



PRPG | Pré-Reitoria de Pós-Graduação
PIBIC/CNPq/UFPG-2009

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO NÃO-IONIZANTE SOBRE A *Escherichia coli*

Suellen Vieira Dias da Cruz¹, Marcelo Sampaio de Alencar², Fausy Solino Dias³

RESUMO

Este projeto teve como objetivo avaliar a influência da Radiação Não-Ionizante (RNI) sobre a curva-padrão de resistividade média da bactéria *E. coli*. Utilizou-se um sinal eletromagnético na frequência de 850 MHz para um estudo comparativo entre as cepas irradiadas e não-irradiadas nas diluições 1.3 e 1.4. Verificou-se uma descaracterização da curva-padrão de resistividade média nas cepas de *E. coli* submetidas à RNI, assim como valores superiores de resistividade, fato que pode ser atribuído ao aumento da alcalinidade do meio.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, Radiação Não-Ionizante

STUDY OF THE INFLUENCE OF NON-IONIZING RADIATION ON *Escherichia coli*

ABSTRACT

The objective of this project was to evaluate the influence of non-ionizing radiation (NIR) on the standard curve of average resistivity for the bacteria *E. coli*. An electromagnetic signal in the frequency of 850 MHz was used for a comparative study between the strains irradiated and non-irradiated in dilutions 1.3 and 1.4. A change of the standard curve of average resistivity in strains of *E. coli* submitted to the NIR was found, as well as higher values of resistivity, which can be attributed to the increased alkalinity of the environment.

Keywords: *Escherichia coli*, Non-Ionizing Radiation

INTRODUÇÃO

Há vários relatórios sobre respostas comportamentais e fisiológicas de animais de laboratório, inclusive roedores, cachorros e primatas não humanos. Há fenômenos térmicos relacionados com a radiação de microondas em frequências acima de 10 MHz. Respostas, tanto na termosensibilidade, como na termorregulação, são associadas com o hipotálamo e com receptores térmicos localizados na pele e nas partes internas do corpo (KHEIFETS ET al. 2002)

Um grande número de efeitos fisiológicos foi caracterizado em estudos com sistemas celulares e animais, em níveis de energia eletromagnética absorvida que causam elevações de temperatura corporal acima de 1 a 2 °C. (HYLAND, G. J., 2000). Esses efeitos incluem alterações em funções neurais e neuromusculares, aumentos de permeabilidade na barreira hematoencefálica, dano ocular, (opacidade da lente e anormalidades da córnea), mudanças no sistema imunológico associadas ao estresse, mudanças hematológicas, mudanças reprodutivas (redução na produção de esperma), teratogenia e mudanças na morfologia, no conteúdo de água e de eletrólito, e nas funções da membrana das células. Sob condições de

¹ Aluna de Curso de Medicina, CCBS, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: su_dias@hotmail.com

² Engenheiro Eletricista, Prof. Doutor, Centro de Engenharia Elétrica e Informática, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: malencar@dee.ufcg.edu.br

³ Engenheiro Eletricista, Doutorando, Centro de Engenharia Elétrica e Informática, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: fausydias@yahoo.com

exposição parcial do corpo a campos intensos, pode ocorrer um dano térmico significativo em tecidos sensíveis, tais como encontrados nos olhos e nos testículos (KHEIFETS ET al. 2002) .

O primeiro estudo dessa natureza realizado no Brasil, cujos resultados foram divulgados em agosto de 2000, foi conduzido pela Universidade Federal da Paraíba. Os pesquisadores concluíram que, entre as anomalias observadas nos ratos de laboratório expostos à radiação na frequência de 2,45 GHz, se destacam os efeitos sobre a fertilidade. Houve queda de 26% no nível de fertilidade das cobaias nascidas de pais e mães expostos à radiação. Verificaram ainda que, nas fêmeas, a radiação atrasa o amadurecimento dos óvulos e, nos machos, provocando um decréscimo significativo na produção de espermatozoides. O mesmo estudo concluiu que a exposição à RNI altera os níveis de aprendizado dos animais (LOPES, A.K.R, 2003).

Mais recentemente, tem havido interesse considerável nos possíveis efeitos carcinogênicos da exposição à intensidade de campo eletromagnético com frequências na faixa ocupada por sistemas de comunicação largamente utilizados, desde o serviço limitado (30 MHz), passando pelos serviços de radiodifusão (54 MHz a 108 MHz), serviços de radionavegação (108 MHz a 118 MHz) e móveis aeronáuticos (118 MHz a 136 MHz), chegando ao serviço móvel pessoal, o qual chama mais atenção. Os resultados de pesquisas nestas faixas de frequência foram sumariados pelo *International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection* (ICNIRP) (HYLAND, G. J., 2000). Há muitos relatórios sugerindo que a intensidade de campos eletromagnéticos não são mutagênicos e, portanto é improvável que a exposição a estes campos possa iniciar a carcinogênese. Em contraste, alguns relatórios recentes sugerem que a exposição de roedores a esses campos, em níveis de SAR na ordem de 1 W/kg , podem produzir rupturas no filamento de DNA de testículos e de tecidos do cérebro. Contudo, nos estudos realizados referentes a este tema, a comunidade científica mundial apontou algumas deficiências metodológicas, que poderiam ter afetado esses resultados, de forma significativa (ANATEL, 2007).

Em um amplo estudo com ratos expostos a microondas, por um período de até 25 meses, foi notado um maior número de efeitos malignos primários no grupo de ratos expostos, em comparação com os ratos do grupo de controle. Por outro lado, a incidência de tumores benignos não diferiu entre os dois grupos, e nenhum tipo específico de tumor prevaleceu mais no grupo exposto do que em ratos de controle, da mesma linhagem, mantidos igualmente livres de patógenos específicos. Os resultados deste estudo não podem ser interpretados como indicadores de um efeito iniciador de tumores devido a campos eletromagnéticos (LOPES, A.K.R, 2003).

Neste estudo comparativo foi avaliado o efeito da RNI sobre a curva-padrão de resistividade média das cepas contendo a *Escherichia coli*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Radiação Não-Ionizante(LabRNI) localizado no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Campina Grande – PB.

Materiais

Foram utilizados no LabRNI os seguintes materiais:

- Vidrarias (tubos de ensaio, béqueres, pipetas, baquetas, Erlemeyer);
- Estufa;
- Autoclave Phoenix;
- Banho-maria;
- Pipeta automática 50µl;
- Meio de cultura TSB⁴ e EMB⁵;
- Multímetro;
- Balança de precisão;
- Incinerador;
- Termômetro eletrônico;
- Termômetro a laser;

⁴TSB - Tripton Soja Caldo– usado para crescimento de bactérias em geral, inclusive pneumococos.

⁵ EMB – Eosina Azul de Metileno Agar - meio para isolamento e identificação de coliformes e outras enterobactérias. Permite diferenciar microrganismos que fermentam a lactose ou a sacarose, dos microrganismos não fermentadores. Os microrganismos lactose (+) e/ou sacarose (+) produzem colônias violeta escuro por acidificação do meio, que podem ser acompanhadas de um reflexo metálico. Os microrganismos não fermentadores produzem colônias incolores ou ligeiramente rosa. A presença de dois corantes inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas.

- Termômetro de bulbo;
- Extrator de amostra;
- Contador de colônias (UFC) Phoenix;
- Câmera fotográfica digital Cannon 5Mpixel;
- Luvas de procedimento, máscaras;
- Água destilada;
- Geladeiras;
- Estantes e suportes de tubo;
- Desinfetantes;
- Cepas controle L/B liofilizadas de *Escherichia coli* derivada ATCC 25922;
- Placas de Petri pequenas (20mℓ) e grandes (150mℓ)

Procedimento de preparação e utilização do TSB

Para garantir a existência de apenas a *E. Coli* nas cepas a se desenvolverem, utilizar-se da Técnica do Enriquecimento para preparar o meio de cultura com TSB, que é um meio para o não crescimento seletivo de outros microrganismos.

- Esteriliza-se um aparelho com volume de 1000 mℓ, além de outros auxiliares (pipeta, bastão, etc.);
- Calcula-se a massa do TSB para o volume desejado e, utilizando uma balança de precisão;
- A massa deve ser diluída em água destilada nova, de forma a solução torna-se visivelmente homogênea.
- Leva-se a solução à autoclave;
- Após retirá-lo da autoclave, fechar o recipiente com papel alumínio.

Procedimento para preparo do caldo de TSB:

- Coloca-se 10 mℓ do TSB em um tubo de ensaio;
- No mesmo tubo e utilizando uma pipeta automática, acrescenta-se 50 μℓ de solução contendo a cepas controle *E. coli*, realizando a homogeneização⁶;
- Preparam-se sete tubos de ensaio (sete matrizes para diluições);
- Os tubos devem ser fechados, enumerados e levados para a estufa a (37±1) °C por, no mínimo, 12 h, até o início da turvação⁷.

Procedimento de diluição

Inicialmente, sete tubos de ensaio com o preparado de TSB e *E. coli* foram denominados matrizes. Utilizou-se 100 μℓ da solução do tubo 1 (matriz) para o procedimento de diluição que se constituiu de:

- tubo 1.1 (100 μℓ da solução matriz + 9mℓ de soro fisiológico)
- tubo 1.2 (100 μℓ da solução 1.1 + 9mℓ de soro fisiológico)
- tubo 1.3 (100 μℓ da solução 1.2 + 9mℓ de soro fisiológico)
- tubo 1.4 (100 μℓ da solução 1.3 + 9mℓ de soro fisiológico)
- tubo 1.5 (100 μℓ da solução 1.4 + 9mℓ de soro fisiológico)
- tubo 1.6 (100 μℓ da solução 1.5 + 9mℓ de soro fisiológico)

Procedimento de preparação e utilização do EMB

Antes de iniciar o procedimento de semeadura das bactérias é necessário a preparação do meio de cultura EMB, específico para a *E. coli* gram negativa. Para isto, seguem-se as operações:

⁶ A homogeneização (homogeneização) é realizada com movimentos suaves em forma de oito (cerca de 20 vezes)

⁷ A escala de Mac Farland consiste na aferição indireta de uma suspensão bacteriana pelo seu grau de turvação (turbidimetria), ou melhor, pela capacidade de dispersão da luz. Na prática, é de uso corrente o emprego de uma escala visual de turvação obtida pela mistura de quantidades variáveis de uma solução de cloreto de bário a 1% e de ácido sulfúrico a 1%. Normalmente, considera-se que o tubo número 1 da escala de Mac Farland corresponda a uma amostra com 300.000 bactérias por mililitro.

- Esteriliza-se um aparelho de tenho volume de 1000 ml, além de outros auxiliares (pipeta, bastão, etc.);
- Calcula-se a massa para o volume desejado para semeadura (3,6g para cada 100ml de água destilada), utilizando-se uma balança de precisão,
- Colocar a solução na autoclave e quando atingida a temperatura de 120°C, deve-se esperar 15 minutos para desligar o aparelho;
- Após retirá-la da autoclave, deve-se fechar com papel alumínio e deixar em temperatura ambiente.

Técnica de semeadura em superfície

- Coloca-se o caldo do EMB na placa de Petri pequena, de forma a preencher toda a superfície (20 ml);
- 50 µl da amostra diluída devem ser colocadas na superfície do caldo, utilizando-se pipeta automática, sendo o espalhamento superficial;
- As placas de Petri devem ser fechadas, enumeradas e levadas para a estufa a (37±1) °C, sendo mantidas, por 10 horas, para desenvolvimento das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Medida da impedância das cepas

Para a realização desta medida foi utilizado um multímetro. As pontas do instrumento devem ser introduzidas na cepa, sendo realizadas medidas nas posições conforme a figura 1. Considerando primeiramente o eixo das ordenadas na figura, as três primeiras medidas são os pontos em vermelhos. A primeira medida são nos dois pontos mais externos caminhando para o centro da placa de Petri. Estes pontos estão equidistantes, sendo os dois mais externos na borda interna da placa. A distância entre os pontos é de 2,0 cm. A medida na abscissa segue o mesmo padrão anteriormente descrito para a ordenada. Deve-se considerar a média ponderada dos valores encontrados para abscissa e ordenada. Os pesos das médias são as distâncias entre os pontos de medida.

Esse procedimento foi repetido a cada hora, durante o intervalo de oito horas ininterruptas, para cada amostra (placa Petri com EMB + diluição específica). Com também a contagem visual das colônias.

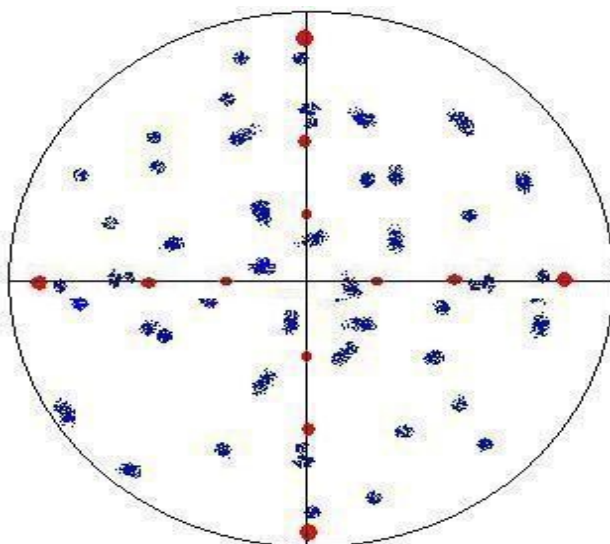


Figura 1: Esquema de medida da impedância nas cepas.

Irradiação das cepas de *E. coli*

Baseado no estudo prévio das amostras de *E. coli* não irradiadas foram selecionadas as diluições 1.3 e 1.4 para serem submetidas à RNI durante 10 horas na estufa. Foi introduzido na estufa um sinal eletromagnético na frequência de 850 MHz, por meio de uma antena bipolar, colocada a uma distância de 37 cm das placas Petri, sendo o posicionamento da antena perpendicular às cepas. Após as 10 horas, inicia-se o procedimento de medida de impedância como descrito acima e contagem visual das colônias da *E. coli*.

Expurgo das cepas utilizadas

A Incineração das Amostras foi realizada na fase final de cada ciclo de Contagem caracterizando-se por:

- Recolhimento das amostras da estufa após o término da fase de contagem;
- As Placas Petri de material plástico foram fechadas hermeticamente com esparadrapo e despezadas em lixo especial;
- As Placas Petri cujo material era vidro foram levadas ao Incinerador⁸
- No Incinerador as Placas de Petri foram submetidas a uma temperatura de 200°C por 2 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A observação da curva-padrão de resistividade média das cepas da bactéria E. coli, nas diluições 1.1 a 1.6, mostrou que as diluições 1.3 e 1.4 apresentavam um maior número de UFC por meio da contagem visual, assim como, maiores valores de resistividade média.

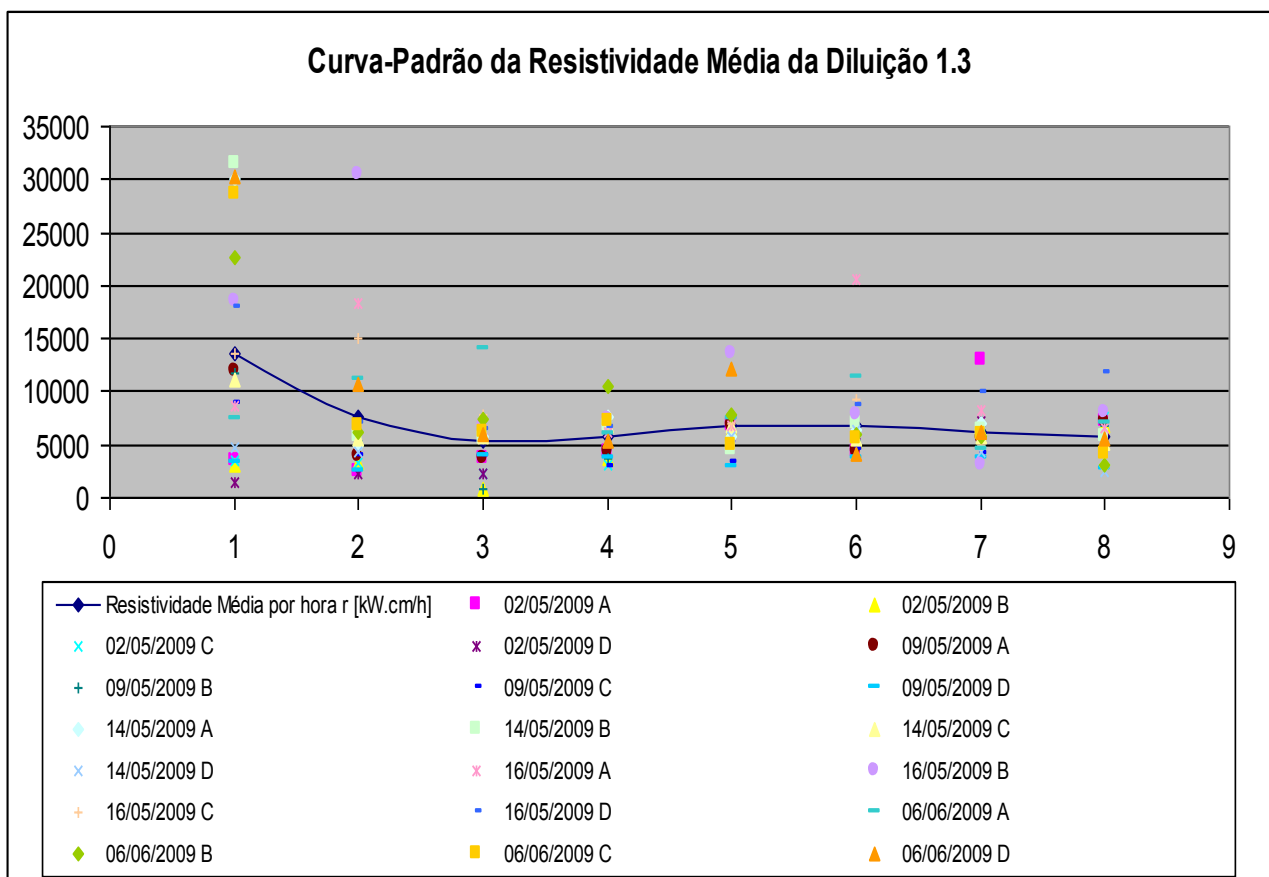


Gráfico 1: Curva-Padrão da Resistividade média da Diluição 1.3

⁸ Aparelho utilizado na para eliminação da bacteriana;

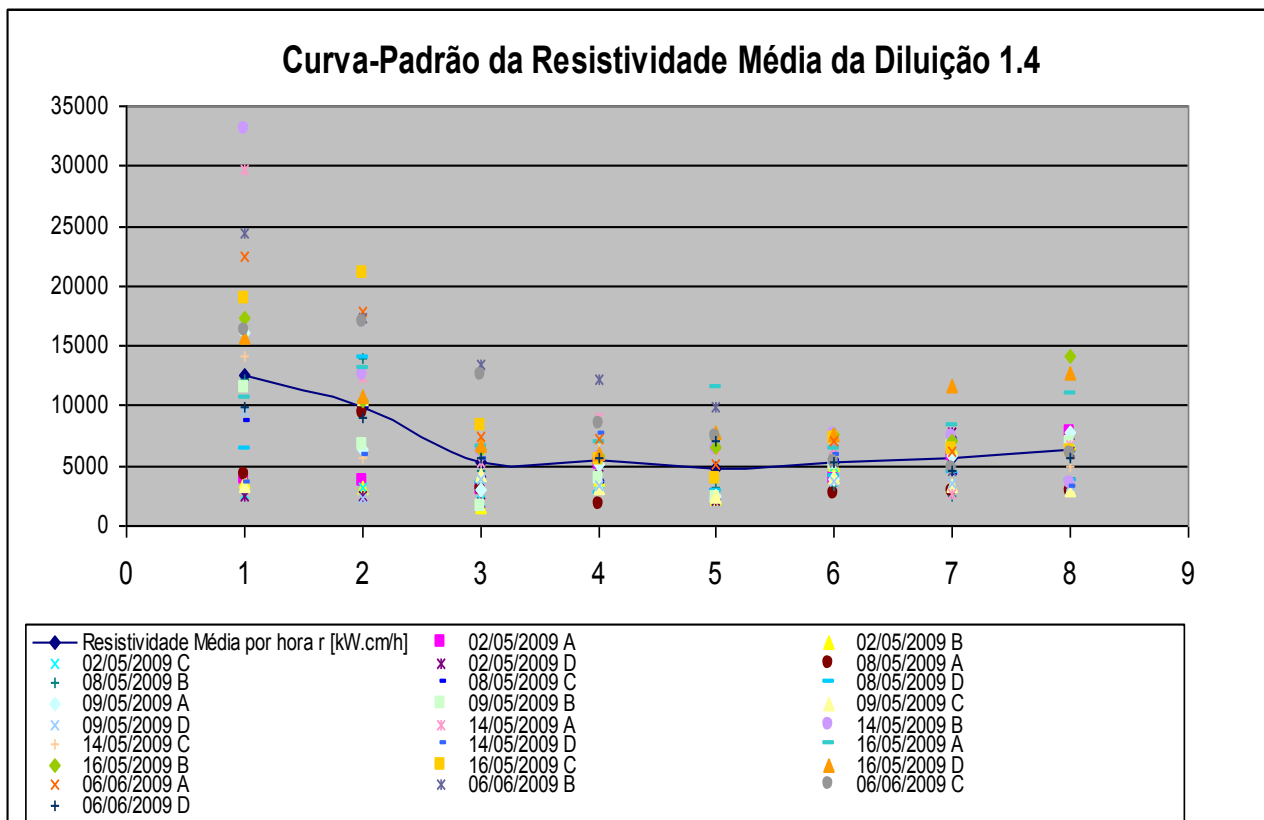


Gráfico 2: Curva-Padrão de Resistividade média da Diluição 1.4

Após a análise da curva-padrão de resistividade média das cepas de *E. coli* não-irradiadas, foi realizada as medidas nas cepas submetidas à 850MHz, conforme esquematizado nos gráficos 3 e 4.

Observou-se um aumento significativo da resistividade média na terceira hora (13 h após o cultivo das cepas) nas cepas submetidas à RNI. Fato inverso ao constatado nas cepas não-irradiadas, que apresentam menores valores de resistividade média nesse intervalo de tempo.

Essas alterações podem estar presentes devido à variação na alcalinidade do meio, influenciada pela RNI na frequência de 850MHz.

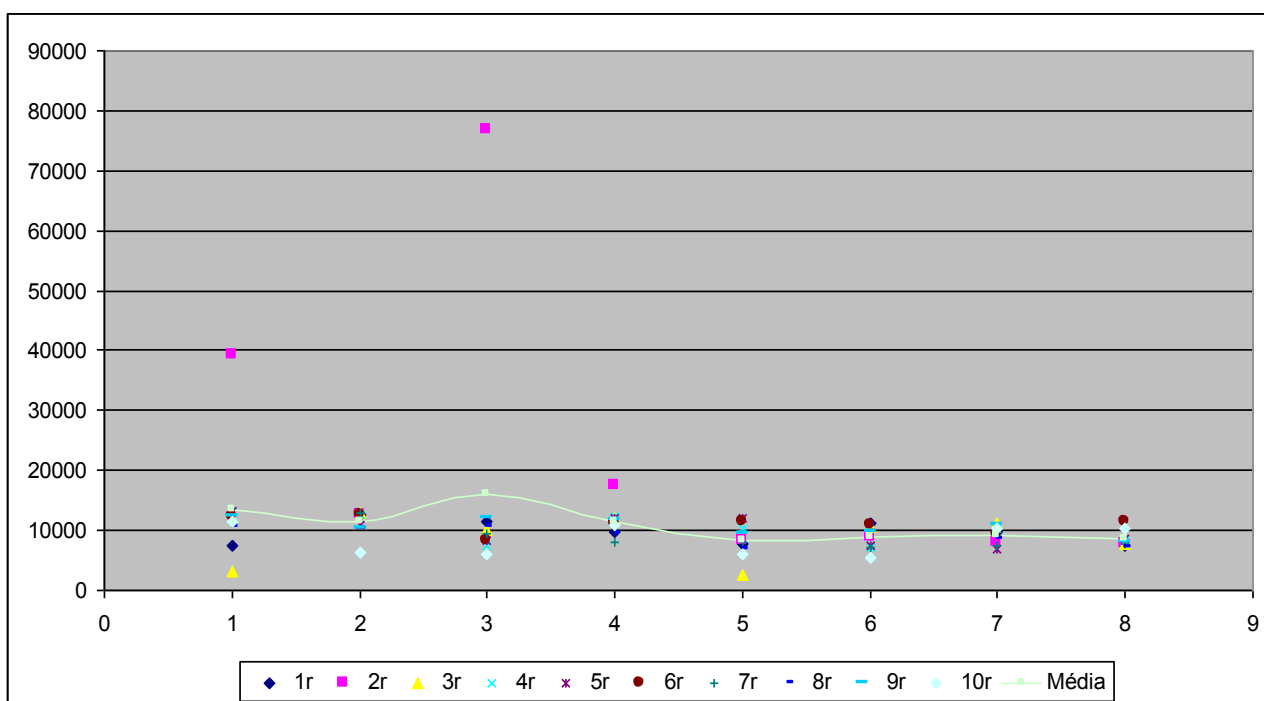


Gráfico 3: Resistividade Média/h da Diluição 1.3 submetida à RNI.

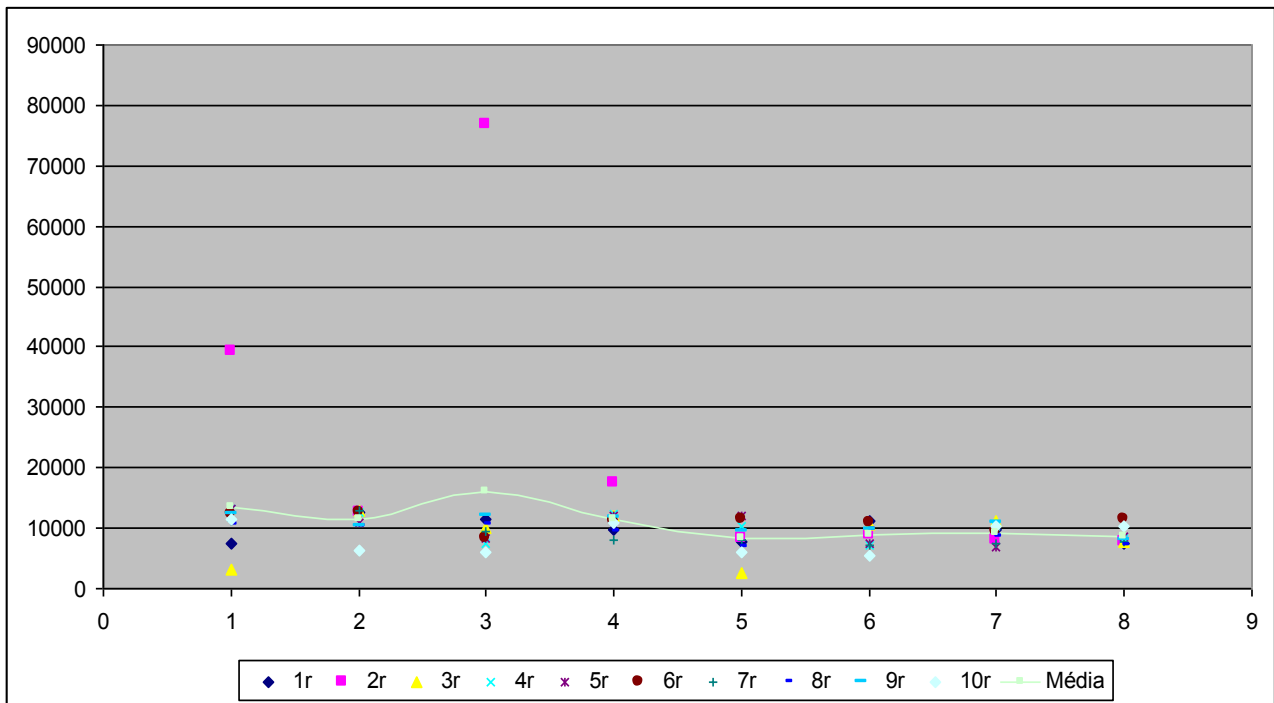


Gráfico 4: Curva-Padrão da Diluição 1.4 submetida à RNI

Ao realizar uma análise comparativa entre as cepas irradiadas e não-irradiadas na diluição 1.3, observou-se (Gráfico 5) uma queda exponencial na curva-padrão de resistividade média das cepas não-irradiadas até a 3ª hora, tendendo a estabilizar-se em 6000 kΩ.cm/h. Na curva-padrão de resistividade média das cepas irradiada, observa-se um aumento exponencial dos valores entre a 2ª e 3ª hora de medidas (12 e 13 horas após cultivo das cepas), quando ocorre um pico de 16973 kΩ.cm/h. Entre a 3ª e 4ª hora, ocorreu uma redução igualmente significativa. Após a 4ª hora, há uma tendência a estabilização da curva de resistividade média, contudo mantendo valores superiores as cepas não-irradiadas.

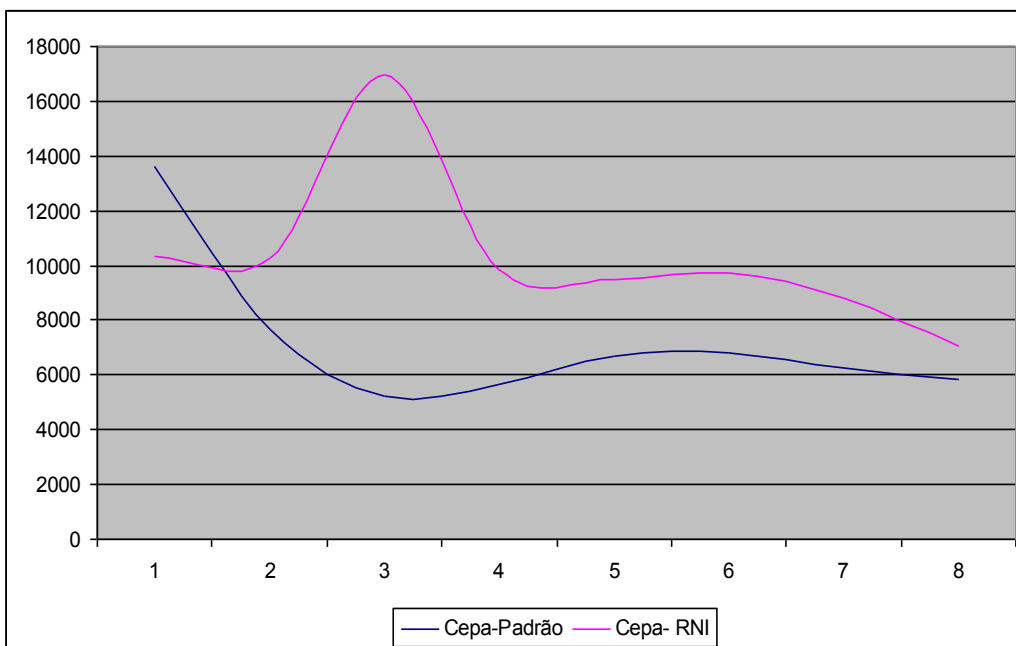


Gráfico 5: Resistividade média/h das cepas submetidas e não submetidas ao sinal eletromagnético na frequência de 850 MHz, na diluição 1.3

Para a diluição 1.4 observa-se, no Gráfico 6, que a curva-padrão de resistividade média das cepas irradiadas apresentou um crescimento exponencial até a 3ª hora (pico de 16000 kΩ.cm/h); e no intervalo entre a 3ª e a 5ª hora, uma redução exponencial nos valores de resistividade média. Mantendo sempre valores superiores aos das cepas não irradiadas.

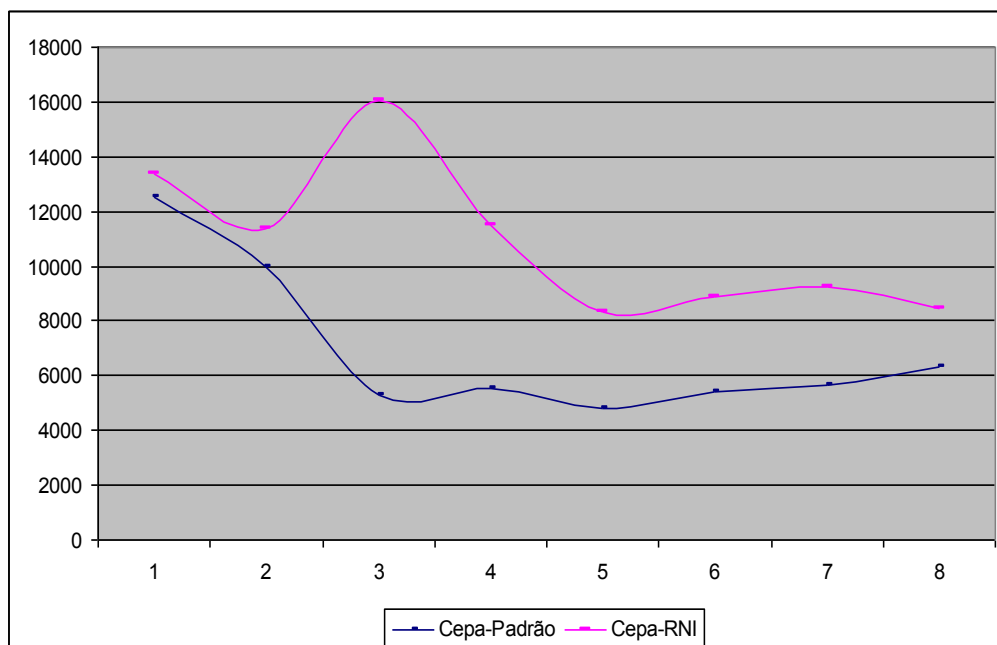


Gráfico 6: Resistividade média/h das cepas submetidas e não submetidas ao sinal eletromagnético na frequência de 850 MHz, na diluição 1.4

Na contagem visual das colônias das cepas submetidas ao sinal eletromagnético na frequência de 850 MHz irradiadas, nas diluições 1.3 e 1.4, não foi observado crescimento significativo quando comparadas às cepas não-irradiadas.

CONCLUSÃO

As curvas-padrões de resistividade média das cepas de *E. coli* submetidas ao sinal eletromagnético na frequência de 850 MHz, nas diluições 1.3 e 1.4, apresentaram um pico na 3ª hora descaracterizando a curva-padrão de resistividade média da *E. coli* para essas diluições, como também a curva-padrão das cepas irradiadas apresentou valores superiores. Este fato deve-se a variação da alcalinidade do meio de cultura, que sofreu influência da RNI.

Apesar das diluições serem diferentes, onde uma delas (diluição 1.4) encontra-se 100 vezes mais diluída que a 1.3, verifica-se uma curva-padrão de resistividade média semelhante tanto para as cepas irradiadas como para as não irradiadas.

Com relação à contagem visual das colônias, não se observou uma variação de crescimento significativo de UFCs⁹ da *E. coli* submetidas e não-submetidas à RNI, fato este que não pode ser atribuído à morte de bactérias, uma vez que não foi realizada a contagem eletrônica e análise bioquímica dessas amostras.

AGRADECIMENTOS

Ao Doutorando em Engenharia Elétrica Fausy Solino Dias, pelos ensinamentos teóricos sobre RNI e Cultivo de *E. coli* e pela colaboração na execução deste projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] KHEIFETS H.; LEEKA A.; REPACHOLI M; "ELF-EMF exposure and childhood leukemia", WHO, Geneva, Switzerland, 2002. vol.1, p.263.
- [2] HYLAND, G. J. Relatório sobre Telefones Celulares e Saúde – Impactos potenciais adversos da telefonia móvel sobre a saúde, Departamento de Física, Universidade de Warwick, Coventry – RU, 2000.p. 51-53.

⁹ UFCs: Unidades formadoras de colônia

- [3] LOPES, A.K.R.. Efeitos Comportamentais Decorrentes da Radiação de Microondas na Frequência de Operação Utilizada pelos Aparelhos Celulares. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Eletrica) - Universidade Federal de Campina Grande, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. 67f.
- [4] ANATEL. Agência Nacional de Telecomunicações. Regulamento sobre Limitação da Exposição a Campos Elétricos, Magnéticos e Eletromagnéticos na Faixa de Radiofrequências entre 9 kHz e 300 GHz. Anexo da Res. nº 303 de 2 de julho de 2002. Disponível em:: www.anatel.gov.br Acessado em dezembro de 2007.