 2005.

WILKINSON, J. L. *et al.* Ecotoxic pharmaceuticals, personal care products, and other emerging contaminants: A review of environmental, receptor-mediated, developmental, and epigenetic toxicity with discussion of proposed toxicity to humans. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 4, p. 336-381, 2016.

WWAP (United Nations World Water Assessment Programme). Relatório mundial das Nações Unidas sobre desenvolvimento dos recursos hídricos 2018: soluções baseadas na natureza para a gestão da água. Paris, UNESCO, 2018.

YI, Y. J.; ZHANG, S. H. Heavy metal (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) concentrations in seven fish species in relation to fish size and location along the Yangtze River. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 9, p. 3989-3996, 2012.

YU, S. *et al.* Effect of land use types on stream water quality under seasonal variation and topographic characteristics in the Wei River basin, China. **Ecological Indicators**, v. 60, p. 202-212, 2016.

CAPÍTULO II

METAIS E CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS E AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA

Artigo aceito para publicação na Revista **Environmental Science and Pollution Research**

Luiza Flavia Veiga Francisco¹, Bruno do Amaral Crispim², Juliana Caroline Vivian Spósito¹, Julio César Jut Solórzano³, Nayara Halimy Maran¹, Fábio Kummrow⁴, Valter Aragão do Nascimento⁵, Cassiana Carolina Montagner⁶, Kelly Mari Pires De Oliveira² & Alexeia Barufatti^{2*}

METAIS E CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS E AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA

¹Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.

²Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.

³UEMS / Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Dourados, MS, Brasil.

⁴Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brasil.

⁵Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

⁶Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

* Correspondência ao autor: Rua João Rosa Góes, 1761 - Vila Progresso. PO Box 322 - CEP: 79.825-070, Dourados, Brasil. Telefone: +55 67 34102223. E-mail: barufattialexeia@gmail.com (Barufatti, A).

Resumo

As águas subterrâneas são normalmente consumidas sem tratamento prévio e, portanto, é necessário o monitoramento de contaminantes para garantir sua segurança. Assim, objetivou-se avaliar a contaminação da água subterrânea por metais e contaminantes emergentes, buscando entender a relação entre sua presença nas águas subterrâneas e o perfil de uso e cobertura do solo das cidades de Itaporã e Caarapó. Além disso, as concentrações de contaminantes observadas foram comparadas com os valores máximos permitidos (VMP) e / ou com os critérios de qualidade da água (CQA) calculados para consumo humano, para investigar possíveis riscos para a saúde humana devido à ingestão desta água subterrânea. Coletamos uma amostra de água subterrânea de cada um dos 12 poços localizados em Itaporã e 11 poços localizados em Caarapó. Os metais foram analisados usando ICP-OES e os contaminantes emergentes usando LC-MS/MS. Pelo menos 1 dos 9 metais analisados foi encontrado em cada uma das amostras. Em 12 amostras, as concentrações dos metais verificados excederam o VMP ou o CQA calculado. O risco para a saúde humana foi observado para os metais Co, Mn, Cr e Ni. As concentrações de contaminantes emergentes encontrados em algumas amostras foram baixos (ng/L) e provavelmente não representam riscos à saúde, mas sua presença nas águas subterrâneas mostrou o impacto da agricultura e o descarte inadequado de esgoto doméstico nos poços das duas cidades.

Palavras-chave: manganês; cobalto; cromo; níquel; pesticidas; uso e cobertura do solo; água para consumo humano.

Abstract

Groundwaters are normally consumed without previous treatment and therefore is necessary the monitoring of contaminants in order to guarantee its safety. Thus, we aimed to evaluate the groundwater contamination by metals and emerging contaminants, seeking to understand the relationship between their presence in the groundwater and the use and land cover profile of Itaporã and Caarapó. In addition, the contaminant concentrations observed were compared with maximum permitted values (MPV) and/or with calculated water quality criteria (WQC) for human consumption to investigate possible human health risks due to the groundwater intake. We collected one groundwater samples from each of the 12 wells located in Itaporã and 11 wells located in Caarapó. The metals were analyzed using ICP-OES and the emerging contaminants using LC-MS/MS. At least 1 of the 9 metals analyzed was found in each of the samples. In 12 samples the metals concentrations verified exceeded the MPV or calculated WQC. A risk to human health has been observed for metals Co, Mn, Cr and Ni. The emerging contaminants concentrations found in some samples were low (ng/L) and probably did not pose health risks, but their presence in the groundwater showed the impact of agriculture and the inadequate disposal of domestic sewage in the wells of both cities.

Keywords: manganese; cobalt; chromium; nickel; pesticides; land use and cover; water human consumption.

1. Introdução

O crescimento populacional implica na expansão da urbanização e nas atividades agrícolas e industriais, aumentando a geração de resíduos, que, se descartados de maneira inadequada, podem causar sérios danos ao meio ambiente, bem como, a saúde humana (Emmanuel et al. 2009; MMA, 2007). O descarte inadequado desses resíduos no solo, associado com a alta solubilidade em água de alguns constituintes químicos, pode causar contaminação tanto da água superficial quanto subterrânea como resultado dos processos de percolação e / ou lixiviação, comprometendo sua qualidade e potenciais usos (Ahamad et al. 2018). Dong et al. 2015; Patel et al. 2016).

A contaminação da água por metais tem recebido grande atenção da comunidade científica devido à sua toxicidade, abundância, persistência no meio ambiente e potencial de acumulação em organismos vivos (Ahmed et al. 2015; Hosseini et al. 2015; Jitar et al. 2015; Yi et al., 2017). Alguns metais, como Fe, Cr, Zn, Cu, Ni, Mn, Na e K, são considerados essenciais em baixas concentrações, pois participam de vários processos fisiológicos (Kumakli et al. 2017; Prashanth et al. 2015). No entanto, em altas concentrações podem causar riscos para a saúde humana (Annangi et al. 2016; Carvalho et al. 2014; Keenan et al. 2009; Shahsavani et al. 2017).

Contaminantes emergentes são substâncias com diferentes fontes e natureza química, e seus efeitos sobre a biota, incluindo os humanos, ainda não são totalmente compreendidos. Dentre as diversas classes, destacam-se os hormônios, produtos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal, pesticidas, compostos para uso industrial e drogas ilícitas. Vários efeitos negativos nos organismos expostos a esses contaminantes podem ser atribuídos à exposição crônica, mesmo em concentrações muito baixas, como partes por trilhão (ppt) ou menores (Montagner et al. 2017). Estudos relataram que a exposição a compostos químicos por diferentes vias pode causar problemas como irritação da pele, dores de cabeça e desenvolvimento de artrite, doenças cardíacas, efeitos neurológicos e outras doenças crônicas como asma, diabetes e câncer em humanos (Koutros et al. 2015; Li et al. 2014; Raanan et al. 2014; Rahman et al. 2015; Starling et al. 2014; OMS, 1996).

No Brasil, inúmeras regiões têm a água subterrânea como o único recurso hídrico disponível para consumo humano, com isso, sua disponibilidade com qualidade adequada para o consumo humano é fundamental (ANA, 2018). Nesse contexto, a Resolução CONAMA 396 (Brasil, 2008) estabeleceu parâmetros físicos, químicos e biológicos (denominadas na legislação brasileira como valores máximos permitidos - VMP) para garantir a segurança das águas subterrâneas para consumo humano. No entanto, alguns compostos (particularmente contaminantes emergentes) requerem atenção especial em estudos que avaliam a qualidade da

água subterrânea, pois ainda há falta de dados sobre sua ocorrência em matrizes aquáticas e potenciais riscos à saúde humana, pois, não há poucos padrões para essas substâncias na legislação.

Atualmente, mais de 380 pesticidas são autorizados para uso agrícola no Brasil (Albuquerque et al. 2016), e nós temos um pequeno número de VMP legislados, muitos deles para pesticidas proibidos ou em desuso. Considerando que o estado de Mato Grosso do Sul é essencialmente agrícola e ocupa o sétimo lugar no consumo de agrotóxicos, bem como fertilizantes (que podem ser fonte de contaminação por metais) (IBAMA, 2014), pode-se esperar que estes químicos possam estar impactando a qualidade e a segurança das águas subterrâneas nos municípios que apresentam como atividade predominante a agricultura. Esse cenário indica a necessidade de estudos mais abrangentes para identificar os pesticidas prioritários nas águas subterrâneas brasileiras, permitindo, assim, uma revisão da legislação vigente.

Os municípios de Itaporã e Caarapó, localizados no MS, têm uma grande parte de seu território ocupada por áreas agrícolas. Além disso, sua população é totalmente suprida pelas águas subterrâneas obtidas de diferentes poços. Portanto, é crucial avaliar a qualidade da água subterrânea a partir dessas fontes, a fim de garantir sua segurança. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar metais e contaminantes emergentes nas águas subterrâneas utilizadas para consumo humano, buscando entender a relação entre sua presença nas amostras de águas subterrâneas e o perfil de uso e cobertura do solo em ambas cidades. Além disso, as concentrações de contaminantes observadas foram comparadas com o VMP e/ou com o cálculo do critério de qualidade de água (CQA) para o consumo humano para investigar possíveis riscos para a saúde humana devido à ingestão de água subterrânea.

2. Material e métodos

2.1. Área de estudo e caracterização dos poços estudados

As cidades de Itaporã (latitude: 22° 04' 44" S e longitude: 54° 47' 22" W) e Caarapó (latitude: 22°37'47"S e longitude: 54°49'30"W) estão localizadas na região sul do MS, com população estimada de 23.886 e 29.743 (IBGE, 2018), respectivamente. Ambas as cidades estão localizadas em grandes sistemas de aquíferos sobrepostos, ou seja, os aquíferos Guarani, Serra Geral (Itaporã e Caarapó) e Bauru-Caiuá (Caarapó) (ATLAS, 2010), que são importantes para o abastecimento de água do estado.

Para a coleta das amostras de águas subterrâneas realizada em junho de 2015, foram selecionados 12 e 11 poços nas cidades de Itaporã e Caarapó, respectivamente. Profissionais da

saúde que atuam no sistema público de saúde desses municípios contribuíram para a seleção dos poços amostrados. Os critérios de inclusão garantiram que essa água subterrânea fosse utilizada para consumo humano sem tratamento prévio e, que a localização dos poços garantisse a cobertura de toda a área urbana (Fig. 1).

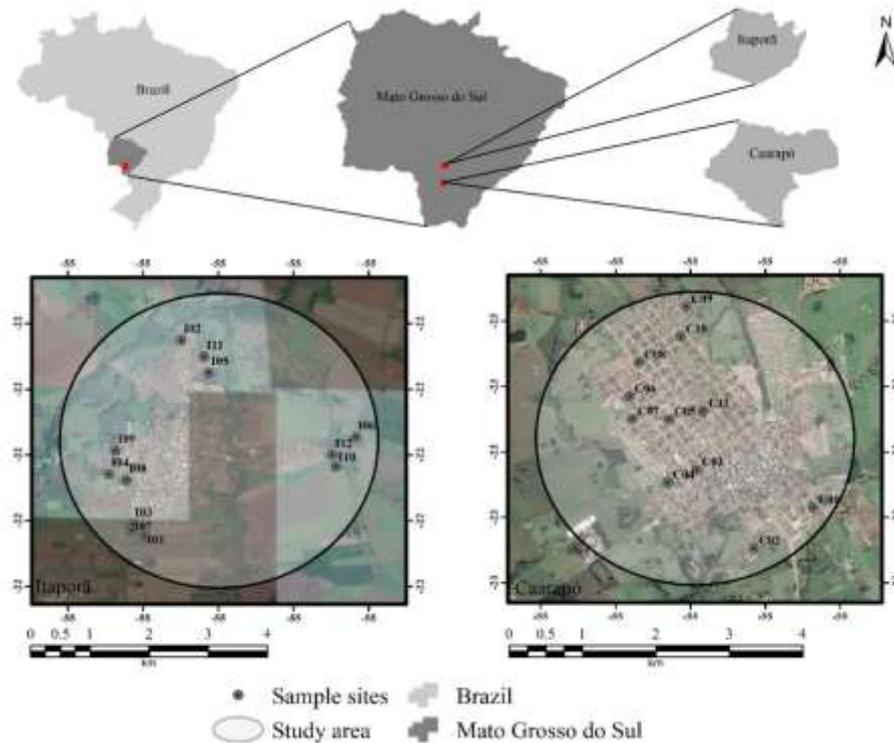


Fig. 1 Imagem aérea do Google Earth obtida pelo satélite GeoEye⁻¹ e os pontos de coleta selecionados nas cidades de Itaporã (I01-I12) e Caarapó (C01-C11) localizados no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil

Os poços foram classificados como perfurados ou cavados e seus dados de profundidade foram obtidos por meio de questionários aplicados aos residentes locais. O questionário utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal da Grande Dourados (Plataforma Brasil 417.582 / 2013).

2.2. Análise do uso e cobertura do solo

O uso e cobertura do solo foram mapeados usando imagens do satélite Landsat 8 correspondentes à data de coleta, que foram obtidas no site do serviço Geológico dos Estados Unidos (USGS), com tamanho de pixel (célula) de 30m x 30m. Para limite de estudo, foram gerados buffers com raio de 2,5 em torno das cidades de Caarapó e Itaporã e os tipos de uso e cobertura do solo incluídos foram agricultura, fragmentos florestais, corpos d'água e construções urbanas de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013). Combinações das bandas 1, 2 e 3 correspondentes às bandas azul, verde e vermelha, respectivamente, foram desenvolvidas. Também realizamos uma classificação não

supervisionada usando as ferramentas de classificação de imagens do software ArcGIS® versão 2018 (ESRI, 2011) para calcular as áreas e os percentuais de cada categoria de ocupação do solo. Os pontos I01, I03 e I07 e os pontos I10 e I12 foram agrupados por proximidade, pois a influência espacial foi a mesma.

2.3. Caracterização físico-química de águas subterrâneas

Os parâmetros físicos e químicos das amostras de águas subterrâneas, como oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica (CE), sólidos totais dissolvidos (STD), pH e temperatura, foram mensurados usando a sonda multiparâmetro YSI Professional Plus (YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, EUA). A turbidez foi analisada utilizando turbidímetro portátil (Policontrol), e o cloro e flúor foram quantificados seguindo a técnica colorimétrica de Alfakit.

2.4. Análises químicas

2.4.1. Amostragem de águas subterrâneas e determinação de metais

Amostras de água foram coletadas em junho de 2015, diretamente dos poços utilizando-se frascos de vidro estéreis de 1L e adicionado ácido nítrico (grau analítico) à amostra até atingir pH inferior a 2. Os frascos foram selados, enviados para o laboratório e refrigerados até análise. Os metais (Fe, Mn, Cr, Al, Cu, Zn, Ni, Cd, Co) foram analisados seguindo a metodologia proposta por Mermet e Poussuel (1995) com adaptações, utilizando um espectrômetro de emissão ótica indutivamente acoplado a plasma de argônio (ICP- OES) (Thermo Scientific, EUA), modelo iCAP 6000®.

As análises foram realizadas em triplicata utilizando gás argônio de alta pureza (99,99%) (White Martins). As concentrações dos diferentes elementos nas amostras foram determinadas utilizando curvas de calibração obtidas a partir de soluções padrões multielementares aquosas dos metais de interesse (Merck). Os métodos de limite de detecção e quantificação foram seguidos de acordo com os padrões da IUPAC (Long e Winefordner, 1983). Os parâmetros do procedimento analítico ICP-OES para determinar quantitativamente os elementos (metais), comprimentos de onda e linearidade das curvas de calibração são apresentados em S1 (Material suplementar).

2.4.2. Amostragem de águas subterrâneas e determinação de contaminantes emergentes

Considerando que as áreas estudadas apresentam intensa atividade antrópica urbana e agrícola, foram selecionados os seguintes compostos para estudo neste trabalho: imidacloprid, carbendazim, 2-hidroxy-atrazina, carbofurano, hexazinona, tebutiuron, atrazina, diuron, clomazone, ametrina, malation, tebuconazole, cafeína, testosterona e progesterona.

As amostras foram preparadas seguindo o protocolo de Machado et al. (2016), com algumas modificações. Amostras de água foram coletadas em frascos de vidro esterilizados de 1L e refrigeradas até a análise. As amostras foram filtradas em filtros de fibra de vidro de 0,45 µm (Sartorius) utilizando suporte de sistema de filtração a vácuo, seguido de extração em fase sólida (SPE) com cartucho Oasis® HLB 500 mg/6cc (Waters, Milford, EUA). O condicionamento dos cartuchos foi realizado com 4 mL de metanol e 4 mL de acetonitrila. Os analitos de interesse foram extraídos de 1L de amostra a uma vazão de 10 mL min⁻¹ e, eluídos da fase extratora empregando 8 mL de metanol em um sistema Sep de 12 portas coletor a vácuo (Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA). O solvente foi cuidadosamente evaporado até à secura com um fluxo suave de nitrogênio e, os compostos alvos foram ressuspensos para um volume final de 0,4 mL de água/metanol, 70/30 (v/v).

A determinação e quantificação foram realizadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS) usando sistema Agilent 1200 Series LC acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (Agilent 6410), equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI). Monitoramento de reação múltipla (MRM) foi usado para quantificar os elementos por espectrometria de massa. A quantificação foi feita usando padronização externa de calibração e o limite instrumental de detecção foi obtido de acordo com Miller e Miller (2005) e variou entre 5 e 250 pg (Tab. S2).

2.5. Critérios de qualidade da água subterrânea (CQA) para consumo humano e avaliação de risco

No Brasil, a Resolução CONAMA 396 estabelece os valores máximos permitidos (VMP) para substâncias químicas em águas subterrâneas destinadas ao consumo humano. Esta legislação inclui VMP para alguns dos químicos investigados neste trabalho (Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn), bem como para três dos doze pesticidas analisados (atrazina, carbofurano e malation). É importante notar que nem todos os VMP foram definidos considerando os critérios de proteção da saúde humana. Os VMP para Al, Fe, Mn e Zn foram definidos com base em valores que interferem nas características organolépticas da água, que geralmente são inferiores às exigidas para a proteção da saúde humana.

Portanto, os critérios de qualidade da água (CQA) para consumo humano com base na proteção da saúde foram calculados considerando o cenário de exposição proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1996) para metais e contaminantes emergentes. Também utilizamos as doses de referência (DRf) obtidas do Sistema Integrado de Informações de Risco (IRIS) da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) ou da Agência de

Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR). Os critérios de qualidade da água (WQC) foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\text{CQA} = \frac{\text{DRf} \times \text{FA} \times \text{PC}}{\text{CAD}}$$

Onde DRf é a dose de referência para cada composto; FA é o fator de alocação (usamos 10% da DRf); PC é o peso corporal (60 kg) e CDA é o consumo diário de água (2 L por dia).

As concentrações de cada composto quantificadas nas amostras de águas subterrâneas para consumo humano foram comparadas com o VMP e o CQA. Quando as concentrações de metais ou contaminantes emergentes excedem o CQA, existe um risco para a saúde humana quando a ingestão de água ocorre por longos períodos (Umbuzeiro et al. 2010).

3. Resultados e discussão

3.1. Perfil do uso e cobertura do solo

As áreas agrícolas foram predominantes em todos os locais de amostragem na cidade de Itaporã, seguida pelos fragmentos florestais e construções urbanas (Fig. 2A). A situação de Caarapó foi distinta (Fig. 2B), uma vez que as áreas ocupadas por construção urbana foram predominantes em quase todos os locais de amostragem, seguida pela agricultura e fragmentos florestais.

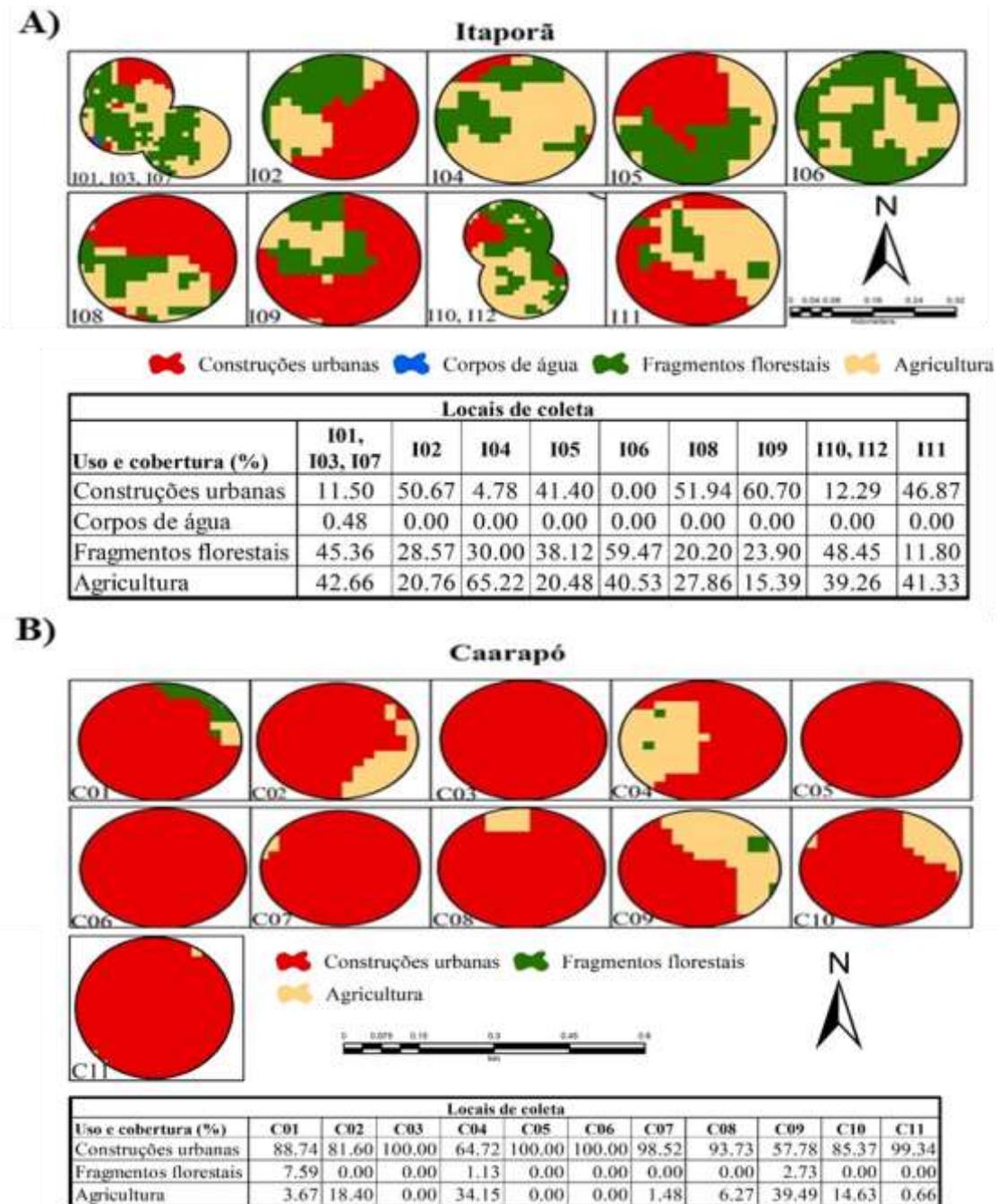


Fig. 2 Mapa de uso e ocupação do solo dos diferentes pontos de coleta de água analisados nas cidades de (A) Itaporã (I01-I12) e (B) Caarapó (C01-C11)

3.2. Caracterização físico-química

Os níveis de sólidos totais dissolvidos (STD), turbidez, pH, cloro e flúor obtidos para todas as amostras de águas subterrâneas foram comparados com os padrões brasileiros de qualidade de águas subterrâneas destinadas ao consumo humano descritos na Resolução CONAMA n° 396 (Brasil, 2008). Embora não existam padrões de qualidade de água subterrânea estabelecidos na legislação brasileira para oxigênio dissolvido (OD), condutividade

elétrica (CE) e temperatura, esses parâmetros também foram determinados em todas as amostras (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização e dados físico-químicos dos poços de Itaporã e Caarapó.

| Pontos | Caracterização dos poços | | Parâmetros físico-químicos | | | | | | | |
|------------|--------------------------|---------|----------------------------|-----------|------------------|----------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
| | P (m) | Tipo | OD (mg/L) | CE (mS/m) | Temperatura (°C) | STD (mg/L) | Turbidez (NTU) | pH | Cloro (mg/L) | Flúor (mg/L) |
| I01 | <5 | Cavado | 4,95 | 105,7 | 24,4 | 76,48 | 0,10 | 5,8 | 0,06 | 0 |
| I02 | <5 | Cavado | 2,13 | 45,9 | 24 | 93,76 | 5,3 | 4,97 | 0 | 0 |
| I03 | >5-10 | Tubular | 6,23 | 188,6 | 21,9 | 1207,04 | 0,10 | 6,45 | 0 | 0 |
| I04 | >15 | Tubular | 2,72 | 37,8 | 24,1 | 41,92 | 0,10 | 5,62 | 0 | 0 |
| I05 | >15 | Tubular | 2,84 | 42,6 | 24,1 | 72,64 | 0,10 | 5,56 | 0 | 0 |
| I06 | >5-10 | Cavado | 4,68 | 12,2 | 24,7 | 08,08 | 0,10 | 5,15 | 0 | 0 |
| I07 | >15 | Tubular | 4,74 | 180,55 | 24,5 | 1206,40 | 0,10 | 6,15 | 0 | 0 |
| I08 | <5 | Tubular | 1,56 | 53,9 | 24,9 | 44,96 | 0,10 | 4,87 | 0 | 0,12 |
| I09 | >10-15 | Cavado | 2,48 | 346,6 | 24,1 | 2218,24 | 0,10 | 5,96 | 0 | 0 |
| I10 | >10-15 | Tubular | 5,2 | 54,4 | 24,7 | 48,16 | 0,10 | 5 | 0 | 0 |
| I11 | >10-15 | Cavado | 2,8 | 40,6 | 25,5 | 59,84 | 0,10 | 5,34 | 0 | 0 |
| I12 | <5 | Cavado | 2,55 | 31,7 | 24,7 | 02,88 | 0,10 | 5,3 | 0 | 0 |
| C01 | >15 | Tubular | 2,94 | 71,9 | 24,5 | 60,16 | 0,1 | 4,86 | 0,23 | 0 |
| C02 | >10-15 | Cavado | 2,8 | 307,6 | 21,9 | 1968,64 | 0,1 | 5,3 | 0 | 0 |
| C03 | >15 | Tubular | 2,18 | 173,5 | 24,6 | 1110,40 | 0,1 | 5,03 | 0 | 0 |
| C04 | >15 | Tubular | 3,87 | 117,1 | 22,7 | 49,44 | 0,1 | 5,42 | 0 | 0 |
| C05 | >15 | Tubular | 3,53 | 253,3 | 24 | 1621,12 | 0,1 | 4,95 | 0 | 0,55 |
| C06 | >15 | Tubular | 5,21 | 147,2 | 24,6 | 42,08 | 0,1 | 5,39 | 0 | 0,03 |
| C07 | <5 | Tubular | 3,07 | 47,3 | 24,4 | 02,72 | 3,56 | 6,7 | 0 | 0,03 |
| C08 | >15 | Tubular | 1,72 | 75,3 | 24,6 | 481,92 | 0,1 | 4,93 | 0 | 0 |
| C09 | >5-10 | Cavado | 3,19 | 422,3 | 23,6 | 2702,72 | 1,06 | 4,95 | 0 | 0 |
| C10 | <5 | Cavado | 2,49 | 273 | 25,3 | 1747,20 | 0,1 | 5,67 | 0 | 0 |
| C11 | >15 | Tubular | 1,66 | 101,9 | 24,2 | 52,16 | 0,1 | 5,48 | 0 | 0,29 |
| VMP | - | - | - | - | - | 1000 | 5 | 6 a 9,5 | 5 | 1,5 |

VMP- Valor Máximo permitido para águas destinadas ao consumo humano estabelecidos pela resolução nº 396 do CONAMA; P- profundidade; OD- oxigênio dissolvido; CE- condutividade elétrica; STD- sólidos totais dissolvidos; pH- potencial hidrogeniônico. Valores em desacordo com os padrões brasileiros de qualidade da água (Brasil 2008) são apresentados em negrito.

Para os dados de cloro e flúor, todos os valores mensurados em ambas cidades estavam de acordo com o VMP para águas subterrâneas brasileiras (Brasil, 2008). Os valores de STD para as amostras de Itaporã variaram de 2,80 a 2.218,24 mg/L, similar aos valores observados em Caarapó que variaram de 2,70 a 2.702,72 mg/L. Três pontos em Itaporã (I03, I07 e I09) apresentaram valores de STD acima do VMP (Brasil, 2008), enquanto que em Caarapó isso ocorreu em cinco pontos (C02, C03, C05, C09 e C10).

Também houve altos valores de STD (> 1000 mg / L) e CE (> 173,5 mS/m) nos mesmos locais de amostragem (Tabela 1), este fato pode ser explicado devido os locais estarem ao redor de áreas agrícolas nas duas cidades. Esses resultados corroboram com os obtidos por Selvakumar et al. (2017) que relataram que o aumento de STD pode estar relacionado ao uso de fertilizantes e disposição de resíduos agrícolas e, conseqüentemente, à sua percolação no solo com a água da chuva. Ambos os parâmetros indicam a dissolução de íons nas águas subterrâneas.

A turbidez de todos os locais de amostragem em ambas as cidades está de acordo com o valor máximo permitido estabelecido pela legislação brasileira (Brasil, 2008), com exceção do ponto I02. Em geral, as amostras de águas subterrâneas apresentaram pH levemente ácido. Em Itaporã o pH das amostras variou de 4,87 a 6,45 e em Caarapó o pH variou de 4,86 a 6,70. Apenas os pontos I03 e I07 e C07 apresentaram valores de pH de acordo com o valor máximo permitido pela legislação (Brasil, 2008).

Águas subterrâneas com pH ácido também foram relacionadas com a contaminação por fertilizantes amplamente utilizados na agricultura (Jeyaruba e Thushyanthy 2009; Wongsasuluk et al. 2018). Isso pode ter sido observado neste estudo devido todos os pontos em Itaporã e 72,7% dos em Caarapó estarem próximos a áreas agrícolas (Fig. 1 e 2). Também é importante ressaltar que águas ácidas favorecem a solubilização de íons metálicos, fator que contribui para o aumento de seus níveis nas amostras de água e também para o aumento da condutividade elétrica das amostras.

A legislação atual utilizada como referência não especifica valores limite para OD, CE e temperatura para águas subterrâneas destinadas ao consumo humano. Os valores de OD variaram de 1,56 a 6,23 mg/L, para as amostras coletadas em Itaporã, e para as amostras coletadas em Caarapó os valores foram semelhantes variando de 1,66 a 5,21 mg/L. Para as amostras de Itaporã, a CE variou de 31,7 a 346,6 mS/m, e para as amostras coletadas em Caarapó variou de 47,3 a 422,3 mS/m. A temperatura média para ambas as cidades foi de 24°C.

3.3. Determinação de metais em amostras de águas subterrâneas

O Cd não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. O Ni foi quantificado somente na amostra coletada no ponto C03 e sua concentração excedeu o valor máximo permitido estabelecido pela legislação brasileira para águas subterrâneas destinadas ao consumo humano (Brasil, 2008). Mn foi o metal com maior número de amostras em desconformidade (11 amostras) seguido por Al e Fe (2 amostras cada).

A concentração de Mn foi a maior em I10 (1,63 mg/L), que foi 16 vezes maior que o valor máximo permitido (0,1 mg/L), o que representa um risco para a saúde da população que consome desta água. Cr, Cu e Zn foram quantificados em todas as amostras com concentrações abaixo dos valores máximos permitidos estabelecidos (Brasil, 2008). Não há um padrão para Co na legislação brasileira (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação e quantificação de metais em água de poços de Itaporã e Caarapó.

| Pontos | Metais (mg/L) | | | | | | | |
|------------|----------------------------------|----------|-------------|----------|----------------|----------------|----------------|----------|
| | Al | Co | Cr | Cu | Fe | Mn | Ni | Zn |
| I01 | ND | 0,0220± | 0,0102± | 0,0061± | ND | 0,6081± | 0,0062± | 0,0079± |
| | | 0,00034 | 0,00004 | 0,00020 | | 0,00869 | 0,00045 | 0,00014 |
| I02 | ND | 0,0034± | 0,0084± | 0,0017± | ND | 0,0111± | ND | ND |
| | | 0,00001 | 0,00222 | 0,00030 | | 0,00042 | | |
| I03 | ND | 0,0042± | 0,0092± | 0,0050± | 0,0142± | 0,0196± | 0,0085± | 0,0038± |
| | | 0,00005 | 0,00008 | 0,00040 | 0,00458 | 0,00040 | 0,00750 | 0,00020 |
| I04 | ND | 0,0041± | 0,0079± | 0,0028± | ND | 0,1062± | ND | ND |
| | | 0,00007 | 0,00076 | 0,00035 | | 0,00237 | | |
| I05 | 0,0315± 0,00010 | 0,0258± | 0,0077± | 0,0036± | ND | 0,0484± | ND | 0,0003± |
| | | 0,00016 | 0,00084 | 0,00044 | | 0,00199 | | 0,00005 |
| I06 | ND | 0,0164± | 0,0077± | 0,0083± | 0,0290± | 0,0772± | ND | 0,0096± |
| | | 0,00008 | 0,00030 | 0,00006 | 0,00021 | 0,00129 | | 0,00014 |
| I07 | 0,0476± 0,00096 | 0,0163± | 0,0077± | 0,0119± | 0,2217± | 0,0578± | 0,0356± | 0,0432± |
| | | 0,00008 | 0,00003 | 0,00061 | 0,00682 | 0,00129 | 0,01014 | 0,00047 |
| I08 | ND | 0,0031± | 0,0081± | 0,0101± | 1,1240± | 0,1011± | ND | 0,0045± |
| | | 0,00011 | 0,00002 | 0,00002 | 0,01901 | 0,00220 | | 0,00011 |
| I09 | ND | 0,0003± | 0,0082± | 0,0025± | ND | 0,0613± | ND | 0,0007± |
| | | 0,00010 | 0,00019 | 0,00036 | | 0,00067 | | 0,00005 |
| I10 | 0,7880± 0,00187 | 0,0562± | 0,0078± | 0,0102± | ND | 1,6320± | ND | 0,0020± |
| | | 0,00003 | 0,00002 | 0,00004 | | 0,02014 | | 0,00008 |
| I11 | ND | 0,0038± | 0,0082± | 0,0026± | ND | 0,0092± | ND | ND |
| | | 0,00009 | 0,00034 | 0,00023 | | 0,00027 | | |
| I12 | 0,4837± 0,00409 | 0,0395± | 0,0078± | 0,0140± | 0,0140± | 0,7479± | ND | 0,0047± |
| | | 0,00012 | 0,00037 | 0,00002 | 0,00113 | 0,00679 | | 0,00007 |
| C01 | 0,0083± 0,00136 | 0,0134± | 0,0101± | 0,0105± | 0,0876± | 0,2676± | 0,0128± | 0,0032± |
| | | 0,00001 | 0,00026 | 0,00017 | 0,00141 | 0,00024 | 0,00304 | 0,00013 |
| C02 | 0,1625± 0,00384 | 0,0133± | 0,0096± | 0,0057± | 0,7825± | 0,5164± | 0,0159± | 0,0175± |
| | | 0,00010 | 0,00055 | 0,00004 | 0,00145 | 0,00147 | 0,00449 | 0,00043 |
| C03 | ND | 0,0227± | 0,0096± | 0,0280± | 0,0111± | 0,0412± | 0,0918± | 0,0908± |
| | | 0,00016 | 0,00009 | 0,00028 | 0,00248 | 0,00095 | 0,00204 | 0,00019 |
| C04 | 0,0235± 0,02128 | 0,0059± | 0,0083± | 0,0030± | 0,0272± | 0,1098± | ND | 0,0056± |
| | | 0,00019 | 0,00048 | 0,00026 | 0,00012 | 0,00216 | | 0,00019 |
| C05 | 0,0448± 0,00066 | 0,0069± | 0,0083± | 0,0067± | 0,0428± | 0,5288± | ND | 0,0113± |
| | | 0,00009 | 0,00006 | 0,00024 | 0,00098 | 0,00662 | | 0,00019 |
| C06 | ND | 0,0032± | 0,0075± | 0,0031± | 0,0488± | 0,0624± | ND | ND |
| | | 0,00010 | 0,00033 | 0,00006 | 0,00747 | 0,00089 | | |
| C07 | ND | 0,0011± | 0,0074± | 0,0058± | 0,0552± | 0,0266± | ND | 0,0038± |
| | | 0,00008 | 0,00041 | 0,00043 | 0,00039 | 0,00131 | | 0,00012 |
| C08 | ND | 0,0022± | 0,0073± | 0,0026± | 0,0064± | 0,0739± | ND | ND |
| | | 0,00015 | 0,00023 | 0,00077 | 0,00147 | 0,00013 | | |
| C09 | 0,1414± 0,00212 | 0,0020± | 0,0069± | 0,0034±, | ND | 0,5993± | 0,0047± | ND |
| | | 0,00010 | 0,00008 | 00006 | | 0,00136 | 0,00167 | |
| C10 | 0,181± 0,013 | 0,0081± | 0,0065± | 0,0050± | ND | 1,3152± | ND | 0,0004± |
| | | 0,00007 | 0,00048 | 0,00058 | | 0,00151 | | 0,00006 |
| C11 | ND | 0,0052± | 0,0077± | 0,0050± | ND | 0,1469± | ND | 0,0038± |
| | | 0,00005 | 0,00013 | 0,00035 | | 0,00180 | | 0,00010 |
| VMP | 0,20 | * | 0,05 | 2 | 0,30 | 0,10 | 0,07 | 5 |

I – Itaporã; C – Caarapó; VMP – Valor máximo permitido para águas destinadas ao consumo humano (Brasil 2008); * Cobalto não apresenta VMP definido pela legislação brasileira (Brasil, 2008).

Em negrito valor acima da resolução do CONAMA nº 396/ 2008. LOD= limite de detecção; LOQ= limite de quantificação.

Todos os pontos na cidade de Itaporã onde foram encontrados metais com concentrações acima dos valores máximos permitidos (Brasil, 2008), estavam localizados em regiões cobertas com aproximadamente 20 a 65% por áreas agrícolas (Fig. 2A). Um perfil distinto foi observado para Caarapó, onde os locais contaminados por metais estavam predominantemente localizados em áreas urbanizadas (Fig. 2B). Os metais podem ser originados das atividades antrópicas (principalmente fontes agrícolas e industriais) ou das características geológicas naturais do solo da região. A descarga indiscriminada de efluentes industriais, agrícolas e domésticos em córregos e rios contribuiu para a degradação e contaminação de aquíferos (Philippi e Pelicioni 2005).

3.4. Determinação de contaminantes emergentes em águas subterrâneas

Em Itaporã os pesticidas carbendazim, carbofurano, hexazinona, tebutiuron, diuron, ametrina, tebuconazole e simazina e os hormônios testosterona e progesterona não foram detectados. Apenas o pesticida imidacloprid foi quantificado em I11 (23 ng/L) (Tabela 3). Em Caarapó, pelo menos um dos contaminantes estudados foi detectado em cada ponto amostral, com imidacloprid (concentrações variando de 20,5 a 132,5 ng/L) e 2-hidroxiatrazina (concentrações variando de 16,0 a 80,0 ng/L) sendo os compostos mais frequentemente encontrados.

Carbofurano, simazina, tebuconazol, testosterona e progesterona não foram detectados nos pontos localizados em Caarapó. Os pontos com maior ocorrência de contaminantes foram o C03 com 8 contaminantes e C04, C08 e C09 com 6 contaminantes cada (Tabela 4). É importante ressaltar que a ocorrência de fragmentos florestais reduz o fluxo e a percolação de pesticidas e atenua o processo de erosão, servindo como uma barreira física protetora que reduz a chance de contaminação dos recursos hídricos (Casara et al. 2012). Os pontos com maior ocorrência de contaminantes emergentes detectados em Caarapó (Tabela 4) estão localizados na fronteira entre áreas urbanizadas e agrícolas, sem proteção de fragmentos florestais (Fig. 2).

Entre os contaminantes emergentes encontrados nas amostras de águas subterrâneas, a atrazina e o malation são os únicos pesticidas que apresentam valores máximos permitidos na legislação brasileira (2 e 190 µg/L, respectivamente) (Brasil, 2008). A legislação brasileira para águas subterrâneas estabelece padrões apenas para aproximadamente 30 pesticidas, e os pesticidas mais frequentes encontrados em nossas amostras não estão incluídos. A falta de padrões para muitos compostos limita a capacidade de garantir a segurança da água subterrânea consumida pela população. Segundo Montagner et al. (2017), muitos dos efeitos de contaminantes emergentes no meio ambiente e na saúde humana podem ser atribuídos à

exposição crônica a esses contaminantes que ocorrem em concentrações extremamente baixas, especialmente em recursos hídricos.

Tabela 3. Concentrações dos compostos emergentes em amostras de água de poços de Itaporã.

| Contaminantes emergentes | Pontos | | | | | | | | | | | | LD (ng/L) | LQ (ng/L) |
|--------------------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----------|-----------|
| | I01 | I02 | I03 | I04 | I05 | I06 | I07 | I08 | I09 | I10 | I11 | I12 | | |
| Cafeína | 22,5 | <MQL | <MDL | <MQL | <MQL | <MDL | <MQL | <MQL | <MQL | 30 | <MQL | <MQL | 6 | 19,8 |
| Imidacloprid | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MQL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | 23 | <MDL | 5,3 | 17,4 |
| 2-Hydroxyatrazine | <MDL | <MDL | <MQL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MQL | <MQL | <MDL | <MQL | 2,7 | 9,0 |
| Atrazine | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MQL | <MQL | 3,9 | 12,8 |
| Clomazone | <MDL | <MDL | <MQL | <MDL | <MQL | <MQL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | 1,5 | 4,8 |
| Malathion | <MDL | <MQL | <MDL | <MDL | <MDL | <MQL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MQL | <MDL | 2,9 | 9,5 |

LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação; MDL = limite máximo de detecção; MLQ = limite máximo de quantificação

A cafeína foi quantificada nos pontos I01, I10, C02 e C03, com concentrações entre 22,5 e 104,0 ng/L (Tabelas 3 e 4). A cafeína é reconhecida internacionalmente por ser um marcador químico de contaminação fecal (Montagner et al. 2014), e sua presença nesses quatro pontos indica contaminação por esgoto doméstico. Assim, podemos sugerir que esses poços estão vulneráveis e que o esgoto depositado em biodigestores de fossa séptica pode estar atingindo a água subterrânea. Isso evidencia a necessidade de investigar outros marcadores químicos e biológicos de contaminação de esgoto doméstico nos poços localizados em ambas cidades.

Tabela 4. Concentrações de contaminantes emergentes em amostras de água de poços de Caarapó.

| Contaminantes emergentes | Pontos | | | | | | | | | | | LD (ng/L) | LQ (ng/L) |
|--------------------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|-----------|-----------|
| | C01 | C02 | C03 | C04 | C05 | C06 | C07 | C08 | C09 | C10 | C11 | | |
| Caffeine | <MQL | 27,5 | 104 | <MQL | <MDL | <MQL | <MQL | <MQL | <MQL | <MQL | <MDL | 6 | 19,8 |
| Imidacloprid | <MDL | <MQL | 39 | 86 | 188 | <MQL | <MQL | <MQL | 132,5 | 20,5 | <MDL | 5,3 | 17,4 |
| Carbendazim | <MDL | <MDL | <MQL | 9 | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | 2,7 | 8,8 |
| 2-Hydroxyatrazine | <MDL | <MDL | <MDL | 19 | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | 80 | 16 | <MQL | 2,7 | 9,0 |
| Hexazinona | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MQL | 18 | <MDL | <MDL | 2,5 | 8,1 |
| Tebutiuron | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | 21 | <MDL | <MDL | <MDL | 3,0 | 9,9 |
| Atrazine | <MDL | <MDL | <MQL | <MQL | <MDL | <MQL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | 3,9 | 12,8 |
| Diuron | <MDL | <MDL | <MQL | <MDL | <MDL | <MDL | <MQL | <MQL | <MDL | <MDL | <MDL | 1,8 | 5,8 |
| Clomazone | <MQL | <MQL | <MQL | <MDL | <MDL | <MDL | <MQL | <MQL | <MQL | <MQL | <MQL | 1,5 | 4,8 |
| Ametryn | <MDL | <MDL | <MQL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | 3,2 | 10,6 |
| Malathion | <MDL | 11,5 | <MQL | 13 | <MDL | <MDL | <MDL | <MDL | <MQL | <MDL | <MDL | 2,9 | 9,5 |

LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação; MDL = limite máximo de detecção; MLQ = limite máximo de quantificação

3.5. Avaliação de risco humano de contaminantes encontrados em água subterrânea

Os metais Cr, Co, Mn e Ni apresentaram concentrações acima do VMP (Brasil, 2008) ou CQA calculado (Fig. 3). Nestes casos, é esperado um aumento do risco para a saúde das populações que consomem as águas subterrâneas obtidas desses poços por longos períodos. Todos os outros metais apresentaram concentrações abaixo do VMP ou CQA e, portanto, não oferecem risco associado com a exposição por ingestão de água subterrânea (Tabela 2). Esses

metais podem ter origem de fontes naturais, como rochas, ou de fontes antropogênicas, como águas residuais de origem doméstica e industrial, e também relacionadas à agricultura intensiva, uma vez que esses elementos estão presentes na composição de certos pesticidas e fertilizantes (Bhutiani et al. 2016; Bhutiani et al., 2017; De Joode et al., 2016). Os mesmos metais também foram observados com concentrações superiores ao nível seguro para consumo humano em outros estudos realizados na África e Índia e foram considerados como elementos que contribuem para os riscos não carcinogênicos à saúde humana via consumo de água subterrânea (Edokpayi et al. 2018; Kumar et al 2017; Mishra et al. 2018; Singh e Ramanathan 2018).

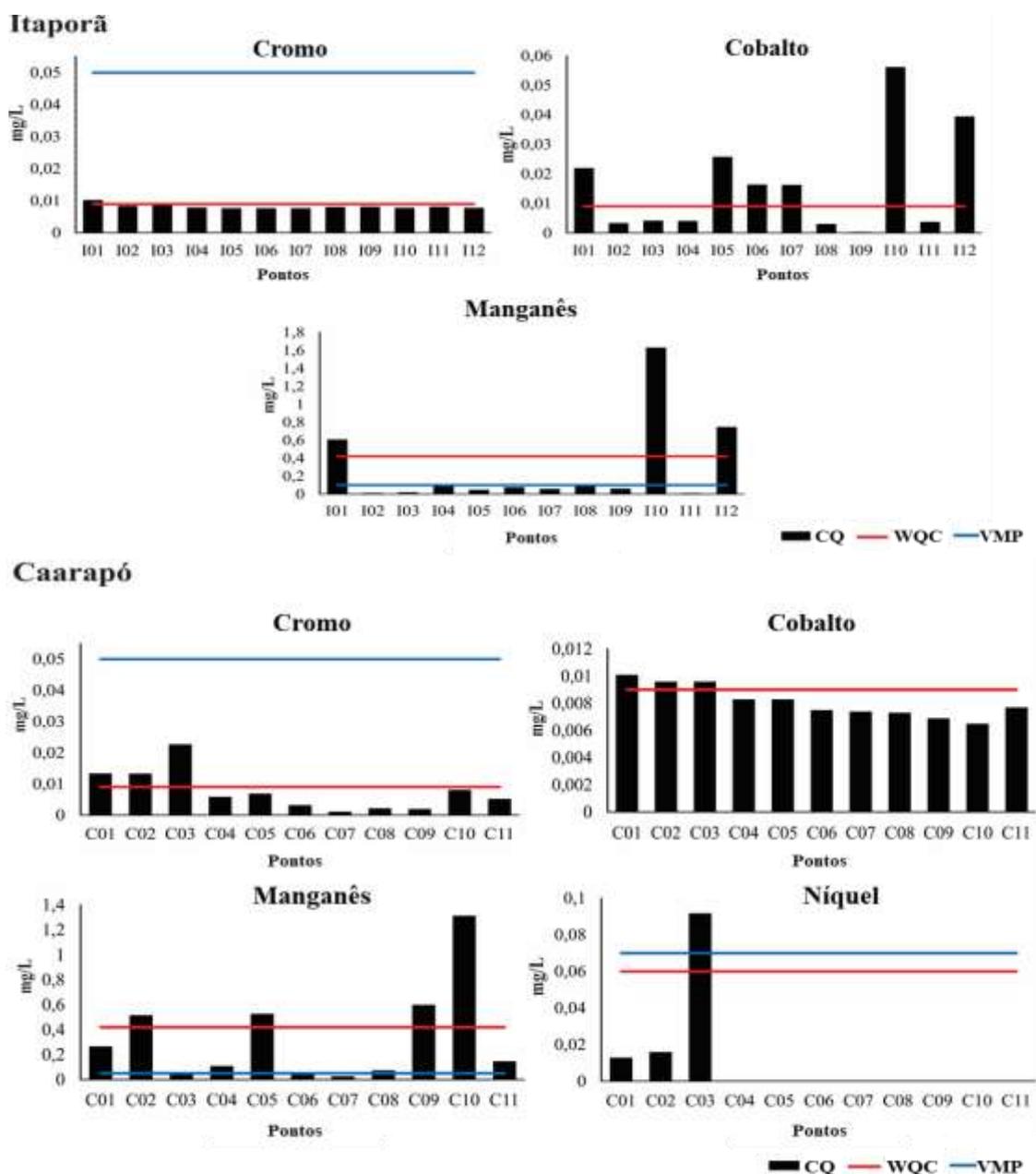


Fig. 3 Metais com concentrações quantificadas (CQ) e o cálculo do critério de qualidade de água (CQA) nos pontos das cidades de (A) Itaporã e (B) Caarapó

A legislação brasileira não estabelece um VMP para Co (Tabela 2). No entanto, um risco para a saúde da população que consome diariamente estas águas subterrâneas foi identificado baseado na comparação com o CQA calculado. Altas concentrações de Co podem causar problemas como diarreia, deformação óssea, alterações hematológicas e distúrbios cardíacos (ATSDR, 2004; Izah et al., 2016). Em pontos onde as concentrações de Mn estavam acima do VMP legislado (Brasil, 2008), mas não excediam o CQA, não é esperado riscos para a saúde da população, visto que os VMP foram estabelecidos com base nas mudanças das características organolépticas da água e não em problemas de saúde.

A exposição ao Mn via consumo de água pode perturbar vários processos fisiológicos e causar déficit acadêmico em crianças, redução do desempenho da memória e funções motoras, problemas comportamentais e deficiência intelectual (Bouchard et al. 2010; Khan et al. 2011; Khan et al. 2012). Este metal também está associado ao aumento do risco de redução de peso em recém-nascidos (Grazuleviciene et al. 2009; Rahman et al. 2015). O Cr pode causar distúrbios gastrointestinais, lesões renais e hepáticas, desordens do sistema nervoso central e problemas respiratórios, além de sua forma hexavalente ser carcinogênica (Dabai et al. 2013; Izah et al. 2016; Martin e Griswold 2009; Wunsch Filho, 2012). Os efeitos nocivos do Ni relatados na literatura incluem dano dérmico, náusea, dor abdominal, asma, conjuntivite, reações inflamatórias e efeitos neurológicos como tontura, dores de cabeça e cansaço (Cempel e Nikel 2006; Das e Dhundasi 2008; Li et al. 2014).

Nenhum dos contaminantes emergentes encontrados nas amostras analisadas excedeu o VMP ou o CQA calculado. No entanto, a presença destes compostos em amostras de águas subterrâneas demonstra a vulnerabilidade dos poços utilizados pela população e o impacto antropogênico sobre esses recursos hídricos. Os esgotos domésticos depositados no solo e as atividades agrícolas parecem ser as fontes desses contaminantes.

4. Conclusão

Os dados obtidos neste trabalho demonstraram que a água subterrânea consumida pela população residente nas duas cidades está exposta a alguns metais e contaminantes emergentes. A ocorrência desses químicos pode estar relacionada ao uso e ocupação do solo, principalmente pelas atividades agrícolas e áreas urbanizadas através do esgoto doméstico.

Quando as concentrações de Cr, Co, Mn e Ni observadas em alguns pontos foram comparadas com o CQA calculado, observamos risco para a saúde humana, mesmo no caso de amostras que apresentaram concentrações desses metais de acordo com a legislação brasileira para água subterrânea destinada ao consumo humano. Estes resultados reforçam a necessidade

de rever os VMPs presentes na legislação e a necessidade de implementar um programa de monitoramento de pesticidas em águas subterrâneas para identificar compostos prioritários e estabelecer seu VMP.

Com base nos metais e nos contaminantes emergentes encontrados nas amostras de águas subterrâneas analisadas, é possível afirmar que estratégias para mitigar os impactos da agricultura intensiva na região e a coleta e tratamento de esgoto doméstico são medidas necessárias para conter a contaminação dos poços utilizados pela população das duas cidades.

Referências

- Ahamad A, Raju J, Madhay S, Gossel W, Wycisk P. (2018) Impact of non-engineered Bhalswa landfill on groundwater from Quaternary alluvium in Yamuna flood plain and potential human health risk, New Delhi, India. *Quaternary International*. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2018.06.011>
- Ahmed MK, Baki MA, Islam MS, Kundu GK, Habibullah-Al-Mamun M, Sarkar SK, Hossain MM. (2015) Human health risk assessment of heavy metals in tropical fish and shellfish collected from the river Buriganga, Bangladesh. *Environmental Science and Pollution Research* 22:15880-15890. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4813-z>
- Albuquerque AF, Ribeiro JS, Kummrow F, Nogueira AJA, Montagner CC, Umbuzeiro GA. (2016) Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. *Environmental Science: Processes & Impacts* 18:779-787. <https://doi.org/10.1039/C6EM00268D>
- ANA (Agência Nacional das Águas) (2018) Panorama da quantidade das águas. <http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/panorama-das-aguas/colecao-panorama-das-aguas>. Accessed 30 April 2018
- Annangi B, Bonassi S, Marcos R, Hernández A. (2016) Biomonitoring of humans exposed to arsenic, chromium, nickel, vanadium, and complex mixtures of metals by using the micronucleus test in lymphocytes. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 770:140-161. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.03.003>
- ATLAS (2010) Abastecimentos urbano de água: resultado por estado/ Agência Nacional de Águas; Engecorps/Cobrape – Brasília: ANA: Engecorps/ Cobrape.
- ATSDR (2004) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Copper. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- ATSDR (2008) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Aluminum. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Bouchard MF, Sauvé S, Barbeau B, Legrand M, Brodeur ME, Bouffard T, Limoges E, Bellinger D, Bellinger D, Mergler D. (2010) Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water. *Environmental health perspectives* 119:138-143. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002321>
- Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (2008) Resolução nº 396, de 3 April 2008. <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>. Accessed 20 October 2017
- Bhutiani R, Kulkarni DB, Khanna DR, Gautam A. (2016) Water quality, pollution source apportionment and health risk assessment of heavy metals in groundwater of an industrial area in North India. *Exposure and Health* 8:3-18.
- Bhutiani R, Kulkarni DB, Khanna DR, Gautam A. (2017) Geochemical distribution and environmental risk assessment of heavy metals in groundwater of an industrial area and its surroundings, Haridwar, India. *Energy, Ecology and Environment* 2:155-167.
- Carvalho CF, Menezes-Filho JA, Matos VP, Bessa JR, Coelho- Santos J, Viana GFS, Argollo N, Abreu N. (2014) Elevated airborne manganese and low executive function in school-aged children in Brazil. *Neurotoxicology* 45:301-308. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.11.006>
- Casara KP, Vecchiato AB, Lourencetti C, Pinto AA, Dores, EFGC. (2012) Environmental dynamics of pesticides in the drainage area of the São Lourenço River headwaters, Mato Grosso State, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 23:1719-1731. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532012005000037>

- Cempel M, Nickel G (2006) Nickel: A review of its sources and environmental toxicology. *Polish Journal of Environmental Studies*. 15.
- Dabai MU, Bagudo BU, Jodi LM, Ocheni L. (2013) Evaluation of some trace metal levels in the water, fish and aquatic plant in River Sokoto, North-Western Nigeria. *Asian Journal of Applied Sciences* 1:195–199
- Das KK, Das SN, Dhundasi AS. (2008) Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *Indian Journal of Medical Research* 128:412.
- De Joode BW, Barbeau B, Bouchard MF, Mora AM, Skytt A, Córdoba L, Quesada R, Lundh T, Lindh CH, Mergler D. (2016) Manganese concentrations in drinking water from villages near banana plantations with aerial mancozeb spraying in Costa Rica: Results from the Infants' Environmental Health Study (ISA). *Environmental Pollution* 215:247-257. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.015>
- Dong W, Lin X, Du S, Zhang Y, Cui L. (2015) Risk assessment of organic contamination in shallow groundwater around a leaching landfill site in Kaifeng, China. *Environmental Earth Sciences* 74:2749-2756. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4669-z>
- Edokpayi JN, Enitan AM, Mutileni N, Odiyo JO. (2018) Evaluation of water quality and human risk assessment due to heavy metals in groundwater around Muledane area of Vhembe District, Limpopo Province, South Africa. *Chemistry Central Journal* 12:2. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0369-y>
- Emmanuel E, Pierre MG, Perrodin Y. (2009) Groundwater contamination by microbiological and chemical substances released from hospital wastewater: Health risk assessment for drinking water consumers. *Environment international* 4:718-726. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.01.011>
- ESRI (2011) ArcGIS Desktop: Release 10. Redlands, CA: Environmental Systems Research Institute.
- Grazuleviciene R, Nadisauskiene R, Buinauskiene J, Grazulevicius T. (2009) Effects of Elevated Levels of Manganese and Iron in Drinking Water on Birth Outcomes. *Polish Journal of Environmental Studies* 18:819–825.
- Hosseini M, Nabavi SMB, Nabavi SN, Pour NA. (2015) Heavy metals (Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Fe, and Hg) content in four fish commonly consumed in Iran: risk assessment for the consumers. *Environmental monitoring and assessment* 187:237. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4464-z>
- IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) (2014) Histórico de comercialização de Químicos e Biológicos: 2000 – 2017. <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>. Accessed 21 September 2018
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2013) Manuais Técnicos em Geociências, nº 7. Manual Técnico de Uso da Terra. 3º Ed. Rio de Janeiro, RJ.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2018) <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ms/panorama>. Accessed 21 September 2018
- IRIS (Integrated Risk Information System, USEPA) (2018) https://cfpub.epa.gov/ncea/iris_drafts/simple_list.cfm. Accessed 21 July 2018
- Izah SC, Chakrabarty N, Srivastav AL. (2016) A review on heavy metal concentration in potable water sources in Nigeria: Human health effects and mitigating measures. *Exposure and Health* 8:285-304. <https://doi.org/10.1007/s12403-016-0195-9>
- Jeyaruba T, Thushyanthy M. (2009) The effect of agriculture on quality of groundwater: A case study. *Middle-East Journal of Scientific Research* 4:110-114.
- Jitar O, Teodosiu C, Oros A, Plavan G, Nicoara M. (2015) Bioaccumulation of heavy metals in marine organisms from the Romanian sector of the Black Sea. *New biotechnology* 32:369-378. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.11.004>
- Keenan CR, Goth-Goldstein R, Lucas D, Sedlak DL. (2009) Oxidative stress induced by zero-valent iron nanoparticles and Fe (II) in human bronchial epithelial cells. *Environmental science & technology* 43:4555-4560. <https://doi.org/10.1021/es9006383>
- Khan K, Factor-Litvak P, Wasserman GA, Liu X, Ahmed E, Parvez F, Slavkovich V, Levy D, Mey J, Genn AV, Graziano JH. (2011) Manganese exposure from drinking water and children's classroom behavior in Bangladesh. *Environmental health perspectives* 119:1501, <https://doi.org/10.1289/ehp.1003397>

- Khan K, Wasserman GA, Liu X, Ahmed E, Parvez F, Slavkovich V, Levy D, Mey J, Genn AV, Graziano JH, Factor-Litvak P. (2012) Manganese exposure from drinking water and children's academic achievement. *Neurotoxicology* 33:91-97.
- Koutros S, Silverman DT, Alavanja MCR, Andreotti G, Lerro CC, Heltshe S, Lynch CF, Sandler DP, Blair A, Freeman LEB. (2015) Occupational exposure to pesticides and bladder cancer risk. *International journal of epidemiology* 45:792-805. <https://doi.org/10.1093/ije/dyv195>
- Kumakli H, Duncan AV, Daniel KM, Mehari TF, Stephenson J, Maple L, Crawford Z, Macemore CL, Babyak CM, Fakayode SO. (2017) Environmental biomonitoring of essential and toxic elements in human scalp hair using accelerated microwave-assisted sample digestion and inductively coupled plasma optical emission spectroscopy. *Chemosphere* 174:708-715. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.032>
- Kumar M, Ramanathan AL, Tripathi R, Farswan S, Kumar D, Bhattacharya P. (2017) A study of trace element contamination using multivariate statistical techniques and health risk assessment in groundwater of Chhaprola Industrial Area, Gautam Buddha Nagar, Uttar Pradesh, India. *Chemosphere* 166:135-145. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.086>
- Li Y, Sun J, Shang H. (2014) Effect of hOGG1 expression level on oxidative DNA damage among workers exposed to nickel in stainless steel production environment. *Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi= Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases* 32:578-581.
- Long GL, Winefordner JD. (1983) Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Analytical Chemistry* 55:712A-724A.
- Machado KC, Grassi MT, Vidal C, Pescara IC, Jardim WF, Fernandes AN, Sodré FF, Almeida FV, Santana JS, Canela MC, Nunes CRO, Bichinho KM, Severo FJR. (2016) A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. *Science of the Total Environment* 572:138-146. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.210>
- Martin S, Griswold W. (2009) Human health effects of heavy metals. *Environmental Science and Technology briefs for citizens* 15:1-6.
- Mermet JM, Poussel E. (1995) ICP emission spectrometers: 1995 analytical figures of merit. *Applied Spectroscopy* 49:12-18.
- Miller JC, Miller JN. (2005) *Statistics and chemometrics for Analytical Chemistry*. Harlow, England.
- Mishra H, Karmakar S, Kumar R, Kadambala P. (2018) A long-term comparative assessment of human health risk to leachate-contaminated groundwater from heavy metal with different liner systems. *Environmental Science and Pollution Research* 25:2911-2923. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0717-4>
- MMA (Ministério do Meio Ambiente) (2007) *Águas Subterrâneas: Um recurso a ser conhecido e protegido*. Brasília.
- Montagner CC, Vidal C, Sodré FF, Pescara IC, Jardim WF. (2014) A cafeína no meio ambiente. In: Canela, C. C., Jardim, W. F., Sodré, F. F., Grassi, M. T. (Eds). *Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil*. Editora Cubo, São Carlos, 11-24.
- Montagner CC, Vidal C, Acayaba RD. (2017) Emerging contaminants in aquatic matrices from Brazil: current scenario and analytical, ecotoxicological and legislative aspects. *Química Nova* 40:1094-1110. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170091>
- Patel P, Raju JN, Reddy SRBC, Suresh U, Gossel W, Wycisk P. (2016) Geochemical processes and multivariate statistical analysis for the assessment of groundwater quality in the Swarnamukhi River basin, Andhra Pradesh, India. *Environmental Earth Sciences* 75:611. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-5108-x>
- Philippi JA, Pelicioni MCF. (2005) *Educação Ambiental e Sustentabilidade*. Barueri, SP: Manole.
- Prashanth L, Kattapagari KK, Chitturi RT, Baddam VRR, Prasad LK. (2015) A review on role of essential trace elements in health and disease. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences* 4:75-85. <https://doi.org/10.4103/2277-8632.158577>
- Raanan R, Harley KG, Balmes JR, Bradman A, Lipsett M, Eskenazi B. (2014) Early-life exposure to organophosphate pesticides and pediatric respiratory symptoms in the CHAMACOS cohort. *Environmental health perspectives* 123:179-185. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408235>

- Rahman SM, Kippler M, Ahmed S, Palm B, Arifeen SE, Vahter M. (2015) Manganese exposure through drinking water during pregnancy and size at birth: A prospective cohort study. *Reproductive Toxicology* 53:68-74. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.03.008>
- Selvakumar S, Ramkumar K, Chandrasekar N, Magesh NS, Kaliraj S. (2017) Groundwater quality and its suitability for drinking and irrigational use in the Southern Tiruchirappalli district, Tamil Nadu, India. *Applied Water Science* 7:411-420. <https://doi.org/10.1007/s13201-014-0256-9>
- Shahsavani A, Fakhri Y, Ferrante M, Keramati H, Zandsalimi Y, Bay A, Rokhsane S, Pouya H, Moradi B, Bahmani Z, Khaneghah AM. (2017) Risk assessment of heavy metals bioaccumulation: fished shrimps from the Persian Gulf. *Toxin reviews* 36:322-330. <https://doi.org/10.1080/15569543.2017.1312451>
- Singh UK, Ramanathan AL, Subramanian V. (2018) Groundwater chemistry and human health risk assessment in the mining region of East Singhbhum, Jharkhand, India. *Chemosphere* 204:501-513. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.060>
- Starling AP, Umbach DM, Kamel F, Long S, Sandler DP, Hoppin JA. (2014) Pesticide use and incident diabetes among wives of farmers in the Agricultural Health Study. *Occupation e Environmental Medicine* 71:629- 635. <https://doi.org/10.1136/oemed2013-101659>
- Umbuzeiro GA, Kummrow F, Rei FFC. (2010) Toxicology, water quality standards and legislation. *InterfacEHS-Journal of Health, Environment and Sustainability* 5:1-14
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2008) Provisional Peer Reviewed Toxicity Values for Cobalt. <https://cfpub.epa.gov/ncea/pprtv/documents/Cobalt.pdf>. Accessed 21 July 2018
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2006) Provisional Peer Reviewed Toxicity Values for Iron and Compounds. <https://cfpub.epa.gov/ncea/pprtv/documents/IronandCompounds.pdf>. Accessed 21 July 2018
- WHO (World Health Organization) (1996) Trace Elements in Human Nutrition and Health. *Environmental Health Criteria*. Geneva.
- Wongsasuluk P, Chotpantarat S, Siriwong W, Robson M. (2018) Using urine as a biomarker in human exposure risk associated with arsenic and other heavy metals contaminating drinking groundwater in intensively agricultural areas of Thailand. *Environmental geochemistry and health* 40:323-348. <https://doi.org/10.1007/s10653-017-9910-0>
- Wünsch Filho V. (2012) Surveillance of work-related cancer: on the 2012 Guide published by Inca (Brazilian National Cancer Institute). *Brazilian Journal of Occupational Health* 37:6-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0303-76572012000100001>
- Yi Y, Tang C, Yi T, Yang Z, Zhang S. (2017) Health risk assessment of heavy metals in fish and accumulation patterns in food web in the upper Yangtze River, China. *Ecotoxicology and environmental safety* 145:295-302. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.022>

MATERIAL SUPLEMENTAR

METAIS E CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS E AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA

Environmental Science and Pollution Research

Luiza Flavia Veiga Francisco¹, Bruno do Amaral Crispim², Juliana Caroline Vivian Spósito¹, Julio César Jut Solórzano³, Nayara Halimy Maran¹, Fábio Kummrow⁴, Valter Aragão do Nascimento⁵, Cassiana Carolina Montagner⁶, Kelly Mari Pires De Oliveira² & Alexeia Barufatti^{2*}

¹Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.

²Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.

³UEMS / Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Dourados, MS, Brasil.

⁴Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brasil.

⁵Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

⁶Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

S1. Method validation, ICAP 6000-Duo series, Thermo Scientific, pneumatic nebulization. Element wavelengths (nm), linearity (R²), limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ).

| Metals | Wavelength (nm) | Linearity (R ²) | LOD (mg/L) | LOQ (mg/L) |
|--------|-----------------|-----------------------------|------------|------------|
| Al | 308,215 | 0,9999 | 0,0029 | 0,0099 |
| Cd | 214,438 | 0,9999 | 0,0015 | 0,0050 |
| Co | 228,616 | 0,9999 | 0,0030 | 0,010 |
| Cr | 283,563 | 0,9997 | 0,0022 | 0,0092 |
| Cu | 327,396 | 0,9992 | 0,00036 | 0,0012 |
| Fe | 239,562 | 0,9999 | 0,014 | 0,047 |
| Mn | 257,610 | 0,9999 | 0,0011 | 0,0052 |
| Ni | 341,476 | 0,9999 | 0,0163 | 0,0543 |
| Zn | 213,856 | 0,9960 | 0,00025 | 0,00085 |

S2. LC-SM/MS experimental parameters for each Emerging Contaminants (ECs).

| Emerging contaminants | Type of substance and chemical group | Retention time (min) | Precursor ion (m/z) | ESI mode | Production (m/z) | Collision energy (eV) | Relative abundance (%) | Instrumental parameters IDL (pg) | Linear correlation coefficient (r ²) |
|--------------------------|--|----------------------|---------------------|----------|-------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------------|--|
| Caffeine | Stimulant alkaloid | 3,091 | 195,1 | (+) | 138,1 110,1 69,1 | 15 20 20 | 31,7 12,0 | 15 | 0,988 |
| Imidacloprid | Neonicotinoid insecticide, veterinary drug | 1,185 | 256,0 | (+) | 208,9 175,1 | 10 15 | 7,5 | 25 | 0,922 |
| Carbendazim | Benzimidazole fungicide | 2,324 | 192,1 | (+) | 160,1 132,1 105,1 | 20 30 35 | 24,9 18,8 | 5 | 0,985 |
| Atrazine | Triazine herbicide | 5,877 | 216,2 | (+) | 174,1 103,9 | 15 15 | 17,4 | 5 | 0,851 |
| 2-hydroxyatrazine | Pesticide | 3,091 | 198,2 | (+) | 156,2 114,1 86,1 | 15 20 20 | 40,3 66,4 | 5 | 0,991 |
| Carbofuran | Pesticide | 4,491 | 222,0 | (+) | 165,0 123,0 55,0 | 10 20 16 | 22,0 15,3 | 5 | 0,988 |
| Hexazinone | Herbicide | 5,071 | 253,2 | (+) | 171,1 85,1 71,1 | 8 30 31 | 80,4 53,2 | 5 | 0,992 |
| Tebuthiuron | Herbicide | 5,243 | 229,1 | (+) | 172,1 116,1 57,2 | 10 30 34 | 56,8 41,7 | 5 | 0,944 |
| Diuron | Pesticide | 6,245 | 233,0 | (+) | 72,1 72,1 46 | 20 20 16 | 35,6 99,4 | 5 | 0,855 |
| Clomazone | Herbicide | 6,706 | 240,1 | (+) | 125,0 | 1 | --- | 5 | 0,870 |
| Ametrine | Herbicide | 6,877 | 228,2 | (+) | 186,1 158,1 138,1 | 15 20 20 | 14,9 22,9 | 5 | 0,928 |
| Malathion | Organophosphate insecticide, veterinary drug | 7,380 | 331,0 | (+) | 285,0 99,0 | 1 15 | 0,4 | 5 | 0,918 |
| Tebuconazole | Fungicide | 9,098 | 308,2 | (+) | 124,9 70,0 70,0 | 30 10 20 | 2,1 15,0 | 5 | 0,991 |
| Testosterone | Pharmaceutical/natural hormone, androgen | 8,092 | 289,3 | (+) | 109,1 97,1 79,1 | 25 20 20 | 77,8 2,5 | 5 | 0,983 |
| Progesterone | Pharmaceutical/natural hormone, progestogen | 10,335 | 315,3 | (+) | 109,1 97,2 79,2 | 15 25 30 | 63,0 7,7 | 5 | 0,992 |

S3. Calculation of water quality criteria.

| Compound | RfD mg/kg/day | Allocation Factor | Water quality criterion (mg/L) | Reference* |
|-----------------|----------------------|--------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| Aluminum | 1 | 0,1 | 3 | ATSDR, 2008 |
| Cobalt | 0,0003 | 0,1 | 0,009 | USEPA, 2008 |
| Chrome | 0,003 | 0,1 | 0,009 | IRIS, 2018 |
| Copper | 0,01 | 0,1 | 0,03 | ATSDR, 2004 |
| Iron | 0,7 | 0,1 | 2,1 | USEPA, 2006 |
| Manganese | 0,14 | 0,1 | 0,42 | IRIS, 2018 |
| Nickel | 0,02 | 0,1 | 0,06 | IRIS, 2018 |
| Zinc | 0,3 | 0,1 | 0,9 | IRIS, 2018 |

* Bibliographic source of the reference dose

CAPÍTULO III

CITOGENOTOXICIDADE DO ALUMÍNIO E MANGANÊS EM CONCENTRAÇÕES AMBIENTAIS

CITOGENOTOXICIDADE DO ALUMÍNIO E MANGANÊS EM CONCENTRAÇÕES AMBIENTAIS

Luiza Flavia Veiga Francisco¹, Débora da Silva Baldivia², Sylva Maria Farias Ferraz Klafke², Bruno do Amaral Crispim², Lucilene Finoto Viana³, Edson Lucas dos Santos², & Alexeia Barufatti^{2*}

¹Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.

²Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.

³Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais, Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Dourados, MS, Brasil.

*Correspondência do autor: Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila Progresso. Caixa Postal 322 - CEP: 79.825-070, Dourados, Brasil. Tel.: +55 67 34102223. E-mail: barufattialexeia@gmail.com (Barufatti, A).

Resumo

Os metais alumínio (Al) e manganês (Mn) são elementos encontrados naturalmente no ambiente, porém a exposição excessiva do ser humano a esses metais tem provocado efeitos negativos na saúde. Estudo anterior desse grupo de pesquisa mostrou a existência de áreas em que águas subterrâneas destinadas ao consumo humano apresentavam concentrações de Al e Mn acima do permitido pela legislação brasileira. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do Al e Mn em células CHO e CHO-XRS5. Para isso, células CHO e CHO-XRS5 foram tratadas com Al (0,2 - 2,0mg/L⁻¹) e Mn (0,1 - 3,0mg/L⁻¹), para determinação da citotoxicidade e genotoxicidade. Os metais Al e Mn apresentaram efeito citotóxico em ambas as linhagens celulares, demonstrando redução significativa da viabilidade celular. Em relação aos efeitos genotóxicos, o Al e Mn induziram a formação de brotamento nuclear, micronúcleo e danos ao DNA nas concentrações mais elevadas. Os resultados demonstraram também, que as concentrações limites estabelecidas apresentaram efeitos citotóxico para as células avaliadas. Para o Al, ainda foi verificado a formação significativa de brotamento nuclear na célula CHO. Nestes termos, este estudo apresenta dados que podem auxiliar órgãos reguladores na adequação dos valores limites do Al e Mn em águas subterrâneas destinadas ao consumo humano.

Palavras-chave: Metais; citotoxicidade; genotoxicidade; CHO; CHO-XRS5.

Abstract

The metals aluminum (Al) and manganese (Mn) are elements found naturally in the environment, but excessive exposure of humans to these metals has caused negative effects on health. A previous study of this research group showed the existence of areas in which groundwater intended for human consumption had concentrations of Al and Mn above that allowed by Brazilian legislation. In this context, the objective of this study was to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects of Al and Mn on CHO and CHO-XRS5 cells. For this, CHO and CHO-XRS5 cells were treated with Al (0.2 - 2.0mg/L⁻¹) and Mn (0.1-3.0mg/L⁻¹) for determination of cytotoxicity and genotoxicity. The Al and Mn metals presented cytotoxic effect in both cell lines, demonstrating a significant reduction in cell viability. In relation to genotoxic effects, Al and Mn induced the formation of nuclear budding, micronucleus and DNA damage at the highest concentrations. The results also demonstrated that the established limits concentrations showed cytotoxic effects for the cells evaluated. For Al, the significant formation of nuclear budding in the CHO

cell was still verified. In these terms, this study presents data that can help regulators in the adequacy of the Al and Mn limit values in groundwater destined for human consumption.

Keywords: Metals; cytotoxicity; genotoxicity; CHO; CHO-XRS5.

1. Introdução

Os metais quando presentes no ambiente em concentrações elevadas podem causar efeitos adversos aos organismos expostos (DHANAKUMAR et al., 2015; JAYAPRAKASH et al., 2015; IZAH et al., 2016). A exposição do ser humano aos metais pode ser proveniente tanto de fontes naturais advindos de rochas e vulcões, quanto antropogênicas, associadas a processos industriais, mineração, pesticidas, medicamentos e tratamento da água (DE JOODE et al., 2016; LIMA et al., 2011). Entretanto, a dieta e a ingestão de água são as formas mais comuns de exposição aos metais (KREWSKI et al., 2007; WILLHITE et al., 2014).

Dentre os diferentes metais, podemos destacar o alumínio (Al) e manganês (Mn). O Al é considerado o metal que apresenta maior quantidade na crosta terrestre, utilizado em larga escala na fabricação de embalagens alimentícias e utensílios de cozinha (ALEXANDROV et al., 2018), o que predispõe a sua exposição em humanos, porém, o mesmo não apresenta nenhuma função biológica nos organismos vivos (VERSTRAETEN et al., 2008). O Mn é o quinto metal mais abundante, considerado um elemento essencial para o ser humano, devido ao fato de desempenhar funções em processos fisiológicos, como, a regulação da reprodução, crescimento ósseo e manutenção do cérebro (BORNHORST et al., 2010; HORNING et al., 2015).

Os efeitos adversos do Al e Mn, quando em quantidades excessivas, representam, em longo prazo, riscos para a saúde dos seres humanos. Estudos revelaram que o Al e Mn induzem alteração na morfologia de órgãos, citotoxicidade e genotoxicidade (ALIMBA et al., 2016; GEYIKOGLU et al., 2012; PAZ et al., 2017; STEPHENSON et al., 2013). Além disso, estes metais podem se acumular no sistema nervoso central, causando distúrbios neurológicos, aumento no risco de incidência de doenças neurodegenerativas, como, doença de Alzheimer e Parkinson e síndrome de manganismo (GONÇALVES et al., 2007; HORNING, et al., 2015; PERES et al., 2016; WANG et al., 2016).

No Brasil, a normativa 396/2008 do Conselho do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece valores máximos permitidos para metais presentes em água subterrânea destinada ao consumo humano. Pesquisas realizadas pelo nosso grupo demonstraram a existência de Al e Mn acima dos limites permitidos ($0,2\text{mg/L}^{-1}$ e $0,1\text{mg/L}^{-1}$ respectivamente) pela legislação para

águas subterrâneas em duas cidades do Mato Grosso do Sul (Brasil) (FRANCISCO et al., 2019).

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do Al e Mn em células CHO e CHO-XRS5 utilizando valores no limite e acima do estabelecido pelo CONAMA.

2. Material e Métodos

2.1 Cultura celular

As linhagens celulares CHO e CHO-XRS5 de ovário de hamster (fornecidas pela professora Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo do departamento de Biologia, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto), foram cultivadas com meio HAM-F10 + DMEM (Sigma-Aldrich/Gibco, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, EUA), 5mg de penicilina, 5mg de estreptomicina, 10mg de neomicina (Gibco, EUA) e bicarbonato de sódio (NaHCO₃). As células foram mantidas em estufa com atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C.

2.2 Determinação das concentrações e tratamentos

As concentrações de Al (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 e 2,0 mg/L⁻¹) e Mn (0,1, 0,15, 0,3, 1,0, 1,5 e 3,0 mg/L⁻¹) utilizadas neste estudo, foram baseadas em resultados de pesquisas realizadas por Francisco et al. (2019) quantificados em águas subterrâneas de duas cidades do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. Soluções estoque padrão de 1000 mg L⁻¹ de Al e Mn (SpecSolô, SEM-682, EUA) foram diluídas em meio HAM-F10 (Sigma-Aldrich, Alemanha) + DMEM (Gibco-Thermo Fisher Scientific) e utilizadas em todos os tratamentos. Como controle positivo (CP), foi utilizado a mitomicina C (2 µg/L⁻¹) (Sigma-Aldrich, Alemanha) diluída no meio e, para o controle negativo (CN) somente meio de cultura. Para todos os experimentos as células foram semeadas por 24h, antes dos tratamentos. O período de incubação com os tratamentos foram de 24 e 72h em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37° C.

2.3 Ensaio de citotoxicidade

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico utilizando o 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, Alemanha). As células CHO e CHO-XRS5 (6x10³ células/mL) foram plaqueadas em microplacas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações de Al (0,2 - 2,0 mg/L⁻¹) e Mn (0,1 - 3,0 mg/L⁻¹) em meio HAM-F10 + DMEM, sem suplemento de SFB durante o período de exposição. Após o tratamento, o meio foi removido e, em seguida, adicionado 100 µL de MTT (0,5 mg/mL⁻¹)

em cada poço, seguido de incubação por 4 h a 37 °C. Após esse período, o sobrenadante foi removido e adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância de cada poço foi determinada a 630 nm em Leitor de microplaca SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A viabilidade celular foi calculada pela fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{Ab}_{\text{células tratadas}} / \text{Ab}_{\text{controle}}) \times 100$$

2.4 Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese

O teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese foi realizado de acordo com o método descrito por Oliveira et al. (2006) com adaptações. Foram realizados dois experimentos independentes. As células CHO e CHO-XRS5 (4×10^5 células/mL) foram semeadas em placas de 24 poços e tratadas com diferentes concentrações de Al (0,2- 2,0 mg/L⁻¹) e Mn (0,1- 3,0 mg/L⁻¹) em meio HAM-F10 + DMEM, suplementado com SFB durante 24 e 72 h. Após os tratamentos, as células foram incubadas com citocalasina B (6 µg/mL; Sigma) durante 20h. Em seguida, as células foram tratadas com solução hipotônica de citrato de sódio 1%, fixadas em solução de metanol: ácido acético (3:1), e coradas com Giemsa 5% (Vetec). Um total de 1.000 células binucleadas por experimento foi analisado para determinação do número de células binucleadas com micronúcleos, pontes nucleoplásmicas e brotamento nuclear conforme descrito por Fenech (2007). O índice de divisão nuclear (IDN) foi calculado para 500 células de acordo com a fórmula:

$$IDN = \frac{M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3 + 4 \times M4}{N}$$

Onde M₁-M₄ representam o número de células que possuem de 1 a 4 núcleos e N é o número total de células viáveis.

2.5 Ensaio de eletroforese em gel de célula única alcalino (Ensaio do cometa)

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com Singh et al. (1988) com modificações. Para cada concentração testada foram realizados dois experimentos independentes. As células CHO e CHO-XRS5 (1×10^5) foram semeadas em placas de 24 poços e tratadas com Al (0,2- 2,0 mg/L⁻¹) e Mn (0,1- 3,0 mg/L⁻¹) em meio HAM-F10 + DMEM, suplementado com SFB durante 24 e 72 h. Após o tratamento, as células foram desprendidas do poço e centrifugadas a 2.000 rpm durante 5 min. Em seguida, uma alíquota de 100 µL da suspensão celular foi misturada em 140 µL de agarose LMP (Low Melting Point) 0,5% Invitrogen® a 37 °C e disposta sobre lâminas pré-gelatinizadas com agarose 1,5% (Kasvi/Espanha). Após, solidificação do gel, as lâminas foram retiradas e as lâminas foram imersas em solução de lise (2.5M NaCl, 100mM

Na₂ EDTA, 10mM Tris, com 10% DMSO e 1% Triton X-100) a 4 °C durante 1 h e 30 min. Em seguida, as lâminas foram colocadas em solução tampão de eletroforese (NaOH 0,3 mol L⁻¹ e EDTA 0,001 mol L⁻¹, pH >13) durante 20 min para desnaturação do DNA seguida de eletroforese a 37 V, 300 mA por 25 min. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas com Tris 0,4 mol L⁻¹ durante 15 min, fixadas em etanol e coradas com brometo de etídeo (0,02 mol L⁻¹). Os nucleóides foram analisados em microscópio de fluorescência (Labomed - T121100) utilizando objetiva de 400x e fotografados. As imagens foram analisadas usando o software Lucia Comet Assay Single Stain (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic), um total de 100 nucleóides foram contados para cada experimento. Os parâmetros de genotoxicidade utilizados para quantificar o dano ao DNA foram o *tail DNA* (% de DNA na cauda) e *tail length* (tamanho da cauda).

2.6 Análises estatísticas

As análises foram realizadas utilizando a plataforma R Studio (R Core Team, 2018). Todos os dados foram testados para verificar a normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os resultados dos testes de MTT e micronúcleo foram avaliados pelo teste paramétrico Análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. O teste não paramétrico de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn, foi usado para o ensaio do cometa. As diferenças entre os tratamentos com o CN foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Para verificar a diferença entre Al e Mn de acordo com os dados de citotoxicidade e genotoxicidade, foi realizada a Análise de Coordenadas Principais (PCoA), no qual, os dados dos testes de viabilidade celular, micronúcleo e cometa de cada metal, foram convertidos em uma matriz de dissimilaridade utilizando o coeficiente de distância “Bray-Curtis”. Os resultados foram comparados por meio da Análise Multivariada não Paramétrica de Variância Permutacional (PERMANOVA) e a significância das variáveis (r^2) foi verificada pelo processo de randomização (999 permutações).

3. Resultados e Discussão

3.1 Citotoxicidade

Os metais Al e Mn reduziram a viabilidade celular das células CHO e CHO-RXS5 em ambos períodos avaliados (24 e 72 h), indicando o efeito citotóxico (Fig. 1A e 1B).

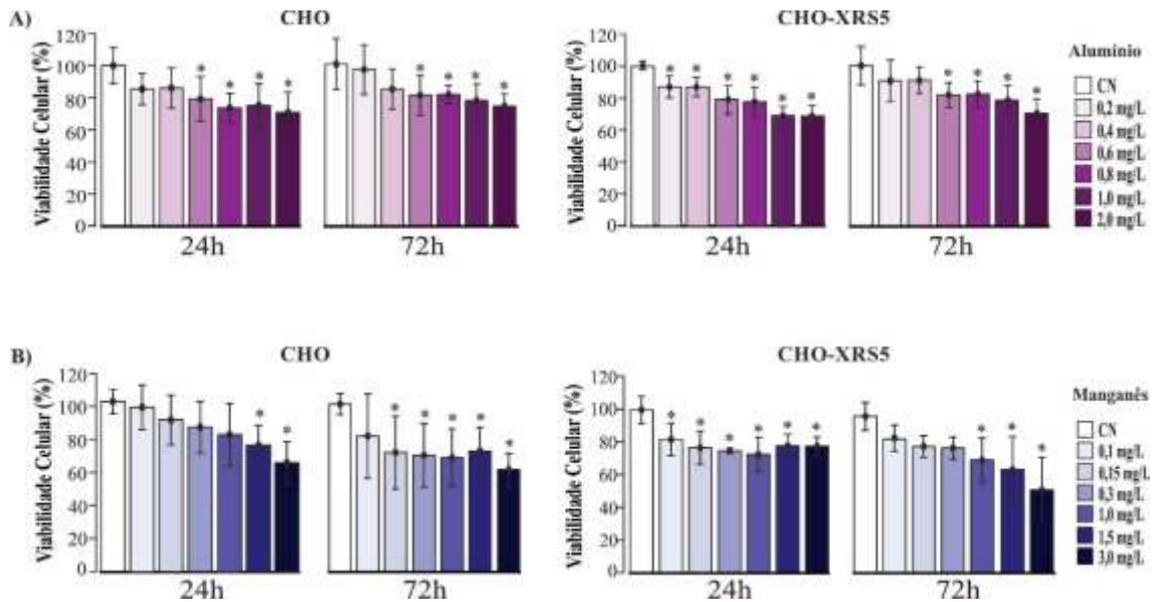


Fig. 1 Viabilidade das células CHO e CHO-XRS5. As células foram tratadas com diferentes concentrações de Al (A) e Mn (B) durante 24 e 72 h. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (n=3) em triplicata. * $p < 0.05$ quando comparado ao controle negativo (CN).

Os resultados indicaram que o Al reduziu significativamente a viabilidade celular nas células de CHO, quando comparado ao CN, a partir da concentração de $0,6 \text{ mg/L}^{-1}$, em ambos períodos de avaliação (Fig. 1A). Enquanto que para linhagem celular CHO-XRS5 a redução da viabilidade foi a partir de $0,2 \text{ mg/L}$ em 24 h e $0,6 \text{ mg/L}$ em 72 h (Figura 1A).

Os efeitos citotóxicos do Al podem estar relacionados ao aumento do estresse oxidativo. Pesquisas *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a exposição ao Al pode acarretar na formação de EROs, peroxidação lipídica e dano oxidativo a proteínas mitocondriais, o que resulta na toxicidade deste metal às células expostas (KUMAR et al., 2008; LIAQUAT et al., 2019; XU et al., 2017).

Em estudo realizado por Djouina et al. (2016), células de adenocarcinoma de colorretal humana (HT-29) tratadas com Al (25 a 800 mg/L^{-1}) apresentaram redução da viabilidade celular a partir de 200 mg/L^{-1} após 24 h e 25 mg/L^{-1} após 72 h de tratamento. Nosso estudo demonstrou que células de CHO e CHO-XRS5 embora não sejam linhagens de origem tumoral, apresentaram maior sensibilidade ao Al quando comparada as células HT-29, resultando em redução da viabilidade celular a partir de $0,2 \text{ mg/L}^{-1}$.

A citotoxicidade dependente da concentração do Al foi verificada em células de linfócitos e timócitos de ratos, em concentrações similares a utilizadas em nosso estudo ($0,2$ – $1,0 \text{ mg/L}^{-1}$), onde foi observado redução significativa da viabilidade celular diretamente proporcional ao aumento da concentração do metal (KAMALOV et al., 2011). Os resultados dos efeitos citotóxicos do Al, após a exposição de 48 e 72 h em células de neuroblastoma

humano (SH-SY5Y), não corroboram com os resultados do nosso trabalho, pois, concentrações de 0,027– 8,1 mg/L⁻¹ não causaram redução significativa da viabilidade nas células testadas (CASTORINA et al., 2010), esse fato pode estar correlacionado com a especificidade de cada célula.

O Mn em células CHO apresentou diferença significativa nas maiores concentrações (1,5 e 3, 0 mg/L⁻¹) no período de 24 h e, a partir de 0, 15 mg/L⁻¹ no período de 72 h, demonstrando maior toxicidade neste último (Fig. 1B). Na linhagem celular CHO-XRS5, o Mn foi considerado mais prejudicial no período de 24 h, pois, a diminuição da viabilidade celular foi observada desde a menor concentração (0,1 mg/L⁻¹) (Fig. 1B). Resultados similares a esses, foram observados em estudos realizados com diferentes linhagens celulares, que também demonstraram maior citotoxicidade no período de 24 h (STEPHENSON et al., 2013; ZHANG et al., 2013; ZHAO et al., 2012). A toxicidade do Mn também foi verificada em estudos com células do epitélio bronquial, células de hepatócitos e células de astrócitos de ratos em tempos diferentes de exposição aos avaliados neste estudo (LU et al., 2018; PASCAL et al., 2004; THOMPSON et al., 2018).

Os mecanismos associados a perda da viabilidade celular promovida pelo Mn ainda estão sendo elucidados, porém, sabe-se que o estresse oxidativo devido a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) causadas pelo metal está relacionado com a morte celular em diversas linhagens (ALCON et al., 2018; GONZALEZ et al., 2008; MARTINEZ-FINLEY et al., 2013; PRABHAKARAN et al. 2008; TAMM et al., 2008). Além disso, o Mn induz a morte de neurônios colinérgicos pela indução da superexpressão de acetilcolinesterase (MOYANO et al., 2019), bem como regula negativamente os níveis da Situina 1 (SIRT1) no tecido neural causando neurotoxicidade (ZHAO et al., 2019).

Quando avaliados os valores máximos permitidos pelo CONAMA (BRASIL, 2008), para Al (0,2 mg/L⁻¹) e Mn (0,1 mg/L⁻¹), foi verificado redução da viabilidade celular (17, 8 e 12, 8% respectivamente) somente para a linhagem CHO-XRS5, para o período de 24 h, fato que pode estar correlacionado com a ineficiência desta célula em reparar danos em fita dupla (COSTA; BRYANT, 1988). Com base nos resultados obtidos pelo teste de viabilidade celular, todas as concentrações avaliadas de Al e Mn foram utilizadas na análise dos efeitos genotóxicos, visto que, nenhuma concentração reduziu a viabilidade celular em mais de 50%. Para os dados da proliferação celular (IDN), as células de CHO e CHO-XRS5 expostas as diferentes concentrações de Al e Mn não apresentaram diferença significativa com o CN, mesmo que observado a citotoxicidade pelo teste do MTT.

3.2 Teste do micronúcleo (MN)

O Al aumentou significativamente o número de brotamento nuclear nas células CHO nas maiores concentrações (1,0 e 2,0 mg/L⁻¹) após 24 h de tratamento comparado ao CN. Após 72 h de tratamento, observou-se que o Al foi capaz de induzir a formação de brotamentos em CHO a partir da menor concentração (0,2 mg/L⁻¹) (Fig. 2A).

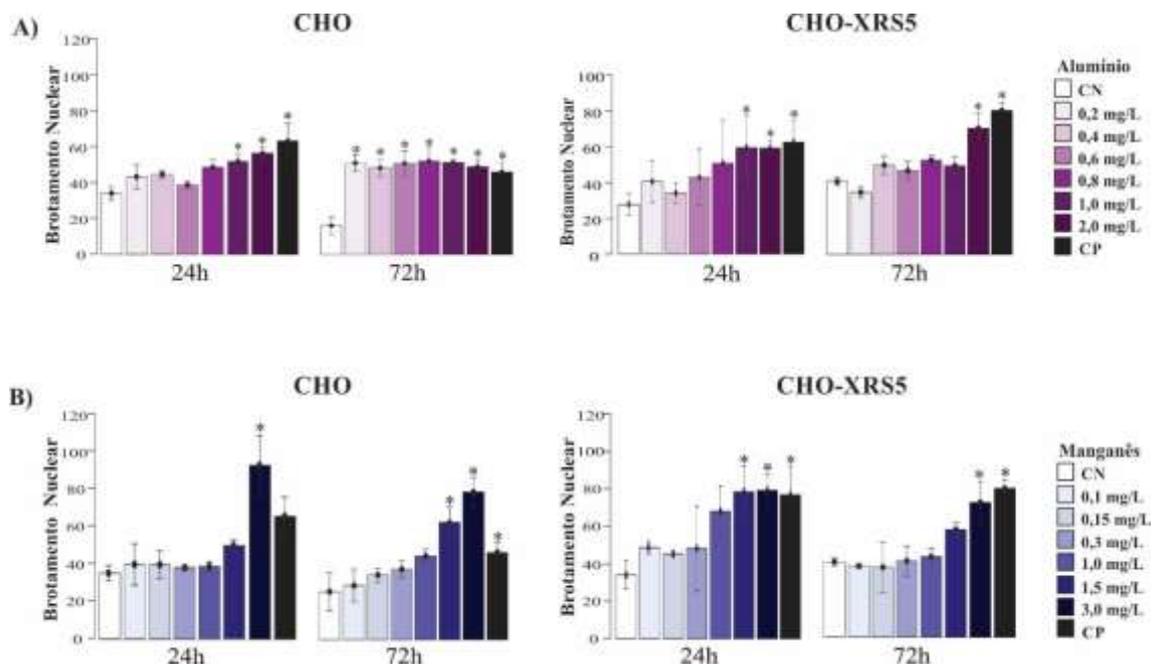


Fig. 2 Média de brotamento nuclear em 1000 células binucleadas de CHO e CHO-XRS5 tratadas com diferentes concentrações de (A) Al e (B) Mn, durante os períodos de 24 h e 72 h de incubação. CN (controle negativo); CP (controle positivo).

* $p < 0.05$ quando comparado ao controle negativo pelo teste ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey.

Nas células CHO-XRS5, o Al apresentou formação de brotamento nuclear com diferença significativa ao CN somente na maior concentração (2,0 mg/L⁻¹) após 72 h de tratamento (Fig. 2B). A formação de brotamento nuclear é caracterizada como um dano genotóxico ao DNA (FENECH, 2007). O aumento de EROs é conhecido por resultar danos ao DNA contribuindo para a morte celular ou para o desenvolvimento de doenças. O Al promove dano ao DNA em consequência da sua toxicidade, e com isso pode levar a modificações genéticas em células que podem ser citotóxicas, mutagênicas ou carcinogênicas (CELIK et al., 2012).

Células CHO tratadas com Mn durante 24 h e 72 h apresentaram diferença significativa na formação de brotamento nuclear na concentração de 3 mg/L⁻¹ e a partir de 1,5 mg/L⁻¹ respectivamente (Fig. 2B), enquanto que células CHO-XRS5 a diferença foi observada a partir de 1,0 mg/L⁻¹ e 1,5 mg/L⁻¹ após 24 h e 72 h, respectivamente (Fig. 2B). Quanto à avaliação de ponte nucleoplasmática, não foram registrados aumento significativo para nenhum dos

tratamentos realizados (Al e Mn), entretanto, estudo realizado por Alcon et al. (2018), foi observado o aumento do número de células com pontes nucleoplasmáticas + MN, quando expostas a concentrações mais elevadas de Mn (13,75 e 41,25 mg/L⁻¹) em células microgлияis murinas (BV-2).

A formação de micronúcleos (MN) é outro parâmetro que permite a avaliação do efeito genotóxico. O MN pode ser induzido pela ação de agentes clastogênicos e/ou aneugênicos que promovem a perda ou a não disjunção de cromossomos inteiros na anáfase da divisão celular (FENECH, 2007; OCAMPO et al., 2016; VILLARINI et al., 2016). As células CHO tratadas com Al apresentaram aumento significativo no número de células com MN quando comparado ao CN em ambos períodos de tratamento (Fig. 3A).

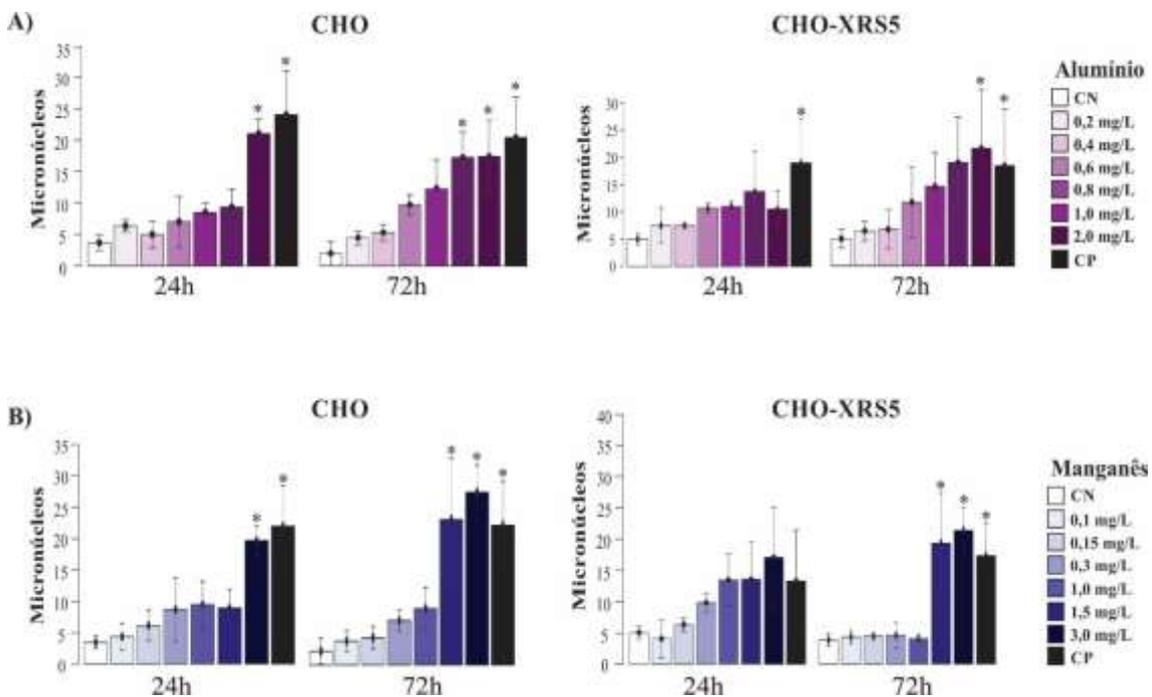


Fig. 3 Média de MN em 1000 células binucleadas de CHO e CHO-XRS5 tratadas com diferentes concentrações de (A) Al e (B) Mn, durante os períodos de 24h e 72h de incubação. CN (controle negativo); CP (controle positivo). * $p < 0.05$ quando comparado ao controle negativo pelo teste ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey.

As células CHO-XRS5 quando expostas ao Al, só apresentou aumento significativo no número de micronúcleos na maior concentração (2,0 mg/L⁻¹) no período de 72 h (Fig. 3A). O Al ocasionou aumento do número de MN dependente da concentração nas fases G1, G2 e S da divisão mitótica de linfócitos humanos a partir da concentração de 0,027 a 0,27 mg/L⁻¹ (BANASAKI et al., 2010). O efeito genotóxico do AlCl₃, foi relatado em células de linfócitos humanos, para concentrações acima de 0,135 mg/L⁻¹, em 72 h de exposição, apresentando maiores números de micronúcleos nas concentrações de 0,27 e 0,54 mg/L⁻¹ (PAZ et al., 2017).

Demais estudos também demonstraram genotoxicidade do Al em diferentes concentrações em hepatócitos de ratos (TURKEZ et al., 2010; TURKEZ et al., 2011; GEYIKOGLU et al., 2012).

Sabe-se que a diminuição do conteúdo de glutatona e da atividade da superóxido dismutase mitocondrial devido a exposição do organismo ao Al está relacionada ao estresse oxidativo (KUMAR et al., 2008; KUMAR et al., 2009; RUI; YONGJIAN, 2010). O aumento do dano oxidativo ao DNA pode estar relacionado com a expressão aumentada do gene p53, formação de EROs e liberação de DNase dos lisossomas, aumento da formação de 8-OHdG no mtDNA, que podem servir como biomarcadores de danos ao DNA (BANASAKI et al., 2005; KUMAR et al., 2009; RUI; YONGJIAN, 2010).

As células CHO tratadas com Mn apresentaram aumento significativo do número de células com MN somente na concentração de 3,0 mg/L⁻¹ após 24 h, enquanto que no período de 72 h o aumento significativo do número de células com MN foi observado a partir de 1,5 mg/L⁻¹ (Fig. 3B). Para as células CHO-XRS5 não houve diferença significativa no número de MN para o período de 24 h, entretanto em 72 h de tratamento houve diferença estatística a partir da concentração de 1,5 mg/L⁻¹ (Fig. 3B). Diferença significativa no número de MN, em relação ao CN, também foi verificado em células microgliais murinas (BV-2) (ALCON et al., 2018) em concentrações mais elevadas de Mn (13,75 e 41,25 mg/L⁻¹) quando comparadas com as utilizadas nesse estudo.

O aumento significativo no número de MN nas linhagens CHO e CHO-XRS5 ocorreu nas maiores concentrações de Mn. O aumento do número de danos ao DNA, como brotamento nuclear e micronúcleo pode ser consequência do estresse oxidativo e/ou do aumento da expressão nuclear de cH2AX causada pela exposição ao Mn (ALCON et al., 2018).

3.3 Ensaio do cometa

O Al induziu o aumento significativo ($p < 0,005$) do *Tail DNA* (%) nas células de CHO conforme o aumento da concentração e do tempo de exposição. Com relação ao *Tail Length*, foi observado diferença significativa, em comparação com o CN a partir da concentração de 0,6 mg/L⁻¹ nos dois períodos de exposição (Tab. 1).

Tabela 1. Danos no DNA mensurados pelo ensaio do cometa em células de CHO e CHO-XRS5 expostas a diferentes concentrações de Al e Mn por 24 e 72h.

| Trat | Conc | CHO | | | | CHO-XRS5 | | | |
|--------------------------------|---------|--------------|----------|-------------|----------|--------------|---------|-------------|----------|
| | | Tail DNA (%) | | Tail Length | | Tail DNA (%) | | Tail Length | |
| | | 24h | 72h | 24h | 72h | 24h | 72h | 24h | 72h |
| CN | - | 13,11 | 23,50 | 24,00 | 21,62 | 24,85 | 30,80 | 31,80 | 29,01 |
| | | (1,26) | (0,77) | (4,37) | (8,80) | (9,48) | (4,08) | (4,63) | (2,66) |
| Alumínio (mg/L ⁻¹) | 0,2 | 9,70 | 28,67 | 29,27 | 35,17 | 13,06 | 28,46 | 43,21 | 37,52 |
| | | (4,50) | (4,30) | (7,12) | (5,22) | (4,71) | (2,02) | (0,83) | (1,64) |
| | 0,4 | 16,80 | 29,07 | 36,12 | 36,12 | 25,95 | 36,33 | 45,73 | 39,27 |
| | | (4,24) | (8,26) | (1,75)* | (13,91)* | (1,17) | (3,05) | (5,08)* | (1,67) |
| | 0,6 | 20,47 | 43,94 | 37,07 | 42,27 | 36,56 | 38,36 | 45,32 | 38,66 |
| | | (6,60) | (3,53)* | (4,52)* | (11,01)* | (8,81) | (5,21) | (2,10)* | (3,35) |
| | 0,8 | 23,54 | 49,13 | 38,57 | 50,93 | 45,19 | 46,67 | 47,84 | 45,41 |
| | | (1,47) | (6,00)* | (5,47)* | (11,60)* | (6,82)* | (4,03)* | (4,44)* | (4,86)* |
| 1,0 | 33,79 | 50,85 | 40,09 | 49,15 | 44,37 | 47,02 | 48,50 | 49,40 | |
| | (3,96)* | (13,36)* | (3,76)* | (2,46)* | (7,23)* | (2,93)* | (1,38)* | (5,70)* | |
| 2,0 | 47,58 | 60,09 | 41,98 | 48,39 | 51,90 | 53,34 | 52,03 | 59,92 | |
| | (3,53)* | (4,73)* | (0,84)* | (4,12)* | (5,11)* | (1,60)* | (0,03)* | (10,62)* | |
| Manganês (mg/L ⁻¹) | 0,1 | 23,56 | 39,28 | 40,10 | 39,60 | 39,08 | 29,24 | 46,22 | 38,78 |
| | | (1,53) | (2,09) | (1,97) | (7,00) | (0,31) | (18,05) | (1,41) | (6,15) |
| | 0,15 | 26,43 | 41,41 | 41,13 | 45,70 | 40,76 | 41,84 | 46,84 | 39,75 |
| | | (5,24) | (1,69) | (1,60) | (5,63) | (0,27)* | (4,60) | (3,29) | (6,76) |
| | 0,3 | 28,51 | 47,77 | 41,24 | 46,04 | 43,60 | 43,61 | 50,39 | 38,83 |
| | | (6,87)* | (5,30)* | (3,54)* | (2,97)* | (0,66)* | (2,21)* | (1,46) | (7,97) |
| | 1,0 | 32,70 | 51,16 | 43,92 | 50,68 | 42,99 | 42,72 | 52,30 | 46,00 |
| | | (1,73)* | (4,08)* | (2,50)* | (13,00)* | (7,34)* | (2,37)* | (0,59)* | (5,02)* |
| 1,5 | 70,67 | 53,12 | 57,40 | 54,55 | 44,92 | 45,89 | 54,29 | 58,67 | |
| | (2,76)* | (4,92)* | (6,05)* | (3,36)* | (0,78)* | (5,67)* | (2,65)* | (16,44)* | |
| 3,0 | 70,90 | 59,91 | 62,69 | 60,21 | 47,73 | 50,58 | 54,80 | 99,07 | |
| | (3,71)* | (2,56)* | (12,00)* | (17,16)* | (3,89)* | (5,74)* | (0,73)* | (17,21)* | |
| CP | 0,002 | 46,20 | 65,40 | 42,94 | 61,08 | 50,94 | 63,67 | 55,71 | 62,36 |
| | | (14,89)* | (8,79)* | (2,95)* | (4,87)* | (3,46)* | (9,75)* | (7,30)* | (16,73)* |

Trat: tratamentos; Conc: concentrações; CN: controle negativo; CP: controle positivo (Mitomicina C).

Os valores são expressos em mediana (desvio interquartil), * p<0,05 quando comparado ao controle negativo pelo teste de Kruskal Wallis seguido do *posteriori* de Dunn.

As células de CHO-XRS5 demonstraram danos ao DNA significativamente diferente do CN com relação ao parâmetro *Tail DNA (%)* a partir da concentração de 0,8 mg/L⁻¹ para ambos os períodos de avaliação. Em relação ao *Tail Length*, essa diferença foi observada a partir da concentração de 0,4 mg/L⁻¹ no período de 24 h e, 0,8 mg/L⁻¹ em 72 h. Os danos ao DNA verificados pelo ensaio do cometa podem estar associados com a formação de espécies reativas de oxigênio. Celik et al. (2012) demonstraram correlação positiva entre o aumento do estresse oxidativo e danos ao DNA em células tratadas com Al pelo ensaio do cometa. Concentrações elevadas do Al também podem ocasionar a formação de purinas e pirimidinas oxidadas o que gera dano ao DNA (CELIK et al., 2012; LANKOFF et al., 2006). Entretanto, pesquisas utilizando métodos moleculares mais específicos que avaliem os efeitos epigenéticos seriam relevantes para evidenciar os mecanismos responsáveis pelo dano ao DNA nas células CHO e CHO-XRS5 tratadas com Al.

Lima et al. (2007) observaram danos significativos ao DNA de linfócitos humanos tratados com AlCl₃ em concentrações de 0,135 – 0,675 mg/L durante 3h. Entretanto,

LANKOFF et al. (2006) demonstraram que linfócitos tratados com AlCl_3 apresentaram dano ao DNA a uma concentração de 5 mg/L^{-1} quando expostos ao metal durante 72 h. Estudo *in vivo* demonstrou que pessoas expostas diariamente ao Al apresentam maior dano ao DNA de linfócitos do que pessoas não expostas ao metal (CELIK et al., 2012). Com base nestes estudos, pode-se verificar que a exposição ao Al também foi capaz de promover danos ao DNA em células humanas mesmo em baixas concentrações, assim como o observado neste estudo.

O tratamento das células CHO com Mn apresentou diferença significativa para os parâmetros de *Tail DNA* (%) e *Tail Length* a partir de $0,3 \text{ mg/L}^{-1}$ nos dois períodos de avaliação (Tab. 1). Resultados similares foram relatados por Wang et al. (2014), que verificaram aumento na porcentagem de DNA na cauda do cometa em neurônios do hipocampo de ratos expostos ao Mn.

Para as células CHO-XRS5, os danos do Mn foram significativos para *Tail DNA* (%) a partir de $0,15 \text{ mg/L}^{-1}$ em 24 h e $0,3 \text{ mg/L}^{-1}$ em 72 h. No parâmetro *Tail Length* a diferença foi observada a partir de $1,0 \text{ mg/L}^{-1}$ nos dois períodos. Danos no DNA causados pela exposição das células ao Mn, também foram observados em células de linfócitos humanos em diferentes fases do ciclo mitótico (LIMA et al., 2008) e em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) com exposição de 24h (STEPHENSON et al., 2013).

Baseando-se nos resultados referentes a cito-genotoxicidade, foi realizado a PcoA para analisar a similaridade entre os danos induzidos por Al e Mn nas células CHO e CHO-XRS5. A PCoA demonstrou que não houve similaridade entre os danos nas células CHO ($r^2=0,0278$; $p=0,01$) e CHO-XRS5 ($r^2=0,0414$, $p=0,002$), sendo observado que o Al apresentou maior quantidade de dano celular quando comparado ao Mn para as células CHO, enquanto que, para as células CHO-XRS5, o Mn foi o metal que apresentou o maior número de danos (Fig. 4).

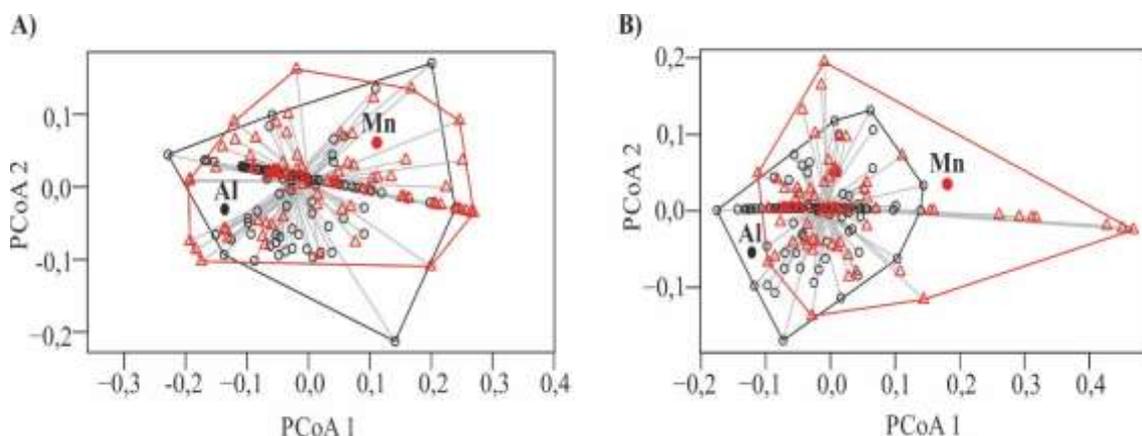


Fig. 4 Análise de Coordenadas Principais (PCoA) entre os metais Al e Mn para as células: A) CHO e B) CHO-XRS5.

A diferença significativa mais expressiva entre Al e Mn para os danos celulares nas células CHO-XRS5, pode ser explicada pelo fato destas células apresentarem deficiência em reparar fitas dupla de DNA (COSTA; BRYANT, 1988; DARROUDI; NATARAJAN, 1987). Essa incapacidade impossibilita a recombinação corretamente e gera alterações no DNA, o que a torna uma ferramenta valiosa na avaliação de mecanismos relacionados aos rearranjos de quebras e produção de alterações cromossômicas, geradas pela ação toxicológica de metais (KEMP; JEGGO, 1986; SOUZA et al., 2016).

4. Conclusão

As concentrações ambientais identificadas em águas subterrâneas (valores máximos permitidos e superiores a legislação) demonstraram efeitos citotóxicos e genotóxico nas células CHO e CHO-XRS5, diretamente proporcionais ao aumento das concentrações. Os resultados deste estudo podem servir como alerta aos órgãos regulamentadores para revisão dos padrões estabelecidos, uma vez que, os valores máximos permitidos desses metais foram prejudiciais para as células expostas. Além disso, o estudo demonstrou a instabilidade genômica nas linhagens celulares utilizadas, causada pela exposição crônica aos metais e a necessidade de estudos futuros em linhagem celular humana.

Referências

- ALAIMO, A.; GOROJOD, R. M.; KOTLER, M. L. The extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are involved in manganese toxicity in rat astrocytoma C6 cells. **Neurochemistry international**, v. 59, n. 2, p. 297-308, 2011.
- ALCON, S. P.; GOROJOD, R. M.; KOTLER, M. L. Regulated necrosis orchestrates microglial cell death in manganese-induced toxicity. **Neuroscience**, v. 393, p. 206-225, 2018.
- ALEXANDROV, P. N.; POGUE, A. I.; LUKIW, W. J. Synergism in aluminum and mercury neurotoxicity. **Integrative food, nutrition and metabolism**, v. 5, n. 3, 2018.
- ALIMBA, C. G. *et al.* Genotoxicity and cytotoxicity of chromium, copper, manganese and lead, and their mixture in WIL2-NS human B lymphoblastoid cells is enhanced by folate depletion. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 798, p. 35-47, 2016.
- BANASIK, A. *et al.* Aluminum-induced micronuclei and apoptosis in human peripheral-blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle. **Environmental Toxicology: An International Journal**, v. 20, n. 4, p. 402-406, 2005.
- BORNHORST, J. *et al.* Manganese inhibits poly (ADP-ribosyl) ation in human cells: a possible mechanism behind manganese-induced toxicity?. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 12, n. 11, p. 2062-2069, 2010.
- Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). (2008). Resolução nº 396, de 3 de Abril de 346 523 2008. <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>. Acessado em: 10 out. 2017.
- CASTORINA, A. *et al.* Early effects of aluminum chloride on beta-secretase mRNA expression in a neuronal model of β -amyloid toxicity. **Cell biology and toxicology**, v. 26, n. 4, p. 367-377, 2010.
- CELIK, H. *et al.* The relationship between plasma aluminum content, lymphocyte DNA damage, and oxidative status in persons using aluminum containers and utensils daily. **Clinical biochemistry**, v. 45, n. 18, p. 1629-1633, 2012.

- COSTA, N. D.; BRYANT, P. E. Repair of DNA single-strand and double-strand breaks in the Chinese hamster xrs 5 mutant cell line as determined by DNA unwinding. **Mutation Research/DNA Repair Reports**, v. 194, n. 2, p. 93-99, 1988.
- DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Cytological characterization of Chinese hamster ovary X-ray-sensitive mutant cells xrs 5 and xrs 6: I. Induction of chromosomal aberrations by X-irradiation and its modulation with 3 aminobenzamide and caffeine. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 177, n. 1, p. 133-148, 1987.
- DE JOODE, B. V. W. *et al.* Manganese concentrations in drinking water from villages near banana plantations with aerial mancozeb spraying in Costa Rica: Results from the Infants' Environmental Health Study (ISA). **Environmental Pollution**, v. 215, p. 247-257, 2016.
- DHANAKUMAR, S.; SOLARAJ, G.; MOHANRAJ, R. Heavy metal partitioning in sediments and bioaccumulation in commercial fish species of three major reservoirs of river Cauvery delta region, India. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 113, p. 145-151, 2015.
- DJOUINA, M. *et al.* Toxicological consequences of experimental exposure to aluminum in human intestinal epithelial cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 91, p. 108-116, 2016.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084, 2007.
- GEYIKOGLU, F. *et al.* The genotoxic, hepatotoxic, nephrotoxic, haematotoxic and histopathological effects in rats after aluminium chronic intoxication. **Toxicology and industrial health**, v. 29, n. 9, p. 780-791, 2013.
- GONÇALVES, P. P.; SILVA, V. S. Does neurotransmission impairment accompany aluminium neurotoxicity?. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 9, p. 1291-1338, 2007.
- HORNING, K. J. *et al.* Manganese is essential for neuronal health. **Annual review of nutrition**, v. 35, p. 71-108, 2015.
- IZAH, S. C.; CHAKRABARTY, N.; SRIVASTAV, A. L. A review on heavy metal concentration in potable water sources in Nigeria: Human health effects and mitigating measures. **Exposure and Health**, v. 8, n. 2, p. 285-304, 2016.
- JAYAPRAKASH, M. *et al.* Bioaccumulation of metals in fish species from water and sediments in macrotidal Ennore creek, Chennai, SE coast of India: A metropolitan city effect. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 120, p. 243-255, 2015.
- KAMALOV, J.; CARPENTER, D. O.; BIRMAN, I. Cytotoxicity of environmentally relevant concentrations of aluminum in murine thymocytes and lymphocytes. **Journal of toxicology**, v. 2011, 2011.
- KEMP, L. M.; JEGGO, P. A. Radiation-induced chromosome damage in X-ray-sensitive mutants (xrs) of the Chinese hamster ovary cell line. **Mutation Research/DNA Repair Reports**, v. 166, n. 3, p. 255-263, 1986.
- KREWSKI, D. *et al.* Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 10, n. S1, p. 1-269, 2007.
- KUMAR, V.; BAL, A.; GILL, K. D. Impairment of mitochondrial energy metabolism in different regions of rat brain following chronic exposure to aluminium. **Brain research**, v. 1232, p. 94-103, 2008.
- KUMAR, V.; BAL, A.; GILL, K. D. Aluminium-induced oxidative DNA damage recognition and cell-cycle disruption in different regions of rat brain. **Toxicology**, v. 264, n. 3, p. 137-144, 2009.
- LANKOFF, A. *et al.* A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. **Toxicology letters**, v. 161, n. 1, p. 27-36, 2006.
- LIAQUAT, L. *et al.* Acute aluminum chloride toxicity revisited: Study on DNA damage and histopathological, biochemical and neurochemical alterations in rat brain. **Life sciences**, v. 217, p. 202-211, 2019.
- LIMA, P. D. L. *et al.* Genotoxic effects of aluminum chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 7, p. 1154-1159, 2007.
- LIMA, P. D. L. *et al.* Genotoxic and cytotoxic effects of manganese chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 4, p. 1032-1037, 2008.
- LIMA, P. D. L. *et al.* Genotoxic effects of aluminum, iron and manganese in human cells and experimental systems: a review of the literature. **Human & experimental toxicology**, v. 30, n. 10, p. 1435-1444, 2011.

- LU, C. *et al.* Involvement of gap junctions in astrocyte impairment induced by manganese exposure. **Brain research bulletin**, v. 140, p. 107-113, 2018.
- MARTINEZ-FINLEY, E. J. *et al.* Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. **Free radical biology and medicine**, v. 62, p. 65-75, 2013.
- MOYANO, P. *et al.* Manganese induced ROS and AChE variants alteration leads to SN56 basal forebrain cholinergic neuronal loss after acute and long-term treatment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 583-594, 2019.
- OLIVEIRA, R. J. *et al.* Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in vitro**, v. 20, n. 7, p. 1225-1233, 2006.
- PASCAL, L. E.; TESSIER, D. M. Cytotoxicity of chromium and manganese to lung epithelial cells in vitro. **Toxicology letters**, v. 147, n. 2, p. 143-151, 2004.
- PAZ, L. N. F. *et al.* Evaluation of in vivo and in vitro toxicological and genotoxic potential of aluminum 622 chloride. **Chemosphere**, v. 175, p. 130-137, 2017.
- PERES, T. V. *et al.* Manganese-induced neurotoxicity: a review of its behavioral consequences and neuroprotective strategies. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 57, 2016.
- POPRAC, P. *et al.* Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 7, p. 592-607, 2017.
- PRABHAKARAN, K. *et al.* Molecular mechanism of manganese exposure-induced dopaminergic toxicity. **Brain Research Bulletin**, v. 76, n. 4, p. 361-367, 2008.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018.
- RUI, D.; YONGJIAN, Y. Aluminum chloride induced oxidative damage on cells derived from hippocampus and cortex of ICR mice. **Brain research**, v. 1324, p. 96-102, 2010.
- SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.
- SOUZA, T. A. J. *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines. **Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 795, p. 70-83, 2016.
- STEPHENSON, A. P. *et al.* Manganese-induced oxidative DNA damage in neuronal SH-SY5Y cells: attenuation of thymine base lesions by glutathione and N-acetylcysteine. **Toxicology letters**, v. 218, n. 3, p. 299-307, 2013.
- TAMM, C.; SABRI, F.; CECCATELLI, S. Mitochondrial-mediated apoptosis in neural stem cells exposed to manganese. **Toxicological Sciences**, v. 101, n. 2, p. 310-320, 2007.
- THOMPSON, K. J. *et al.* Manganese Transport and Toxicity in Polarized WIF-B Hepatocytes. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 2018.
- TÜRKEZ, H.; YOUSEF, M. I.; GEYIKOĞLU, F. Propolis prevents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 10, p. 2741-2746, 2010.
- TÜRKEZ, H.; GEYİKOĞLU, F.; COLAK, S. The protective effect of boric acid on aluminum-induced hepatotoxicity and genotoxicity in rats. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, n. 3, p. 293-301, 2011.
- VERSTRAETEN, S. V.; AIMO, L.; OTEIZA, P. I. Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. **Archives of toxicology**, v. 82, n. 11, p. 789-802, 2008.
- VILLARINI, M. *et al.* No evidence of DNA damage by co-exposure to extremely low frequency magnetic fields and aluminum on neuroblastoma cell lines. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 823, p. 11-21, 2017.
- WANG, F. *et al.* Protective role of sodium para-amino salicylic acid against manganese-induced hippocampal neurons damage. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 1071-1078, 2014.
- WANG, Z. *et al.* Chronic exposure to aluminum and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. **Neuroscience letters**, v. 610, p. 200-206, 2016.

WILLHITE, C. C. *et al.* Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts. **Critical reviews in toxicology**, v. 44, n. sup4, p. 1-80, 2014.

XU, F. *et al.* Aluminum chloride caused liver dysfunction and mitochondrial energy metabolism disorder in rat. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 174, p. 55-62, 2017.

ZHANG, L. *et al.* Manganese activates caspase-9-dependent apoptosis in human bronchial epithelial cells. **Human & experimental toxicology**, v. 32, n. 11, p. 1155-1163, 2013.

ZHAO, F. *et al.* Manganese induces p21 expression in PC12 cells at the transcriptional level. **Neuroscience**, v. 215, p. 184-195, 2012.

Considerações finais

A contaminação por metais e contaminantes emergentes verificada em águas subterrâneas destinadas ao consumo humano das cidades de Itaporã e Caarapó, pode estar relacionada com as atividades de agricultura e construções urbanas no entorno dos pontos amostrais. A avaliação do risco realizada para os metais quantificados nestas águas determinou que Co, Cr, Ni e Mn apresentam possíveis riscos à saúde das pessoas que consomem diariamente desta água. Quando avaliado os efeitos citotóxicos e genotóxicos dos metais Al e Mn foi constatado que ambos podem ser prejudiciais à saúde da população exposta, considerando os resultados de instabilidade genômica observadas no modelo experimental (ensaio *in vitro*) pela exposição aos mesmos. Sendo assim, esse estudo serve como alerta de risco para a população exposta a esta água, e, auxiliar órgãos fiscalizadores para adequação das normas vigentes e implementação de valores limites para os compostos químicos que ainda não são regulamentados. Visto que, as concentrações limites permitidas pela legislação para alguns metais são superiores ao critério de qualidade de água considerado seguro para a saúde humana, além do fato de ter sido observado efeitos citotóxicos e genotóxicos nas concentrações dentro do limite pela legislação para Al e Mn nas células avaliadas.

ANEXO

O artigo “METAIS E CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS E AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA” foi aceito para publicação na revista **Environmental Science and Pollution Research**, que apresenta fator de impacto de 2.8 e qualis A2 para área interdisciplinar.

As normas para publicação podem ser acessadas através do link:
<https://www.springer.com/environment/journal/11356?detailsPage=pltc_i_1060392>