

Determinação de doses letais de efluente de curtume em camundongos C57Bl/6J

Bianca Costa e Silva¹, Dalilla Cristina Socorro de Lemos¹, Raissa de Oliveira Ferreira¹, Bruna Francisca Sá¹, Raissa de Oliveira Ferreira¹, Joyce Moreira de Souza¹, Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes¹, Wellington Alves Mizael da Silva¹, Abraão Tiago Batista Guimarães¹, Aline Sueli de Lima Rodrigues¹, Guilherme Malafaia¹

RESUMO

A determinação de doses letais de substâncias é um importante parâmetro em estudos toxicológicos. Até então, não há na literatura conhecimento de estudos que tenham definido as doses letais de efluentes de curtume em modelos experimentais mamíferos. Assim, objetivou-se com este estudo determinar doses letais de efluentes de curtume em camundongos C57Bl/6J. Camundongos C57Bl/6J fêmeas receberam, intraperitonealmente, por 5 dias consecutivos, injeções de concentrações de 100%, 75%, 50% e 25% de efluentes de curtume, diluídas em água e camundongos C57Bl/6J machos receberam pela mesma via de administração 44%, 38%, 32% e 26% de efluentes de curtume. Verificou-se que a concentração de 25% de efluentes de curtume administradas intraperitonealmente mostra-se inócua a fêmeas de camundongos C57Bl/6J e que doses de até 44% de efluentes de curtume, não evidenciam sinais de toxicidade aguda em camundongos machos da mesma linhagem. Este estudo tem caráter incipiente e, portanto, sugere-se a realização de novas investigações, envolvendo diferentes vias de administração do resíduo, diferentes tipos de efluentes de curtume (brutos ou tratados) e variadas espécies de animais, considerando que xenobióticos podem ter diferentes mecanismos de ação em diferentes espécies e linhagens de roedores avaliadas.

Palavras-chave: toxicidade aguda; modelos experimentais; curtume.; camundongos.

Determination of lethal doses of tannery wastewater in C57Bl/6J mice

ABSTRACT

The determination of lethal doses of substances is an important parameter for toxicological studies. Until then, there is the knowledge of literature studies that have defined the lethal doses of tannery effluents in experimental mammalian models. Thus, the aim of this study was to determine lethal doses of tannery effluents in C57Bl/6J mice. C57Bl/6J mice (females) given intraperitoneally for 5 consecutive days, of 100% concentrations of injections, 75%, 50% and 25% tannery effluents, diluted in water and C57Bl/6J mice (males) received the same route of administration 44 %, 38%, 32% and 26% of tannery effluents. It was found that the concentration of 25% tannery effluents administered intraperitoneally is shown to innocuous C57Bl/6J mice (female) and doses of up to 44% of tannery effluents show no signs of acute toxicity in male mice of the same strain. This study has incipient nature and therefore it is suggested to conduct further investigations, involving different residue routes of administration, different types of tannery effluents (raw or treated) and various species of animals, considering that xenobiotics may have different mechanisms action in different species and strains of rodents evaluated.

Keywords: acute toxicity; experimental models; tannery; mice.

Autor para correspondência: Guilherme Malafaia

Endereço: Rodovia Geraldo Silva Nascimento, s/n,
Zona Rural, Urutaí, GO, Brasil.

E-mail: guilhermeifgoiano@gmail.com

Recebido em: 16 abr. 2015

Aceito em: 30 abr. 2015

Editor responsável: Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

¹Instituto Federal Goiano – Câmpus Urutaí, GO, Brasil.

INTRODUÇÃO

Um dos resíduos gerados pelas atividades industriais, refere-se ao efluente de curtume, gerado por indústrias de processamento do couro bovino. Embora essas atividades gerem lucros significativos, contribuindo para o desenvolvimento econômico e social de um país, estas têm sido alvo de preocupações, principalmente em função da grande produção de resíduos/efluentes ao longo do beneficiamento do couro bovino. Conforme discutido por Godecke et al. (2012), o processo de curtimento do couro requer diversos processos mecânicos e químicos de tratamento que resultam em grandes quantidade de resíduos com altas concentrações de matéria orgânica e variados produtos químicos potencialmente tóxicos.

Essa problemática é intensificada, principalmente quando se constata que mesmo após o tratamento recebido em uma estação de tratamento, podem ser encontrados nos efluentes consideráveis cargas orgânicas e inorgânicas, como ácidos, fenóis, sulfatos, sulfetos e, principalmente, elementos tóxicos como o cromo, o qual é utilizado durante o processo de curtimento (Batista & Alovisi, 2010).

Nesse sentido, com vistas a avaliar o impacto desses efluentes nos organismos, estudos toxicológicos já evidenciaram teratogenicidade em espécies de ouriço-do-mar, redução de crescimento de microalgas, bem como diferentes efeitos tóxicos dos efluentes de curtume em microcrustáceos (Oral et al., 2005). Contudo, os resultados advindos desses modelos experimentais, não podem ser extrapolados para os modelos mamíferos, os quais apresentam maior complexidade, fisiológica e metabólica. Apesar disso, os estudos sobre efeitos da exposição de efluentes de curtume em modelos experimentais mamíferos são raros. Destacam-se apenas os trabalhos de Siqueira et al. (2011) e Moysés et al. (2014), que utilizaram camundongos Swiss e ratos Wistar, respectivamente.

Dentre as diversas dificuldades para reproduzir os efeitos humanos da ingestão de efluentes de curtume em um modelo experimental, destacam-se os protocolos de exposição aos quais os animais são submetidos. O estudo de Siqueira et al. (2011) avaliou os efeitos da exposição dos animais à ingestão de 0,1% e 1% de efluente de curtume, diluídos em água, por um período de 21 dias. Já Moysés et al. (2014) estudaram ratos Wistar expostos à ingestão das concentrações de 0,1%, 1% e 5% de efluentes de curtume, também diluídas em água, por um período de 30 e 45 dias. Em ambos os estudos, os critérios de escolha para essas concentrações não

estão muito claros, fato este que abre perspectivas para a realização de novas investigações, não apenas para avaliação de efeitos desses efluentes em doses superiores, mas também para investigação de períodos e formas diversificadas de exposição aos efluentes diversificados.

Nesse sentido, considerando a enorme escassez de trabalhos envolvendo modelos experimentais mamíferos e exposição a efluentes de curtume, este estudo teve como objetivo determinar doses letais desses resíduos, administradas intraperitonealmente, afim de servir de subsídios para o desenvolvimento de investigações sobre a toxicidade desses resíduos. Tem-se, a partir deste estudo, a expectativa da utilização de seus resultados para a definição de quais percentuais de efluentes de curtume a serem testados em estudos envolvendo modelos experimentais mamíferos.

MATERIAL E MÉTODOS

Machos e fêmeas de camundongos C57BL/6J oriundos de matrizes obtidas no Biotério Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública de Goiás (IPTSP) (Goiânia, GO, Brasil) foram mantidas no Biotério do Laboratório de Pesquisas Biológicas do Instituto Federal Goiano – Câmpus Urutaí (Urutaí, GO, Brasil). Os animais foram submetidos a ciclo normal claro/escuro, sendo os alimentos e líquidos oferecidos *ad libitum*.

Dois experimentos independentes foram desenvolvidos, nos quais foram utilizados procedimentos adaptados dos protocolos de avaliação da toxicidade aguda por doses repetidas preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD). Tais adaptações consistiram principalmente na redução da duração mínima dos estudos de toxicidade de doses repetidas (de 2 semanas, preconizadas pela ANVISA, para 5 dias consecutivos, utilizados no presente estudo), assim como os parâmetros a serem avaliados. Nosso estudo não avaliou aspectos ligados à hematologia e bioquímica dos animais, tampouco duração, reversibilidade da toxicidade induzida e histopatologia de órgãos. Em adição, considerou-se a OECD (2010), no que tange às orientações sobre a rota de administração dos efluentes de curtume.

No primeiro (experimento 1), fêmeas de camundongos C57Bl/6J, entre 21 e 30 dias de idade, receberam, pela via intraperitoneal, quatro diferentes concentrações de efluentes de curtume, diluídos em água filtrada (100%, 75%, 50% e 25%), além da solução salina, como controle, representando, cada concentração um grupo experimental (n=8). No segundo (experimento 2),

machos de camundongos C57Bl/6J, com idade entre 21 e 30 dias, também receberam pela via intraperitoneal, quatro diferentes concentrações de efluentes de curtume, diluídos em água filtrada (44%, 38%, 32% e 26%), além da solução salina, como controle. Neste caso, cada grupo experimental contou com seis animais, com exceção do grupo controle que foi composto de 3 animais. Destaca-se que os camundongos machos receberam doses superiores de efluentes de curtume diluídos em água, a partir da hipótese inicial dos autores de que os machos pudessem ser mais resistentes aos efluentes

O efluente de curtume utilizado neste estudo foi obtido de uma indústria curtumeira, localizada em Pires do Rio, GO, Brasil. O efluente cedido pela indústria não continha o elemento cromo, uma vez que foi retirado das etapas de operações de ribeira, ou seja, aquelas que antecedem a fase de curtimento do couro bovino (a qual utiliza sais de cromo), o que foi confirmada em análise laboratorial (Tabela 1). A escolha por esses resíduos deu-se em função destes efluentes brutos serem descartados, por muitas indústrias curtumeiras, diretamente em cursos d'água que margeiam as propriedades.

Tabela 1. Caracterização do efluente bruto de curtume, diluído em água em diferentes concentrações e ofertados a camundongos C57Bl/6J

Parâmetros	Efluentes de curtume	Água potável
pH a 25°C (UpH)	8,19	7,19
Turbidez (NTU)	382,00	<1,00
Nitrogênio amoniacal (mg.L ⁻¹)	2,10	0,01
Nitrogênio total (mg.L ⁻¹)	110,00	1,20
Nitrato (mg.L ⁻¹)	23,00	0,30
Condutividade elétrica a 25° C (µS.cm ⁻¹)	72,10	52,00
Fósforo total (mg.L ⁻¹)	33,61	0,11
Ortofosfato (mg.L ⁻¹)	77,09	0,26
Demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (mg.L ⁻¹)	9.333,33	0,50
Sólidos totais (mg.L ⁻¹)	82.190,00	30,00
Cobre dissolvido (mg.L ⁻¹)	<0,01	0,04
Manganês dissolvido (mg.L ⁻¹)	<0,10	ND
Ferro dissolvido (mg.L ⁻¹)	1,91	0,09
Zinco (mg.L ⁻¹)	<0,01	1,06
Sódio (mg.L ⁻¹)	5.680,00	5,01
Magnésio (mg.L ⁻¹)	243,20	1,21
Cálcio (mg.L ⁻¹)	2.805,00	4,00
Enxofre (mg.L ⁻¹)	833,33	1,00
Potássio (mg.L ⁻¹)	122,00	1,60
Carbono orgânico total (COT) (mg.L ⁻¹)	93,32	8,20

A análise dos efluentes brutos de curtume e da água seguiu a metodologia preconizada pelo American Public Health Association (APHA, 2005). Todas as análises foram realizadas em laboratório comercial, localizado em Goiânia, GO, Brasil.

Diariamente os animais de ambos os experimentos, receberam dose diária correspondente a cada concentração de efluente de curtume, além de solução salina (soro fisiológico, conforme Kupczik et al. (2009)), em um volume de 600 µL, durante 5 dias consecutivos. Para a determinação da dose letal mediana (DL₅₀), os animais foram monitorados diariamente e, havendo morte, esta foi expressa como o percentual do número total de animais que receberam os tratamentos. Foi previsto o cálculo da DL₅₀ utilizando-se o método clássico de regressão linear (*software* ASSISTAT). Simultaneamente às aplicações das crescentes concentrações de efluentes de curtume, procedeu-se a observação dos animais, de acordo com o

teste hipocrático descrito por Malone & Robichaud (1962).

Destaca-se que a metodologia do estudo foi consistente com os princípios éticos do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal Goiano, GO, Brasil (protocolo n. 18/2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao experimento 1, no qual foram utilizadas fêmeas de camundongos C57Bl/6J a administração de doses de 100%, 75% e 50% de efluentes de curtume, diluídas em água, foi letal para todos os animais (Figura 1). Contudo, a administração da dose de 25% de efluente de curtume, conforme protocolo de avaliação

proposto, foi inócua do ponto de incidência de óbitos, impossibilitando, dessa forma, a realização do cálculo de DL₅₀ pela via de administração pré-estabelecida.

As fêmeas que receberam as doses de 100%, 75% e 50%, em média de 2,5, 10,4 e 20,1 minutos, após a primeira administração, respectivamente, foram a óbitos. Para todos os animais foram observados comportamentos

semelhantes pré-óbito, com destaque para: falta de coordenação motora, com evidente ausência de resposta ao toque ou aperto da cauda; contorção abdominal; ausência de reflexo de endireitamento; ausência de tônus muscular nas patas, no corpo e ataxia, bem como prejuízos na atividade do sistema nervoso central, evidenciados por meio de tremores, convulsões, hipnose, forte espasmo muscular seguido de morte.

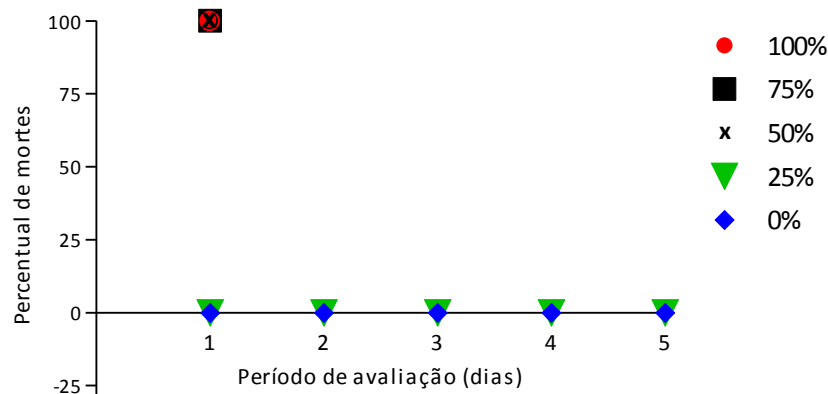


Figura 1. Curva de sobrevivência dos animais, em função dos dias e das concentrações de efluentes de curtume, diluídas em água, aplicadas em fêmeas de camundongos C57Bl/6J, pela via intraperitoneal.

Esses dados demonstram o alto potencial tóxico agudo a partir de aplicações intraperitoneais de elevadas concentrações de efluentes de curtume, diluídas em água no modelo experimental utilizado. Há de se ponderar que a via intraperitoneal pré-definida neste estudo, representa uma grande área do organismo em que ocorre a absorção rápida da substância aplicada no animal, sem a ocorrência de fatores que podem interferir na absorção das substâncias, quando administradas oralmente como, por exemplo, a ação do pH estomacal, a possibilidade da substância administrada sofrer metabolismo de primeira passagem, a interação com alimentos e substâncias ingeridas, dentre outras. Neste caso, a via de administração utilizada pode explicar a alta mortalidade observada nas altas concentrações do efluente, o que poderia não ter sido observada, se a administração das diferentes concentrações de efluentes de curtume tivessem sido administradas oralmente, por meio de gavagem.

Em relação ao experimento 2, no qual foram utilizados machos de camundongos C57Bl/6J não houve registro de morte para a administração de nenhuma das doses de efluentes de curtume aplicadas nos animais (44%, 38%, 32%, 26% e 0%), impossibilitando, a determinação de doses letais 100% (DL₁₀₀) e do cálculo de DL₅₀ pela via de administração pré-estabelecida. Esses dados corroboram a nossa hipótese inicial de que machos

da linhagem de camundongos escolhida podem ser mais resistentes aos efeitos dos efluentes de curtume, em relação às fêmeas. Além disso, a hipótese de que a DL₅₀ para a espécie e linhagem de camundongo utilizada estaria entre 50% e 25% de efluentes de curtume, em função do experimento 1 (realizado com fêmeas), não foi confirmada. Este fato pode estar diretamente relacionado ao sexo dos animais, utilizados no experimento 2, sugerindo, assim, que a resposta à administração intraperitoneal de concentrações de efluentes de curtume em machos e fêmeas de camundongos C57Bl/6J pode ser diferente. Portanto, esse aspecto representa uma limitação do estudo, uma vez que, o mais indicado seria a condução do experimento 2, com fêmeas da espécie e linhagem animal escolhida neste trabalho.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo representa um avanço no conhecimento relacionado aos efeitos de efluentes de curtume no organismo de um mamífero, dada a completa ausência de trabalhos dessa natureza, publicados na literatura. Demonstramos que concentrações de 25% de efluentes de curtume administradas intraperitonealmente mostram-se inócuas a fêmeas de camundongos C57Bl/6J e que doses de até 44% de efluentes de curtume, não

evidenciam sinais clínicos de toxicidade aguda em camundongos machos da mesma linhagem.

Como perspectivas de estudos, sugere-se que novas investigações sejam conduzidas, afim de determinar DL₁₀₀ e DL₅₀, a partir de diferentes vias de administração do resíduo, diferentes tipos de efluentes de curtume (brutos ou tratados) e variadas espécies de animais, considerando que xenobióticos podem ter diferentes mecanismos de ação em diferentes espécies e linhagens de roedores avaliadas.

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2013). *Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos*. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e0f1d9004e6248049d5fddd762e8a5ec/Guia+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+-+vers%C3%A3o+2.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 28/04/2015.

Batista, M. M. & Alovise, A. M. T. (2010). Alterações de atributos químicos do solo e rendimento da cana soca pela utilização de lodo de curtume. *Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente*, 13(17): 387-396.

Godecke, M. V., Rodrigues, M. A. S. & Naime, R. H. (2012). Resíduos de curtume: estudo das tendências de pesquisa. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 7(7): 1357-1378.

Kupczik, F., Vialle, L. R. G., Nobre, L. O., Vieira, L. A. & Fernandes, A. E. O. (2009). Influência da ciprofloxacina na consolidação óssea de fraturas de fêmur em ratos. *Acta Ortopédica Brasileira*, 17(4): 228-231.

Malone, M. H. & Robichaud, R. C. (1962). A Hippocratic screening for pure or drug materials. *Lloydia*, 25: 23-53.

Moysés, F. S., Bertoldi, K., Spindler, C., Sanches, E. F., Elsner, V. R., Rodrigues, M. A. S. & Siqueira, I. R. (2014). Exposition to tanneru wastewater did not alter behavioral and biochemical parameters in Wistar rats. *Physiology & Behavior*, 129: 160-166.

Oral, R., Meriç, S., Tünay, O., Nicolam E., Petruzzelli, D. & Pagano G (2005). *Multi-species toxicity monitoring in a chromium-based leather tannery wastewater*. Disponível em: <<http://www.srcosmos.gr/srcosmos/showpub.aspx?aa=6537>>. Acesso em: 28/04/2015.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (2010). *Draft guidance document n. 116 on the design and conduct of chronic toxicity and carcinogenicity studies, supporting TG 451, 452, 453 table of contents*. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/44960015.pdf>>. Acesso em: 28/04/2015.

Siqueira, I. R., Vanzella, C., Bianchetti, P., Rodrigues, M. A. S. & Stülp, S (2011). Anxiety-like behaviour in mice exposed to tannery wastewater: the effect of

photoelectrooxidation treatment. *Neurotoxicology and Teratology*, 33: 481-484.