

Estudo da citotoxicidade *in vitro* de corantes azo em *Tetrahymena pyriformis*

Helena Fonseca¹, Nicolina Dias², Ana Nicolau³ e Nelson Lima⁴

Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 4710-057 Braga, Portugal

¹ helfonseca@yahoo.com.br, ² ndias@deb.uminho.pt, ³ protozoa@deb.uminho.pt,
⁴ nelson@iec.uminho.pt

RESUMO

O aumento da poluição ambiental e o contínuo desenvolvimento da síntese de novos químicos desencadeou uma crescente preocupação acerca dos possíveis efeitos desses componentes directa ou indirectamente na saúde humana.

No presente trabalho pretendeu-se utilizar o protozoário ciliado *Tetrahymena pyriformis* como bioindicador no estudo de respostas fisiológicas e bioquímicas à presença de oito corantes azo utilizados na indústria têxtil. Para tal, utilizou-se uma bateria de ensaios toxicofisiológicos, como o crescimento, a mortalidade e a morfometria. Estes ensaios foram realizados numa série de testes miniaturizados usando culturas axénicas de *T. pyriformis*, inoculadas com soluções dos 8 corantes em diferentes concentrações (5, 25 e 50 ppm), tendo como objectivo final a colecta de dados de forma a comparar respostas quanto à presença de diferentes corantes azo e quanto à presença de diferentes concentrações de um mesmo corante.

Pretendeu-se com esta bateria de testes estudar se os corantes com aplicação têxtil utilizados são tóxicos para o bioindicador utilizado e em que concentração produzem tal efeito. Espera-se que com os resultados deste estudo se possa extrapolar a influência destes compostos no meio aquático receptor.

1. INTRODUÇÃO

Os corantes azo são utilizados na tinturaria têxtil para corar e pintar fibras naturais e sintéticas, couros e peles, na tipografia a cores, e ainda como aditivos de produtos derivados do petróleo. São compostos xenobióticos, uma vez que contêm grupos ausentes em moléculas naturais e, portanto, nem todos os microrganismos que, normalmente, se encarregam da reciclagem da matéria orgânica lançada no ambiente, possuem a "maquinaria enzimática" necessária ao processamento de todos os tipos de grupos funcionais (o grupo funcional xenobiótico principal é a ligação azo, ou seja -N=N-) (FERREIRA, 1998).

As indústrias de corantes e as indústrias têxteis são, respectivamente, as maiores produtoras e utilizadoras de corantes azo. Produzem-se anualmente toneladas destes corantes, sendo cerca de 10 a 15% desses compostos lançados nos efluentes. Uma vez que estes corantes são recalcitrantes à degradação microbiana, os efluentes destes processos industriais são normalmente resistentes ao tratamento biológico, quer utilizando microrganismos quer utilizando plantas, sendo muitas vezes os processos de descontaminação físico-químicos, a única alternativa de tratamento para estas águas residuais (FERREIRA, 1998; MARTINS *et al.*, 2001, 2002, 2003).

Desta forma, é importante determinar, com segurança, quais as concentrações de químicos que se podem introduzir num ecossistema sem prejuízo para as comunidades do meio receptor. Para tal, é necessário proceder a uma série de testes de toxicidade. Existem dois objectivos essenciais destes testes: obtenção

de dados sobre as propriedades toxicológicas de um produto e o estabelecimento de limites de segurança à exposição de um novo produto.

Ao longo dos últimos anos, tem sido feita muita investigação sobre a toxicidade de vários compostos tóxicos através de biotestes usando vários organismos modelo. O recurso a estes testes centra-se na sua simplicidade e alta reprodutibilidade. Contudo, os organismos bioindicadores para avaliar os riscos e os impactes ambientais, têm que possuir um número de características importantes: têm de ser eucarióticos; a sua biologia e respostas gerais têm de ser bem conhecidas; o seu manuseamento laboratorial tem de ser relativamente fácil; e têm que possuir um tempo de geração curto, importante para estudos de efeitos tóxicos prolongados. Os protozoários ciliados preenchem todos estes requisitos. Recentemente, o uso de protozoários ciliados em testes toxicológicos tem sido investigado e o seu potencial em bioensaios padrão tem sido demonstrado em diversos ambientes. O protozoário, *Tetrahymena pyriformis*, foi por mais de quatro décadas o organismo de eleição em análises, avaliação de qualidade proteica e determinação de efeitos de várias substâncias tóxicas. Além disso, foi o primeiro protozoário a ser cultivado axenicamente, ou seja, num meio definido, livre de bactérias e de outros organismos, sendo mantido em culturas celulares apropriadas à adição de um composto que constitui, em princípio, a única alteração nas condições de cultura. (NICOLAU *et al.*, 2001).

Existem vários trabalhos que relatam estudos realizados com *T. pyriformis* relativamente a parâmetros como o crescimento, mortalidade, predação e ensaios bioquímicos, nomeadamente ATP, ACP e MTT, na presença de tóxicos. Estes ensaios são avaliados usando culturas axénicas de *T. pyriformis* (NICOLAU *et al.*, 2001).

Martins *et al.* (2001, 2002 e 2003) têm realizados ensaios sobre a biodegradação dos corantes azo de aplicação têxtil por fungos nomeadamente o fungo filamentosso *Phanerochaete chrysosporium*, de modo a estudar até que ponto eles serão recalcitrantes. O trabalho que se propõe neste trabalho apresenta uma nova abordagem no estudo destes corantes, nomeadamente da sua toxicidade em organismos modelo, como a *T. pyriformis*. Têm sido realizados ensaios com outros tóxicos com bons resultados, utilizando este bioindicador, e desta forma pensa-se utilizar este organismo para estudar a toxicidade de corantes azo, uma vez que são produtos químicos usados nas indústrias têxteis com possibilidade de afectarem o ambiente a nível de poluição aquática. A determinação da toxicidade destes corantes não foi ainda determinada desta forma, sendo assim este um trabalho inovador.

O objectivo deste trabalho é estudar a toxicidade de diferentes compostos químicos usados na indústria têxtil – corantes azo – no protozoário *T. pyriformis*. Pretende-se avaliar se os compostos são tóxicos e se o forem em que concentrações surgem os efeitos tóxicos e quais são esses efeitos, ou seja, que alterações provocam no organismo bioindicador.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Corantes:

Os corantes azo caracterizam-se pela presença de pelo menos um grupo cromóforo azo, mas podem conter dois, três ou, mais raramente, quatro grupos azo (-N=N-). Os grupos de azoto têm hibridização sp² e estão ligados normalmente anéis aromáticos. Os corantes azo cujos grupos substituintes são anéis benzénicos denominam-se homocíclicos. Se contêm um ou mais anéis heterocíclicos, os corantes azo designam-se heterocíclicos. Podem ainda ter adicionalmente grupos sulfónicos (SO₃H, na maioria dos corantes azo), não sendo facilmente degradados por microrganismos. Quimicamente são derivados do azo benzeno.

A nomenclatura apresentada para os corantes, expressando a componente *diazo* e a componente de ligação dos grupos sulfónicos é comum na química têxtil para evidenciar o processo de síntese. As siglas referem-se ao tipo de ácido (carboxílico – C ou sulfónico – S), à sua posição no anel (*meta* – *m* ou *para* – *p*) e ao componente de ligação (guaiacol – *g* ou siringol – *s*). Usaram-se assim 8 corantes: ácido meta-

aminobenzenosulfônico-guaiacol (Sm-g), ácido para-aminobenzenosulfônico-guaiacol (Sp-g), ácido meta-aminobenzenosulfônico-siringol (Sm-s), ácido para-aminobenzenosulfônico-siringol (Sp-s), ácido meta-aminobenzóico-guaiacol (Cm-g), ácido para-aminobenzóico-guaiacol (Cp-g), ácido para-aminobenzóico-guaiacol (Cm-s), ácido para-aminobenzóico-siringol (Cp-s).

Microrganismo e condições de cultura:

O organismo bioindicador utilizado foi o protozoário *Tetrahymena pyriformis* da estirpe CCAP 1630/1W, obtido da Coleção de Culturas de Estirpes de Algas e Protozoa do Reino Unido. As células de cultura foram mantidas na estufa, a uma temperatura constante de 25 °C em meio PPY - Proteose Peptone Yeast, sendo periodicamente sujeitas a rejuvenescimento.

Todos os ensaios toxicológicos utilizaram culturas axénicas de 18 a 24 horas, de *Tetrahymena pyriformis*. As células crescem até à fase exponencial na estufa a 25 °C, em meio de PPY (2% de proteose peptona e 0,25% de extracto de levedura) a pH entre 7,0 e 7,5. Todos os ensaios são efectuados com uma densidade inicial de cultura de pelo menos 10^4 células/ml.

Testes de toxicidade:

Os corantes foram adicionados às células nas seguintes concentrações: 5, 25 e 50 ppm, as células não expostas ao corante foram usadas como controlo. As células de *T. pyriformis* tratadas e não tratadas foram incubadas em tubos *Eppendorf* de 2 ml, num volume total de 1,5 ml. (DIAS *et al.*, 2003).

Análise do Crescimento e Mortalidade:

Para cada corante e para cada concentração foram retiradas, das culturas controlo e das expostas aos corantes, duas sub-amostras de 30 µl às 1, 24 e 48 horas. Para cada amostra fez-se a contagem das células vivas mortas (imóveis) antes de se proceder contagem do número total de células, para a qual foi necessária a fixação com *Neutral Buffered Formalin* (NBF) contendo formalina a 10 % em PBS, a pH 7,0. A contagem das células mortas e totais foi feita em duas sub-amostras de 30 µl com um microscópio óptico invertido (Nikon Diaphot 300) a uma ampliação de 100x (DIAS *et al.*, 2003). A contagem das células vivas foi obtida por diferença entre as totais e as mortas.

Análise Morfométrica:

As amostras tratadas e não tratadas foram fixadas durante 1 hora em solução NBF, lavadas e coradas com azul toluidina a 0,01 % (Sigma). Sub-amostras de 50 µl de cultura suspensa foram colocadas em lâminas e analisadas com um microscópio óptico invertido (Nikon Diaphot 300) a uma ampliação de 100x. Procedeu-se seguidamente à análise da imagem com uma câmara de vídeo monocromática CCD (Sony AVCD5CE) e dos dados pelo software MATLAB 5.1 (The Mathworks Inc., Natick) de modo a determinar a área (A) e a razão (W/L) entre os eixos mais curto (W) e mais longo (L) das células. Em cada sub-amostra, foram analisadas aleatoriamente, 100 células (DIAS *et al.*, 2003).

Análise estatística:

Depois da realização dos ensaios procedeu-se à análise estatística dos dados. Em cada ensaio, os dados experimentais representam a média de 2 ensaios independentes. Utilizou-se o teste ANOVA para os cálculos de significância de testes de crescimento e mortalidade e o teste *t* de Student para a morfometria. $P < 0,05$ e $P < 0,01$ foram aceites como níveis de significância estatística entre grupos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise do crescimento:

Os resultados de dois ensaios independentes de crescimento estão representados na Figura 1 (A, B e C). Os corantes azo quando em concentrações de 5 ppm causaram estimulações e inibições não significativas ($P < 0,01$) em todos os casos analisados. Após 48 horas, na concentração de 25 ppm os corantes Cm-g, Cp-g, Sm-g, Sp-g, Sm-s e Cm-s causaram inibições significativas ($P < 0,01$) no crescimento de *Tetrahymena pyriformis*. Na concentração de 50 ppm, todos os corantes causaram inibições significativas ($P < 0,01$) no crescimento, após 48 horas, com exceção do corante Cp-s.

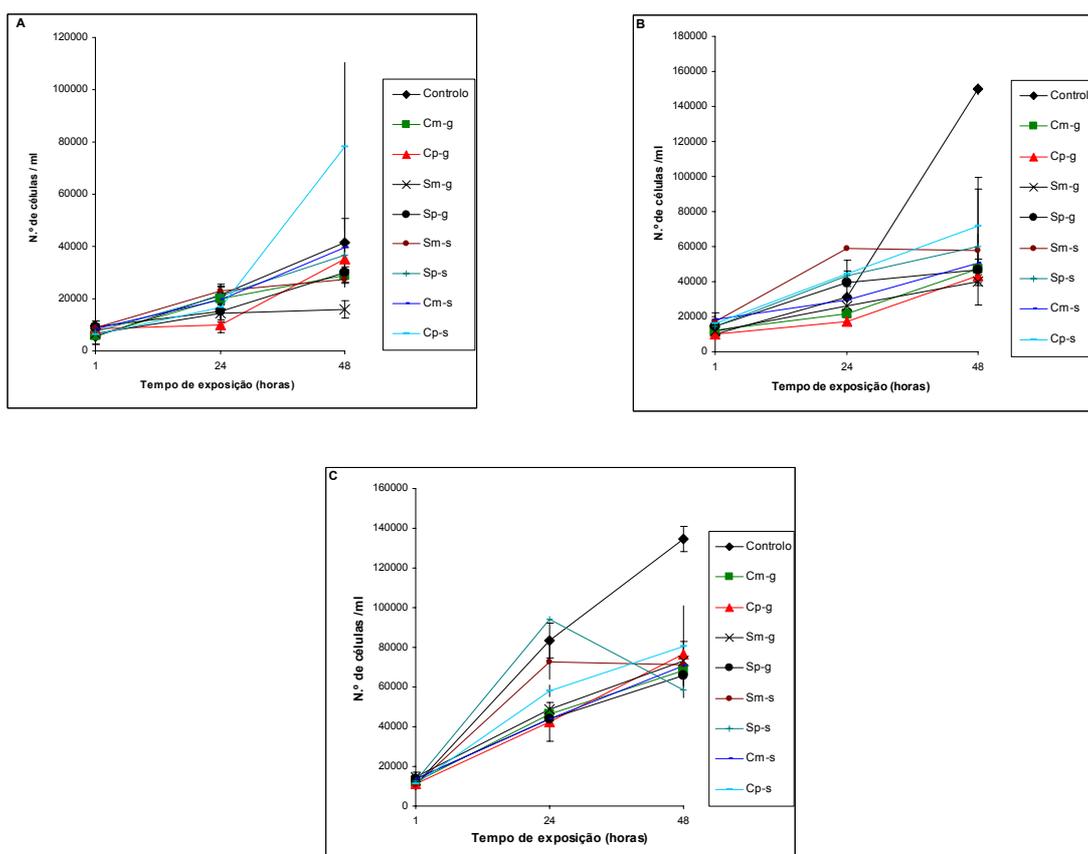


Figura 1: Efeito de diferentes concentrações de corantes azo no crescimento de *Tetrahymena pyriformis*, em ensaios de 48 horas. As concentrações usadas foram de 5 ppm (A), 25 ppm (B) e 50 ppm (C). Estão representadas as médias de dois ensaios independentes, sendo as barras os desvios padrão.

Análise da Mortalidade:

Os resultados de dois ensaios independentes de mortalidade estão representados na Figura 2 (A, B e C). Os corantes azo quando em concentrações de 5 ppm causaram estimulações e inibições não significativas ($P < 0,01$) em todos os casos analisados. No que se refere à mortalidade para concentrações de 25 ppm e 50 ppm, apenas o corante Sm-s e o corante Sp-g, respectivamente, causaram mortalidade significativa ($P < 0,05$) após 48 horas.

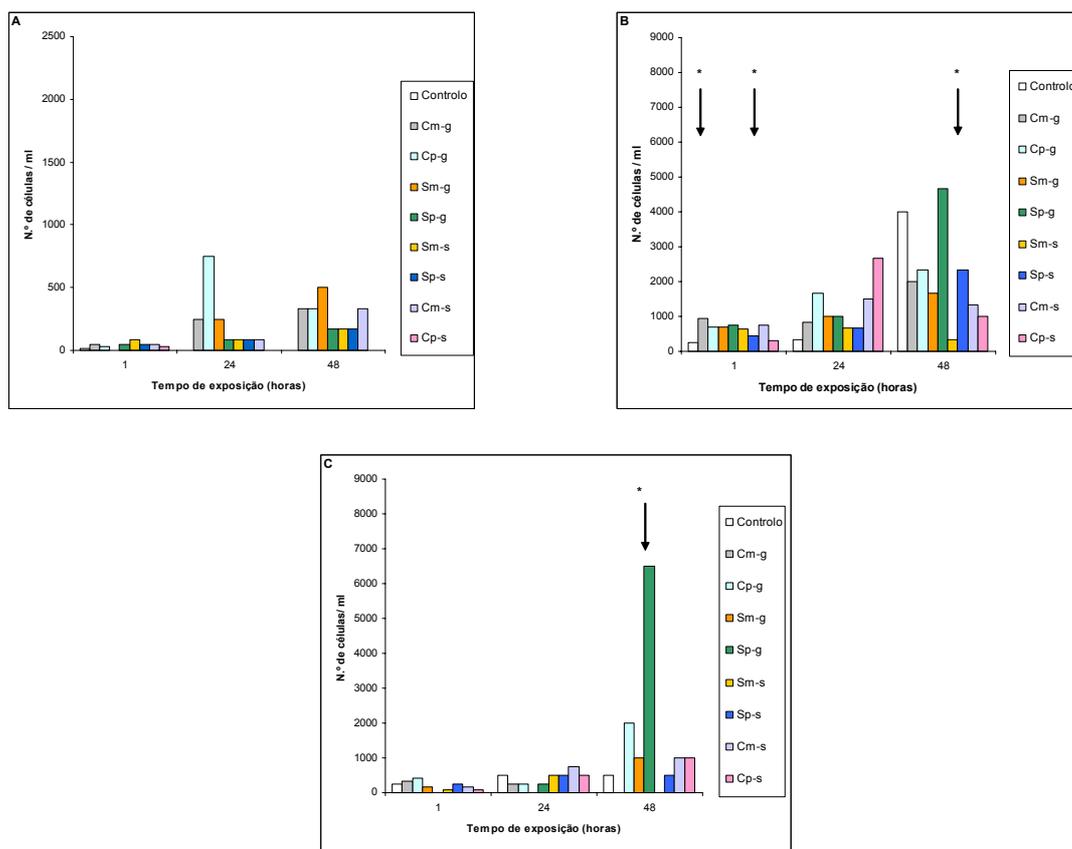


Figura 2: Efeito de diferentes concentrações de corantes azo na mortalidade de *Tetrahymena pyriformis*, em ensaios de 48 horas. As concentrações usadas foram de 5 ppm (A), 25 ppm (B) e 50 ppm (C). Os dados representam a médias de dois ensaios independentes. * indica diferenças significativas dos valores do controle ($P < 0,05$) e ** indica diferenças significativas dos valores do controle ($P < 0,01$).

Análise morfométrica:

Os resultados de dois ensaios independentes sobre a morfometria estão representados na Figura 3 (A, B e C). Quando em concentrações de 5 ppm, o corante Cp-g causou diferenças significativas ($P < 0,05$) na área celular, após 48 horas, assim como o corante Sp-s causou diferenças significativas ($P < 0,01$). Na concentração de 25 ppm, os corantes causaram diferenças significativas ($P < 0,01$), após 48 horas. Na concentração de 50 ppm, todos os corantes causaram diferenças significativas ($P < 0,01$), após 48 horas, excepto o corante Sp-g.

Dado que os efeitos tóxicos no crescimento e mortalidade se verificaram principalmente às 48 horas, para a análise morfométrica apenas apresentamos os resultados desses efeitos às 48 horas.

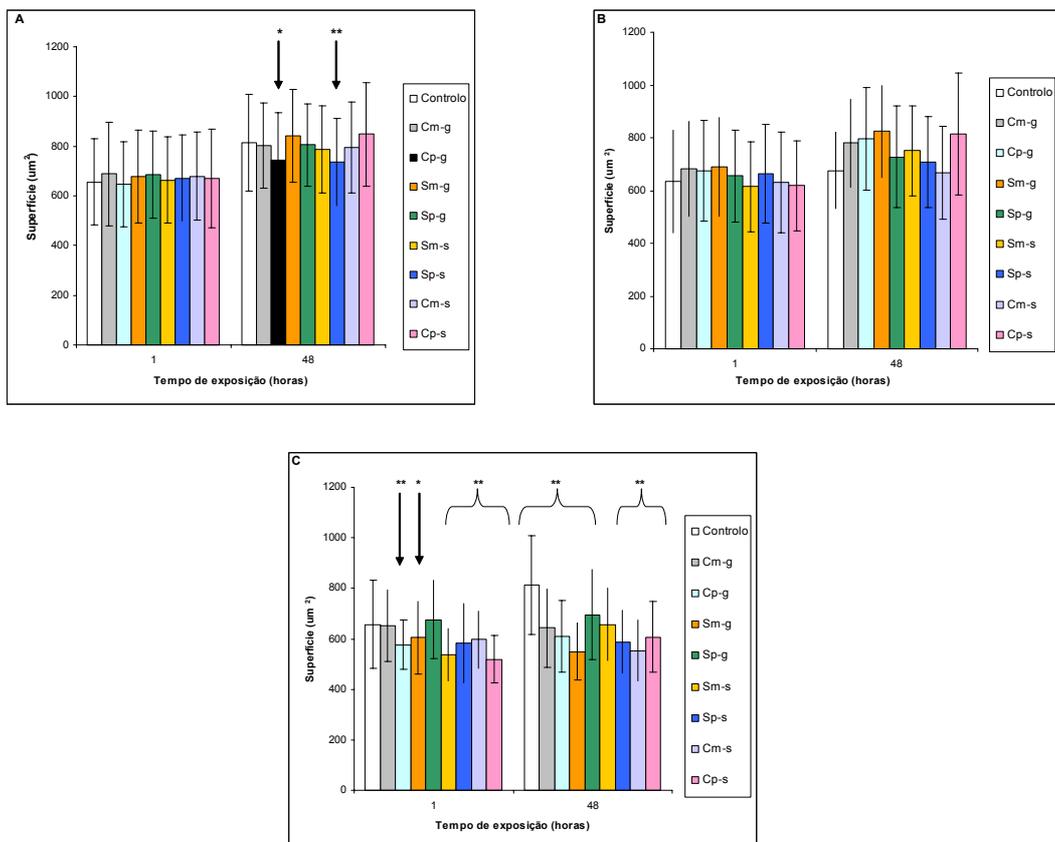


Figura 3: Efeito de diferentes concentrações de corantes azo na área de *Tetrahymena pyriformis*, em ensaios de 48 horas. As concentrações usadas foram de 5 ppm (A), 25 ppm (B) e 50 ppm (C). Os dados representam a médias de dois ensaios independentes e as barras os desvios padrão. * indica diferenças significativas dos valores do controlo ($P < 0,05$) e ** indica diferenças significativas dos valores do controlo ($P < 0,01$).

Os resultados de dois ensaios independentes sobre o ratio (W/L) estão representados na Figura 4 (A, B e C). Quando em concentrações de 5 ppm, os corantes Cp-g e Sp-s causaram diferenças significativas ($P < 0,01$) no ratio, após 48 horas. Quando em concentrações de 25 ppm, apenas o corante Sp-s causou diferenças significativas ($P < 0,01$), após 48 horas. Na concentração de 50 ppm, todos os corantes causaram diferenças significativas ($P < 0,01$), após 48 horas.

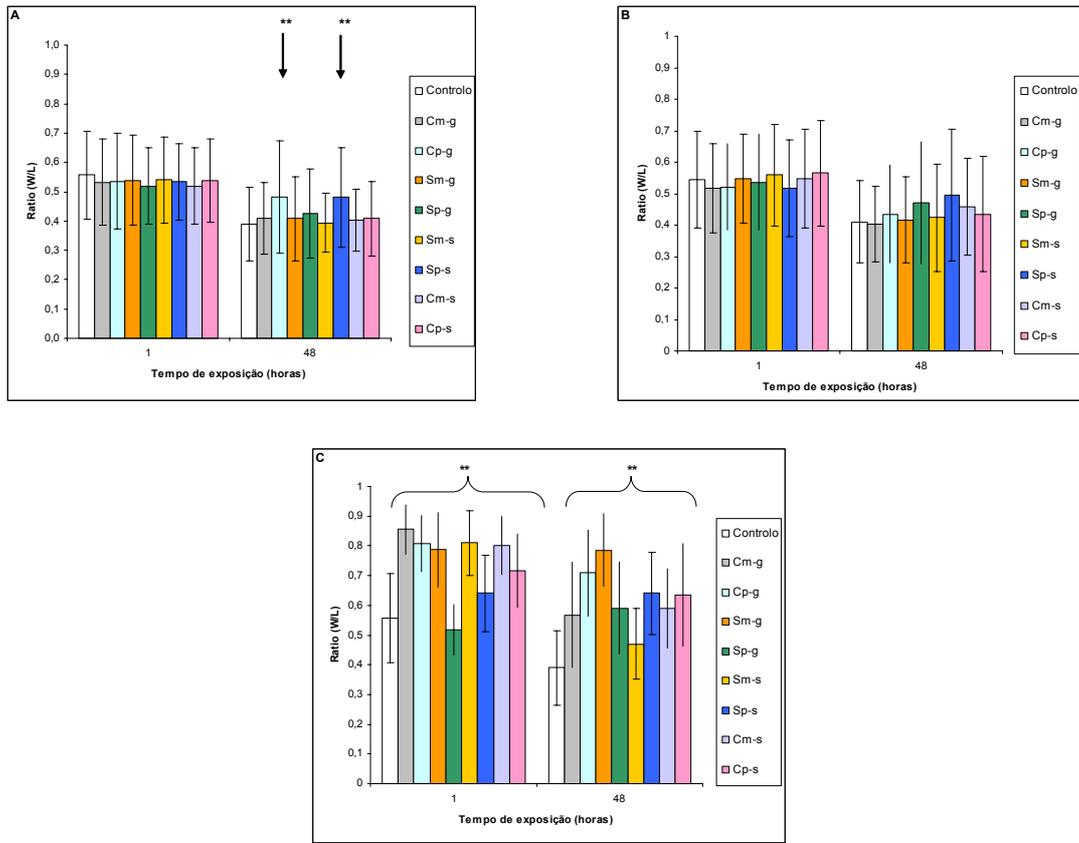


Figura 4: Efeito de diferentes concentrações de corantes azo na razão entre os eixos menor e maior (W/L) de *Tetrahymena pyriformis*, em ensaios de 48 horas. As concentrações usadas foram de 5 ppm (A), 25 ppm (B) e 50 ppm (C). Os dados representam a médias de dois ensaios independentes e as barras os desvios padrão. * indica diferenças significativas dos valores do controlo ($P < 0,05$) e ** indica diferenças significativas dos valores do controlo ($P < 0,01$).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os corantes azo são considerados recalcitrantes à degradação microbiológica mas pouco se sabe acerca da sua toxicidade. Com este estudo podemos verificar que na concentração máxima (50 ppm), a maioria dos corantes azo inibe o crescimento das células de maneira significativa. No entanto, para a mesma concentração, nenhum dos corantes, com excepção dos corantes Sm-s e Sp-g, causou mortalidade significativa. Constata-se assim que a toxicidade destes corantes, ao nível da mortalidade, não é elevada nas concentrações estudadas. Relativamente à morfometria, os corantes azo quando em concentrações de 50 ppm, afectaram as dimensões de *Tetrahymena pyriformis*, uma vez que se verifica, comparativamente com o controlo, uma diminuição da área e um arredondamento celular.

Em todos os bioensaios efectuados os corantes que demonstraram toxicidade variaram muito, sendo os seus efeitos muito variados.

Nos estudos toxicológicos apenas um bioensaio não pode fornecer todos os efeitos num determinado organismo. Os ensaios morfológicos e estruturais, como outros usados na citotoxicidade de compostos providenciam uma informação global sobre os efeitos, neste caso dos corantes azo, em *Tetrahymena pyriformis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dias N. (1998) Aplicação de Técnicas Fluorescentes no Estudo de Estruturas Biológicas de *Tetrahymena pyriformis*. Tese de Mestrado em Engenharia Biológica. Universidade do Minho. 86pp.

Dias N.; Amaral A.; Ferreira E. & Lima N. (2003) Automated image analysis to improve bead ingestion toxicity test counts in the protozoan *Tetrahymena pyriformis*. Letters Applied Microbiology (37) 230-233.

Dias N., Mortara R. & Lima N. (2003) Morphological and physiological changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vitro cytotoxicity assessment of Triton X-100. Toxicology in Vitro (17) 357-366.

Ferreira I. (1998) Síntese e biodegradação de corantes azo pelo *Phanerochaete chrysosporium*. Tese de Mestrado em Ciências do Ambiente. Universidade do Minho. 86pp.

Martins M.A.M.; Ferreira, I.C; Santos, I.M.; Queiroz M. J. & Lima N. (2001) Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Biotechnology, 89:91-98.

Martins M.A.M.; Queiroz M. J.; Silvestre A.J.D. & Lima N. (2002) Relationship of chemical structures of textile dyes on the pre-adaptation medium and the potentialities of their biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Research in Microbiology (153) 361-368.

Martins M.A.M.; Lima N.; Silvestre A.J.D. & Queiroz M.J. (2003) Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. Chemosphere (52) 967-973.

Nicolau A., Dias N., Mota M. & Lima N. (2001) Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment. Research in Microbiology (152) 621-630.

