



DESCONTAMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE BROMETO DE ETÍDIO GERADOS EM PROCEDIMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Renan Savieri Carniello¹; Rodrigo Franco da Silva²; Adriana Fiorini³

RESUMO: O brometo de etídio (EtBr) é um intercalante de DNA utilizado em procedimentos de biologia molecular como eletroforese em gel de agarose para a visualização de fragmentos de DNA. A capacidade de intercalação na molécula de DNA o torna um produto de grande periculosidade de caráter mutagênico, moderado tóxico e possível carcinogênico. Resíduos de EtBr fazem parte do Grupo B (resíduos químicos ou contaminados por químicos perigosos), segundo a Resolução nº 5 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) e a NBR-10004 da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), este grupo está incluso na Classe I (resíduos perigosos). O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de descontaminação de resíduos de EtBr utilizados em tampões eletroforéticos. Para esta finalidade foi aplicado o método de Armour e do método de Lunn & Sansone para descontaminar soluções geradas em trabalhos que utilizam o EtBr, além de verificar a concentração mínima necessária para coloração dos fragmentos de DNA em gel de agarose. O método de Lunn & Sansone mostrou-se eficaz na descontaminação de soluções com 1µg/mL de EtBr. A concentração mínima de 0,03 µg/mL de EtBr foi suficiente para a visualização de fragmentos de DNA nos géis. Os resultados possibilitarão a elaboração de um manual prático sobre a segurança na manipulação deste agente e métodos de descontaminação de resíduos gerados em laboratórios de biologia molecular.

PALAVRAS-CHAVE: Brometo de etídio (EtBr), descontaminação, agente intercalante.

INTRODUÇÃO

O Brometo de Etídio (EtBr) é um produto químico representado pela fórmula $C_{21}H_{20}BrN_3$. A porção principal da molécula é uma estrutura tricíclica com grupos anilina em ambos os lados de uma piridina (McGraw-Hill Dictionary of Scientific and Technical Terms, 2003).

Devido ao seu poder intercalante na molécula de ácido nucléico é utilizado como um corante fluorescente para obter a visualização dos fragmentos de DNA através da eletroforese em gel de agarose (BAIRD et al., 1996). Inúmeras outras técnicas utilizam o EtBr, como em estudos de microscopia fluorescente à resistência de múltiplas drogas, como reagente de derivação analítica em ensaios clínicos para monitoramento contínuo dos níveis de drogas anti-câncer em fluidos biológicos e como precursor de droga como um agente parasitotóxico ou antiprotozoário para tratamento de Leishmania (BRUN e LEON, 1978).

A coloração de géis de eletroforese utilizando o EtBr é feita antes ou após a migração, esta última, através da imersão do gel de agarose em uma solução diluída deste corante. Durante a imersão o brometo de etídio difunde-se no gel, se auto concentrando nas regiões de contatos com o DNA, intercalando-se entre os nucleotídeos da dupla hélice, podendo ser visto como bandas laranjas fluorescentes quando exposto à luz Ultra Violeta (UV).

Estas inovações na eletroforese em gel de agarose tiveram grandes contribuições para os estudos com DNA, mas se trata de um procedimento muito perigoso, pois o

¹Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá - CESUMAR, Maringá – PR. Programa de Iniciação Científica do Cesumar (PICC). renan_sc_002@hotmail.com

²Graduado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Maringá – Cesumar. digo.sapim@gmail.com

³Orientador e Docente do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. fiorini@cesumar.br

brometo de etídio é considerado um agente mutagênico potente e a radiação ultravioleta utilizada para visualizar o DNA pode causar queimaduras severas (BROWN, 2003).

De acordo com o Departamento de Segurança e Saúde da Universidade de Edinburg, que disponibiliza seus dados no site <http://safety.ed.ac.uk/resources/general/ethbralt.shtm>, a capacidade desta molécula em se intercalar entre os pares de base do DNA classifica-o como um produto de grande periculosidade de caráter mutagênico, moderadamente tóxico e possível carcinogênico e teratogênico. Os efeitos desta substância sobre o organismo podem ocorrer em casos como: inalação (podendo causar tosses e espirros), ingestão (causando desarranjos gastrointestinais com possíveis danos ao fígado e rins), contato com a pele (causando inflamação e descoloração da pele), contato com os olhos (causando irritação e podendo ser absorvido pelos olhos) e exposição crônica (causando possível ação cancerígena) (BARROS et al., 2003).

Nenhum estudo epidemiológico positivo ou negativo a respeito do risco de câncer em humanos foi encontrado disponível na literatura. As análises se concentram em modelos animais e os resultados incluem tanto o efeito carcinogênico, mutagênico e genotóxico, quanto efeitos no metabolismo e até como um agente terapêutico.

Os métodos de descontaminação desta solução são conhecidos por vários autores, sendo os principais o método Armour (KAUFMAN, 1990) e o método de Lunn e Sansone (LUNN; SANSONE, 1987). Para confirmar a descontaminação das soluções ou de materiais contaminados com EtBr, basta expor os mesmos em luz UV, se tiver totalmente inativo não irá produzir fluorescência, podendo ser então descartado sem causar danos ao meio ambiente.

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo na literatura sobre a ação mutagênica do EtBr e abordar os procedimentos seguros da sua manipulação. A parte experimental do trabalho consistiu da aplicação de dois testes de descontaminação de resíduos de EtBr e análises para se verificar a concentração mínima de EtBr necessária para coloração dos fragmentos de DNA em gel de agarose, com o intuito de reduzir a quantidade de resíduos de EtBr em procedimentos de biologia molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

PROTOCOLOS DE DESCONTAMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE BROMETO DE ETÍDIO

Método de Armour: em 100 mL de água destilada foi adicionado 100 µL de EtBr a 1mg/mL, formando uma solução com concentração 1µg/mL. Nesta solução foi adicionado 300 mL de hipoclorito de sódio à 2,5% e mantido sob agitação por quatro horas em temperatura ambiente. Após este período, a solução foi mantida em repouso por 3 dias. Passado o repouso, foi medido o pH da solução para ajustar para 6-8 com hidróxido de sódio (NaOH).

Método de Lunn e Sansone: em 100 mL de água destilada foi adicionado 100 µL de EtBr a 1mg/mL formando uma solução com concentração 1µg/mL. Nesta solução foi adicionado 5 mL de ácido hipofosforoso e 12 mL de nitrito de sódio (NaNO₂) a 0,5 M. A solução foi mantida em repouso por 20 horas.

Para testar a eficiência da descontaminação de resíduos de EtBr, por ambos os métodos, foi feito um gel de agarose a 0,7% sem EtBr e corrido durante 1 hora à 90 Volts. Como amostra de DNA para a verificação da ação intercalante do EtBr, utilizamos o padrão de tamanho molecular DNA do fago *Lambda* (λ) clivado com a enzima de restrição *HindIII* nos volumes de 2,13 µL, 4,26 µL e 1,06 µL. Em cada amostra foi adicionado 2 µL de *loading* de corrida (30% glicerol + 0,25% azul de bromofenol). Após a corrida, o gel foi colocado em uma bandeja com 100 mL da solução de descontaminação, embrulhado com papel alumínio e mantido em repouso por 30 minutos em local protegido da luz. Após o

reposo o gel foi visualizado em transiluminador de UV e fotografado em sistema de fotodocumentação digital DigDocIt.

TESTES DE COLORAÇÃO COM BROMETO DE ETÍDIO EM GÉIS DE AGAROSE

Para verificar qual a concentração mínima de brometo de etídio suficiente para a visualização de amostras de DNA em uma eletroforese em gel de agarose, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 0,7% utilizando 45 mL de tampão TBE 1X e 0,315 g de agarose. Após total dissolução em microondas foi adicionado 1,35 μL de EtBr (0,03 $\mu\text{g/mL}$). O DNA do fago λ clivado com a enzima de restrição *HindIII* (DNA padrão) foi aplicado nos poços nos volumes de 2,13 μL , 4,26 μL e 1,06 μL .

A concentração de EtBr testada (0,03 $\mu\text{g/mL}$), menor que a concentração normalmente utilizada (0,1 $\mu\text{g/mL}$), teve com o objetivo verificar se é uma concentração suficiente para a visualização do fragmento de 2027 pb do DNA padrão. Este fragmento apresenta uma concentração de 9 ng ao ser adicionado 2,13 μL da amostra, que é considerada a quantidade mínima para a visibilidade em transiluminador de luz UV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O PROTOCOLO DE DESCONTAMINAÇÃO DE LUNN E SANSONE FOI EFICIENTE NA DESCONTAMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ETBR

Os métodos de Armour e de Lunn e Sansone foram aplicados a uma concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ de EtBr em um volume de 100 mL de água destilada.

Ao realizar a descontaminação com o método de Armour, verificamos que, após o período de três dias de repouso, a solução sob descontaminação apresentou pH 11. Dessa forma, o pH não foi ajustado para 6-8 com hidróxido de sódio (NaOH), pois o NaOH é uma base e isso só seria possível se o pH da solução estivesse abaixo deste valor.

Algumas publicações encontradas na literatura não utilizam esta etapa, como o guia de resíduos químicos (Hazardous Laboratory Chemicals Disposal Guide, CRC-Lewis Publishers, EUA, 1996 apud Comissão Interna de Segurança Química-CISQ), a Universidade de Medicina de Washington e o Departamento de Segurança e Saúde Ambiental da Universidade de Minnesota. Outras publicações encontradas utilizam esta etapa, como o Laboratório de Resíduos Químicos da Universidade de São Paulo (USP), a Universidade de Princeton, a Universidade da Carolina, York Universidade e o Colégio de Ciências Biológicas.

Devido a estas inconsistências, também citada no site da Faculdade de Ciências de La Vie, o método de Armour não foi escolhido para ser utilizado no laboratório de Biologia Molecular do Cesumar.

O procedimento de descontaminação de resíduos de EtBr utilizando o método de Lunn e Sansone foi concluído com sucesso e posteriormente utilizado para testar a capacidade de coloração de fragmentos de DNA em gel de agarose. Verificamos que o resultado foi positivo, ou seja, os fragmentos no gel não foram corados com a solução de descontaminação por este método (Figura 1).

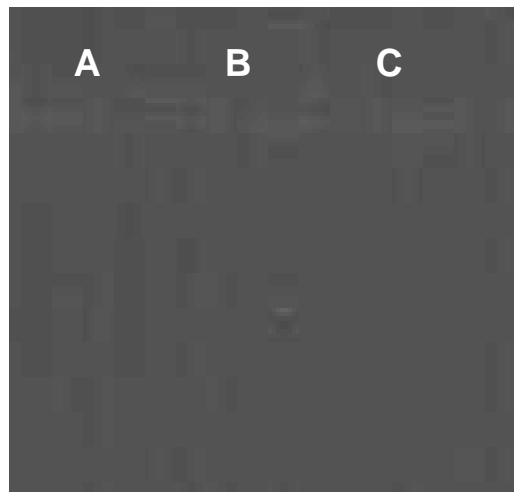


Figura 1. Gel de agarose a 0,7 % com DNA do fago λ nos volumes de 4,26 (A), 2,13 (B) e 1,07 (C) μ L corado com solução contendo 0,1 μ g/mL de brometo de etídeo em água descontaminada pelo método de “Lunn Sansone”

A CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DE ETBR (0,03 μ G/ML) É SUFICIENTE PARA A COLORAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA

Esse teste foi realizado para verificar qual a concentração mínima de EtBr suficiente para a visualização de amostras de DNA na eletroforese em gel de agarose, com o objetivo de diminuir a quantidade de resíduos. Sabendo-se que a concentração mínima de DNA para ser observada com precisão em gel de agarose é de 9 ng, foi utilizado um volume de 2,13 μ L do padrão para se atingir uma concentração de 8,90 do fragmento de 2027 pb (Figura 2). A concentração padrão de EtBr utilizada na maioria dos protocolos é 0,1 μ g/mL em gel ou tampão de eletroforese, sendo possível a visualização de todas as bancas de DNA, inclusive na concentração de 2,48 μ L (Figura 2, seta).

A concentração de 0,03 μ g/mL de EtBr também foi avaliada, com o objetivo de verificar se esta concentração é suficientes para a visualização do fragmento de 2027 pb do DNA do marcador (9 ng). Foi observado que é possível visualizar a banda apresentando 8,90 ng (Figura 3, seta) com a concentração 0,03 μ g/mL de EtBr.

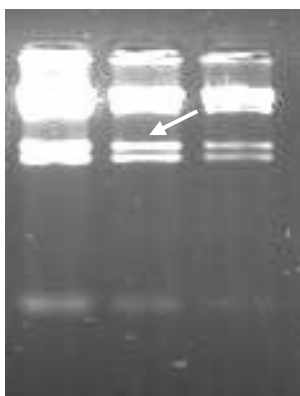


Figura 2. Gel de agarose a 0,7 % com 0,1 μ g/ml de EtBr. DNA do fago λ nos volumes de 4,26(A), 2,13(B) e 1,07(C) μ L.

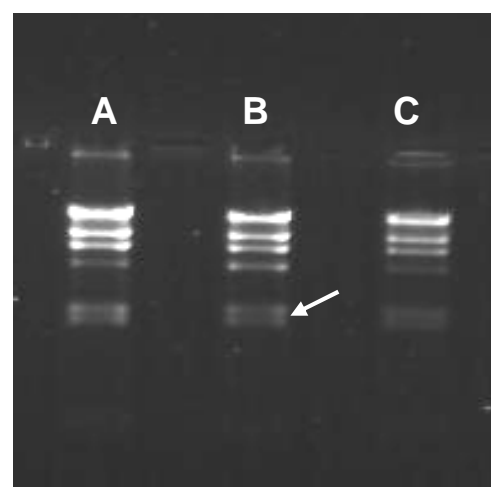


Figura 3. Gel de agarose a 0,7 % com 0,03 μ g/ml de EtBr. DNA do fago λ nos volumes de 4,26(A), 2,13(B) e 1,07(C) μ L.

CONCLUSÃO

Considerando que EtBr é uma substância perigosa, de alto risco para a população e o meio ambiente, mesmo sem a existência de estudos concretos que comprovem o seu potencial carcinogênico é de extrema importância que medidas de segurança sejam adotadas para a manipulação deste agente. Com os resultados deste trabalho foi possível observar que concentrações menores que as comumente utilizadas de EtBr servem para visualizar fragmentos acima de 9 ng em procedimentos eletroforéticos de rotina em laboratórios de biologia molecular. Mesmo quando se utiliza concentrações maiores deste agente existem métodos seguros e práticos de descontaminação, como o método de Lunn e Sansone, que pode ser usado como uma alternativa para métodos definitivos, como a incineração. Vale lembrar que as concentrações de EtBr utilizadas para coloração de géis de agarose (0,1 µg/ml) não são consideradas perigosas quanto a efeitos mutagênicos, mas deve-se considerar outros perigos relacionados com o EtBr.

REFERÊNCIAS

BAIRD, D.J. et al. **Ecotoxicology**: ecological dimensions. New York: Chapman & Hall, 1996.

BARROS, I. C. et al. Recomendações referentes à segurança nos laboratórios da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, n. 101, 2003.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA**: Uma introdução. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

BRUN, R.; LEON, W. Effect of ethidium bromide on growth and morphology of *Leishmania tarentolae* promastigotes in vitro. **Acta Trop**, n. 35, v. 3, p. 239-246, 1978.

KAUFMAN, J. A. **Waste Disposal in Academic institutions**. Chelsea: Lewis Publishers, 1990.

LUNN, G.; SANSONE, E. B. Ethidium Bromide: destruction and decontamination of solutions. **Analytical Biochemistry**, London, v. 162, p. 453-458, 1987.

MCGRAW-HILL DICTIONARY OF SCIENTIFIC AND TECHNICAL TERMS. 2003. Disponível em: <<http://www.answers.com/topic/ethidium-bromide>>. Acesso em: 06 abr. 2007.