
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO,
GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DE LODO DE ESGOTO
POR MEIO DOS SISTEMAS-TESTE *Allium cepa* E
*Tradescantia pallida***

GUILHERME THIAGO MAZIVIERO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Rio Claro, São Paulo
Fevereiro, 2011

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E
MUTAGÊNICO DE LODO DE ESGOTO POR MEIO DOS SISTEMAS-TESTE
Allium cepa E *Tradescantia pallida***

GUILHERME THIAGO MAZIVIERO

Orientadora: Prof^a. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Julio de Mesquita Filho”,
Campus de Rio Claro para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas
(Área de Concentração: Biologia
Celular e Molecular).

Rio Claro, São Paulo

Fevereiro, 2011

*À minha família, sempre presente nos momentos alegres e nas
situações difíceis.*

À José Arildo Maziviero.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Crhistofoletti, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela ajuda, atenção, paciência e contribuição à minha formação.

À Prof^a. Dra. Maria Aparecida Marin Morales pelas dicas e sugestões que contribuíram para o aprimoramento da Dissertação.

À Prof^a. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis que com muita paciência disponibilizou o Departamento de Bioquímica da UNESP para o armazenamento das amostras e forneceu material para a preparação das amostras.

Ao SAAE Atibaia, em especial ao Dorival, Flávio, Marcos e Margarete, pelo interesse na pesquisa e por aceitarem a parceria com o fornecimento das amostras e dados complementares, espero que este trabalho corresponda às expectativas.

À TODOS os integrantes do Laboratório de Mutagênese, que tornaram as horas de trabalho mais agradáveis, em especial à Cintya, Jana e Tati que me ajudaram desde o primeiro momento, auxiliando no decorrer da pesquisa, sempre com paciência, dedicação e bom humor.

Aos familiares, que sempre me apoiaram, incentivaram, motivaram em todas as horas e sem os quais não teria conseguido chegar onde estou hoje, desde antes da escolha da minha profissão, até minha formação atual. À vocês também devo desculpas pelo longo período de ausência.

À minha namorada, Ana Luiza, por estar sempre ao meu lado e me agüentar por todos esses anos, e pela compreensão com a falta de tempo, se mantendo sempre doce e gentil.

Aos integrantes da República Retiro dos [VeRmEs], por me aceitarem de volta ao lar.

À todos os meus amigos pelo apoio e paciência, peço desculpas pela falta de tempo, e mesmo assim se mantiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins durante todos esses anos. Suas companhias sempre me revigoraram nos momentos difíceis.

A todos vocês meu “MUITO OBRIGADO”!

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Aplicação de Lodo de Esgoto na Agricultura.....	8
3.2. A Resolução CONAMA 375 e Suas Determinações.....	10
3.2.1. “Metais Pesados” e Toxicidade	11
3.2.2. Poluentes Orgânicos.....	13
3.2.3. Testes Microbiológicos.....	14
3.3. Ensaio de Genotoxicidade com Vegetais Superiores.....	15
4. MATERIAL E MÉTODO	19
4.1. Caracterização do Local de Estudo.....	19
4.2. Coleta e análise das amostras	23
4.3. Ensaio citotóxico, genotóxico e mutagênico em <i>Allium cepa</i>.....	24
4.4. Ensaio mutagênico com <i>Tradescantia pallida</i> (TRAD-MCN).....	24
5. RESULTADOS	26
ARTIGO 1.....	27
ARTIGO 2.....	62

6. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

RESUMO

O lodo de esgoto pode conter substâncias tóxicas, estar contaminado com metais pesados e até mesmo por compostos químicos persistentes, sendo assim, a disposição inadequada desse resíduo pode fazer tais poluentes retornarem ao ambiente e, eventualmente, entrar na cadeia alimentar, caso sejam absorvidos pelas plantas. O conhecimento dos agentes químicos presentes no lodo permite avaliar o risco de contaminação alimentar e ambiental decorrente da utilização de lodos como fertilizantes agrícolas, também chamados de biossólidos. Logo, o presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial genotóxico, citotóxico e mutagênico do lodo gerado por uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), por meio dos sistemas-teste *Allium cepa* e *Tradescantia pallida*. As coletas foram realizadas em abril de 2009 e maio de 2010 e os organismos foram expostos ao lodo bruto e seu solubilizado. Quando comparados os resultados obtidos nos bioensaios com as análises físico-químicas, não é possível estabelecer relação de causa e efeito com nenhum composto em específico, uma vez que todos os parâmetros avaliados se encontram dentro dos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 375; no entanto, em ambos os organismos, o lodo apresentou-se genotóxico e mutagênico, alertando sobre a necessidade de cuidado na disponibilização deste tipo de resíduo em solos. Dessa forma é possível concluir que os ensaios de toxicidade genética são capazes de identificar os efeitos diretos do lodo de esgoto e poderiam ser contemplados pela legislação como ferramenta complementar à bateria de testes já estabelecida devido à simplicidade dos testes e custo relativamente reduzido. O trabalho traz ainda uma revisão de literatura sobre a utilização da espécie *Tradescantia*, suas bases e aplicações das técnicas do pêlo estaminal (Trad-SHM) e teste o do micronúcleo (Trad-MCN), apontando suas principais vantagens como ferramenta de monitoramento da qualidade ambiental.

Palavras-chave: ETE, aberrações cromossômicas, Trad-MCN, micronúcleo.

ABSTRACT

Sewage sludge can contain toxic substances, may be contaminated with heavy metals and persistent chemicals, so the improper disposal of this waste can return such pollutants to the environment and possibly return to the food chain if absorbed by plants. The knowledge of chemical agents present in the sludge can assess the risk of food contamination and environmental arising from the use of sludge as agricultural fertilizer, also called biosolids. Therefore, this study aimed to evaluate the potential genotoxic, cytotoxic and mutagenic of sludge generated from a Wastewater Treatment Plant (WTP) by the *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* tests-systems. Samples were collected in April 2009 and May 2010 and the organisms were exposed to raw sludge and its solubilized samples. Comparing the results obtained in bioassays with the physico-chemical properties, its cannot establish cause and effect relationship with any compound in particular, since all parameters are within limits set by CONAMA Resolution 375, however, in both organisms, the sludge showed genotoxic and mutagenic, and warns about caution in providing this type of waste in soils. Thus, we conclude that the genetic toxicity tests are able to identify the direct effects of sewage sludge and could be provided by the law as a complementary tool to the battery of tests previously established, due to the simplicity of the tests and relatively low cost. The work also contains a review on the use of *Tradescantia* species, their bases and applications of the techniques of stamen hair (Trad-SHM) and the micronucleus test (Trad-MCN), pointing out its advantages as a tool for monitoring of environmental health.

Keywords: WTP, chromosome aberrations, Trad-MCN, micronucleus.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento urbano acelerado, muitas vezes, é sinônimo de desenvolvimento econômico decorrente do avanço tecnológico e industrial. Entretanto, na maioria dos municípios brasileiros, a infra-estrutura no setor de saneamento não acompanha essa evolução no mesmo ritmo, tal fato tem gerado sérias preocupações, principalmente, referente ao destino final dos despejos domésticos e industriais (MORAES, 2000).

Com o desenvolvimento do sistema de saneamento básico no Brasil, a produção do lodo gerado nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) também cresce, principalmente no estado de São Paulo, onde se encontra a maior parte da população urbana do país. Embora o resíduo final represente em média 1% a 2% do volume total do esgoto tratado, seu gerenciamento é bastante complexo e demanda custos elevados (ANDREOLI et al., 2003).

Diante do exposto, é possível afirmar que o volume de lodo gerado em escala nacional representa um volume considerável, podendo conter substâncias tóxicas, metais pesados e compostos químicos persistentes, devendo ser corretamente tratado e disposto, de modo a minimizar impactos e reduzir passivos ambientais. Sendo assim, esse resíduo geralmente é destinado a aterros sanitários. No entanto, devido à elevada carga orgânica presente no lodo, algumas ETES vislumbram sua aplicação como insumo agrícola, como fertilizante e/ou condicionador de solo, contribuindo para o desenvolvimento das regiões onde se localizam, não apenas sob o ponto de vista ambiental, mas na geração de renda.

Dessa forma, o monitoramento da qualidade do lodo constitui ferramenta valiosa para determinação das condições de aplicabilidade desse resíduo. A Resolução CONAMA 375 de 2006, define os procedimentos, critérios e

requisitos para a disposição segura do lodo de esgoto em áreas agrícolas. Essa Resolução foi elaborada tomando como base legislações pré-existentes em outros países, mas atualmente se encontra em processo de revisão para adequação às demandas nacionais mediante estudos de caso elaborados em todo o território nacional.

O conhecimento dos agentes químicos presentes no lodo permite avaliar o risco de contaminação alimentar e ambiental. No Brasil, existem estudos de impacto ambiental de organismos patogênicos e poluentes inorgânicos presentes nos lodos, como metais pesados e nitratos, porém poucos dizem respeito aos efeitos genotóxicos e mutagênicos desse resíduo. Em outros países, efeitos adversos em sistemas biológicos, tais como genotoxicidade e carcinogenicidade, tem sido atribuído a metais pesados e a poluentes orgânicos presentes no lodo (PARAIBA et al., 2007; PARKPAIN et al., 2000; RODRIGUES et al., 1997; SINGH, AGRAWAL, 2008).

Os estudos de toxicidade genética com vegetais superiores fornecem informações importantes sobre os efeitos de poluentes sobre o DNA, mesmo quando expostos em curto prazo. Os testes de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade com plantas têm sido considerados mais simples e sensíveis, quando comparados aos bioensaios com animais, além disso, diversos estudos comprovam sua eficácia para o monitoramento da mutagenicidade causada por poluentes ambientais (RODRIGUES et al., 1997).

Neste sentido, para a realização do presente estudo, foi escolhido o município de Atibaia, pelo fato de possuir em sua ETE um efluente com característica predominantemente doméstica, além disso, conforme relato da administração do Saneamento Ambiental de Atibaia (SAAE-Atibaia), o lodo gerado na ETE Estoril consome grande parcela do orçamento da empresa. Sendo assim, os gestores da instituição buscam alternativas para a destinação do lodo gerado, com intenção de tratamento e disposição agrícola face à demanda da região, que possui grande tradição na produção de plantas ornamentais para abastecimento do mercado nacional e internacional. Dessa forma, o SAAE-Atibaia demonstrou interesse em estabelecer vínculos com instituições de ensino e pesquisa, de forma a obter informações relevantes acerca do lodo gerado, e assim, verificar a viabilidade de sua aplicação

agrícola. Isso demonstra a preocupação ambiental da empresa, que busca a excelência nos serviços prestados sempre aliada à sustentabilidade, buscando aproximação com a sociedade mediante projetos sócio-ambientais (SAAE, com. pes.).

Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar os possíveis danos do lodo gerado na ETE Municipal de Atibaia-SP, mediante a exposição dos sistemas-teste *Allium cepa* e *Tradescantia pallida* ao lodo de esgoto bruto e solubilizado.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo investigar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do lodo de esgoto de uma ETE do interior do Estado de São Paulo, mediante ensaio de micronúcleo com *Tradescantia pallida* (Trad-MCN) e os ensaios de micronúcleo e aberrações cromossômicas em células das regiões F₁ e meristemática em *Allium cepa*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em todo o mundo, acentua-se a preocupação do homem com o meio ambiente, pois com a evolução tecnológica e o crescimento industrial, continuam surgindo problemas ambientais que vêm atingindo a saúde humana (CARVALHO et al., 2000). A crescente demanda da sociedade pela manutenção e melhoria das condições ambientais tem exigido que autoridades, empresas públicas e privadas busquem compatibilizar o desenvolvimento econômico e as limitações da exploração dos recursos naturais (CAMARGO et al., 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define saneamento como “o controle de todos os fatores do meio físico do homem, que exercem efeito deletério sobre seu bem-estar físico, mental e social”. Saneamento também é definido como “o conjunto de ações que tendem a conservar e melhorar as condições do meio ambiente em benefício da saúde”. De acordo com essas definições e com o conceito de saúde, que é o estado de completo bem-estar físico, mental e social do indivíduo, e não apenas a ausência de doença, pode-se entender o saneamento como um conjunto de medidas de controle ambiental que tem por objetivo proteger a saúde humana. Sendo assim, os sistemas de tratamento e abastecimento de água; coleta, tratamento e disposição adequada de resíduos sólidos e esgotos sanitários; coleta e disposição de águas pluviais e controle de vetores e doenças transmissíveis são entendidos como os mecanismos do saneamento (DI BERNARDO, 2003).

O tratamento de esgotos sanitários normalmente é feito pela separação de sólidos sedimentáveis (tratamento primário) e conversão de sólidos dissolvidos e coloidais por processos biológicos (tratamento secundário) em metabólicos, apresentando como produtos finais: o efluente tratado, lodo com

grande carga orgânica do esgoto bruto original e gases que são lançados para a atmosfera em decorrência da atividade biológica do tratamento (DAVIS, 1989 apud DAMASCENO; CAMPOS, 1998). Atualmente, um problema ambiental muito sério, observado em regiões metropolitanas e em cidades de porte médio que implantaram sistemas de tratamento de esgoto sanitário é relativo ao destino dos lodos produzidos em suas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), que é bastante oneroso, podendo chegar a 50% do custo operacional. Para uma adequada solução desse problema é necessário, inicialmente, se conhecer a produção de lodo em função do sistema de tratamento empregado.

O lodo de esgoto apresenta-se tipicamente com 98% de água. Dos sólidos contidos, 70 a 80% são matéria orgânica, incluindo óleos e graxas (DAMASCENO; CAMPOS, 1998). A maior preocupação com esse lodo se restringe à estabilização de pH e secagem. Visando atingir um teor de sólidos no lodo entre 15% a 40%, para a sua retirada da ETE, a umidade é um parâmetro importante para a disposição final e depende, fundamentalmente, do tipo de estabilização utilizada (biológica anaeróbia ou aeróbia, ou química) e do tipo de equipamento de desaguamento empregado. Normalmente o lodo desaguado é destinado à um aterro sanitário, em área próxima a ETE, ou mesmo em lagoas de lodo, ou ainda em áreas agrícolas de maneira não controlada (TSUTIYA et al., 2001).

Quanto à qualidade dos lodos, além de sua composição química resultante da presença ou não de despejos industriais no esgoto tratado, e da qualidade bacteriológica, deve-se ter cuidado especial com o condicionamento do lodo para a desidratação. Na maioria das vezes, o condicionamento é feito por cloreto férrico com adição de cal, ou simplesmente com o uso de polímeros sintéticos, resultando em lodos com características bem distintas, e que poderá influir significativamente no seu destino final, particularmente quando se pensa em uso do lodo na agricultura.

Com o processo de estabilização adequado, a decomposição do lodo no solo produz agentes complexantes que facilitam a movimentação de fosfatos combinados com ferro e alumínio, além de permitir melhor aproveitamento dos nutrientes pelas plantas em decorrência da lenta liberação dos mesmos por meio do processo de mineralização da matéria orgânica. Esse aspecto

mereceu a atenção de agrônomos envolvidos em estudos de uso de lodo de esgoto na agricultura desde a década passada (TSUTIYA et al., 2001). Segundo Guedes (2005), a lenta decomposição do bio sólido e conseqüente mineralização dos nutrientes pode ser interessante sob a perspectiva da reciclagem dos nutrientes, pois permite uma sincronia entre liberação e absorção dos elementos pelas plantas, diminuindo as saídas do ecossistema devido à lixiviação (LIRA et al., 2008).

A aplicação de lodos na agricultura, no entanto, deve ser feita de maneira controlada, pois apesar de possuir características consideravelmente favoráveis ao seu reuso, não se deve esquecer que é um resíduo cuja origem é extremamente diversa, podendo conter inúmeras substâncias prejudiciais tanto ao meio ambiente quanto aos animais e ao próprio homem (SILVA et al., 2003). Dessa forma, torna-se necessário promover uma investigação das possibilidades de mercado existentes que possam viabilizar a utilização dos lodos como insumos, verificando a geração de benefícios tanto para as prestadoras de serviços de saneamento quanto para os demais produtores interessados em utilizar esses lodos (JANUÁRIO; FERREIRA FILHO, 2007), de modo que o uso desse resíduo na agricultura seja recomendado somente quando houver comprovado benefício agrônômico, sem qualquer prejuízo ambiental e com melhorias na qualidade e potencial produtivo dos solos agrícolas (BOEIRA et al., 2009).

O conhecimento dos agentes químicos presentes no lodo permite avaliar o risco de contaminação alimentar e ambiental decorrente da utilização de lodos como fertilizantes agrícolas, também chamados de bio sólidos. No Brasil, existem estudos de impacto ambiental de organismos patogênicos e poluentes inorgânicos presentes nos lodos, como metais pesados, ou gerados no solo após sua aplicação, como nitratos, porém existem poucos estudos sobre os compostos orgânicos poluentes encontrados. Em outros países, efeitos adversos em sistemas biológicos, tais como genotoxicidade e carcinogenicidade, tem sido atribuído a metais pesados e a poluentes orgânicos presentes no lodo (PARAIBA et al., 2007).

3.1. Aplicação de Lodo de Esgoto na Agricultura

Considerando-se a alternativa de utilização de lodo de esgoto sanitário na agricultura, Chenon et al. (2003), afirmam que o lodo de esgoto pode ser aproveitado como uma valiosa fonte de nutrientes e micronutrientes essenciais em solos pobres, podendo torná-los agricultáveis por promover o aumento da capacidade de retenção de água e melhor estruturação do solo pela presença de matéria orgânica. Porém, pode conter substâncias tóxicas, estar contaminado com metais pesados e até mesmo por compostos químicos persistentes, sendo assim, a disposição inadequada do lodo pode fazer tais poluentes retornarem ao ambiente e, eventualmente, entrar na cadeia alimentar, caso sejam absorvidos pelas plantas. Além disso, alguns compostos, que são menos absorvidos pelo solo, podem alcançar os aquíferos e contaminar águas subterrâneas.

Andrade (2004) ressalta que as características dos biossólidos influenciam diretamente em suas taxas de decomposição no solo. Atributos químicos dos biossólidos, como valores excessivamente elevados de pH, teores de metais pesados e sais solúveis conduzem a menores taxas de degradação dos resíduos. Segundo Guedes (2005), além das próprias características bioquímicas do biossólido, o efeito do tamanho das partículas e da área específica em contato com o solo, pode ser importante na taxa de decomposição do componente orgânico. Com a decomposição e incorporação do lodo ao solo, ao longo do tempo, o material remanescente passa a ter maior recalcitrância, por restarem os compostos de mais difícil decomposição (LIRA et al., 2008).

A exemplo dessa afirmativa, foram realizados estudos na Tailândia sobre a biodisponibilidade de metais provenientes de lodo de esgoto dispostos em solos agrícolas, a fim de determinar a mobilidade dos metais. Foi verificado que os solos avaliados continham pequenas quantidades de ácidos húmicos e fúlvicos, que desempenharam um importante papel na formação de complexos com íons metálicos. A presença de Ca^+ e Mg^+ contribuiu para reduzir significativamente a solubilidade do metal, através da precipitação e formação de compostos metálicos insolúveis. O estudo revelou ainda que a concentração dos metais aumentaram na mesma proporção da taxa de aplicação do lodo, e

os metais presentes tornaram-se imóveis com o passar do tempo (PARKPAIN et al., 2000).

De acordo com a revisão bibliográfica de Damasceno e Campos (1998), os riscos dos metais serem transportados na cadeia alimentar são mínimos, quando o pH do solo é superior a 6.5, porém pode causar problemas em solos com características ácidas, onde se enquadram, em sua maioria, os países de clima tropical, que apresentam solos com pH normalmente abaixo de 6.

Os estudos conduzidos com lodo de esgoto têm se restringido a poucas culturas e, pelo menos no Brasil, a maioria dos trabalhos com leguminosas de grãos, fixadoras de nitrogênio, como a soja, ainda se encontram em andamento. Estudos realizados no exterior, por exemplo, têm demonstrado que aplicação de lodo à cultura da soja aumenta tanto a fixação de N_2 quanto a sua nodulação. A EMBRAPA Meio Ambiente avaliou o efeito da aplicação do lodo de esgoto, como fonte de P, na cultura da soja, em substituição ao fertilizante fosfatado; os estudos demonstraram que a fertilização fosfatada na cultura da soja pode ser substituída por pequena dose de lodo de esgoto sem prejudicar o rendimento da cultura (VIEIRA; SILVA, 2004).

Ghini e Betiol (2004) constataram que após cinco anos de aplicação de lodo no plantio de milho ocorreu um aumento significativo da incidência de podridão do colmo, doença causada pelo fungo *Fusarium*, conforme aumento das doses dos bissólidos aplicados. Entretanto, quando os lodos foram aplicados na concentração recomendada, isto é, na dose para fornecer quantidade de nitrogênio semelhante ao tratamento com adubação mineral, foi baixa a ocorrência da doença, demonstrando a importância de se aplicar a quantidade adequada de lodo.

Um estudo realizado na ETE de Barueri-SP, uma das maiores estações de tratamento de esgoto da América Latina, comparou as concentrações de metais pesados presentes no lodo da estação com os limites estipulados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA). Os resultados mostraram que o lodo gerado na estação pode ser considerado de boa qualidade, podendo ser utilizado na agricultura. Tal utilização é interessante por contribuir para a minimização da disposição irregular de lodo no ambiente, a reciclagem de nutrientes, para a redução do uso de fertilizantes minerais e

também por fornecer matéria orgânica para o condicionamento físico do solo. O estudo revelou que a norma norte-americana estipula concentrações máximas de metais pesados para a disposição de lodo no solo e faz referências às quantidades máximas de aplicação anual (DAMASCENO; CAMPOS, 1998). Sendo assim, a USEPA considera que a utilização de resíduos urbanos na agricultura deve prever um monitoramento constante para evitar contaminação tanto no solo como no aquífero, principalmente quando o material contiver teores de um ou mais elementos tóxicos próximos aos limites máximos.

De acordo com Melo et al. (2010) os países desenvolvidos se utilizam da prática da disposição do lodo de esgoto em solos agrícolas, sendo que países como a França, Noruega, Espanha e Suíça chegam a dispor 50% do lodo de esgoto na agricultura, enquanto os Estados Unidos dispõe cerca de 33% do lodo que produz em área agrícola. Na Europa, em média 36% do lodo de esgoto é aplicado em área agrícola.

3.2. A Resolução CONAMA 375 e Suas Determinações

Em âmbito nacional, apenas em novembro de 2003, a Câmara Técnica de Saúde, Saneamento Ambiental e Gestão de Resíduos do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), em resposta a uma solicitação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), determinou que fosse formado um grupo de trabalho para elaborar uma Resolução regulamentando o uso agrícola de lodo de esgoto. O grupo de trabalho, formado por representantes de diferentes setores envolvidos com o tema, como companhias de saneamento, órgãos ambientais, instituições de pesquisa, entre outros, finalizou seus trabalhos em maio de 2005. Então, em 19 de agosto de 2006, foi criada a Resolução CONAMA nº 375, que regulamenta o uso agrícola de lodo de esgoto (PIRES, 2006). Logo, os estados podem elaborar ou continuar seguindo normas próprias, sendo estas mais restritivas que a norma federal, porém nunca mais permissivas.

No momento em que fora criada, os estudos de longo prazo em condições específicas do clima e dos solos brasileiros ainda eram incipientes para servirem como única base para o estabelecimento de uma norma nacional, e ainda há muito a ser estudado. Assim, a Resolução está alicerçada

nos resultados preliminares das pesquisas nacionais disponíveis até então, e também nas normas já estabelecidas de países como Estados Unidos, Austrália e outros países da Europa (COSCIONE et al., 2010).

No entanto, a publicação do CONAMA 375 representa um avanço para os geradores de lodo, pois viabiliza um meio de disposição adequado e seguro do resíduo, além de favorecer de sobremaneira a agricultura, como fonte de matéria orgânica e nutrientes e assegurar a qualidade ambiental e melhoria da saúde pública.

As regulamentações existentes no Brasil se encontram em estágio inicial, devendo ser revisadas de acordo com o avanço do conhecimento sobre o tema. A norma federal, assim como outras normas internacionais, estabelece que as áreas em que o lodo de esgoto será aplicado também deverão ser controladas, ou seja, é exigido um monitoramento das mesmas. O gerador do resíduo, no caso as ETEs, deverá ser capaz de identificar qual lote de lodo de esgoto foi aplicado em qual área agrícola. Dessa maneira, tem-se maior controle do uso do resíduo, facilitando, inclusive, a identificação de falhas na aplicação e/ou avaliação da qualidade do biossólido utilizado (PIRES, 2006).

Neste contexto, a fim de permitir o aprimoramento da regulamentação a partir do conhecimento científico e do desenvolvimento tecnológico atingidos, na própria Resolução foi prevista sua revisão para sete anos após a data da sua publicação. Após três anos da criação da Resolução, surge a primeira reunião dos pesquisadores atuantes nesse tema, um Workshop sediado no Instituto Agrônomo de Campinas apresentou os estudos de caso da realidade dos geradores de lodo e deu o direcionamento para as pesquisas em tempo de serem realizadas antes da revisão da norma. Como resultado dessa reunião, Coscione e colaboradores editaram o livro *“Uso agrícola de lodo de esgoto: Avaliação após a resolução nº375 do CONAMA”*, publicado em 2010, que traz o registro das palestras e discussões realizadas durante o evento e a compilação dos estudos realizados, até então, em diversas regiões do país.

3.2.1. “Metais Pesados” e Toxicidade

Ao longo de 60 anos ou mais, o termo “metal pesado” tem sido utilizado em química, mas a este termo foram dadas várias definições por diferentes

autores, sem um consenso a este respeito. De maneira geral os “metais pesados” são definidos como elementos metálicos com alto peso atômico. Holleman e Wiberg (1985) definem metal pesado como um elemento cujo peso específico é superior a 5 g/cm^3 . Existem pelo menos 40 elementos que compõem essa categoria.

Uma publicação da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC)-(2002), descreve que o termo “metal pesado” muitas vezes vem sendo usado para nomear um grupo de metais e metalóides que são associados à contaminação e potencialidade tóxica ou ecotóxica. Para a IUPAC o termo metal se refere ao elemento puro, que possui propriedades físicas e químicas bem características, e não dos seus compostos, cujas propriedades físicas, químicas, biológicas e toxicológicas são muitas vezes diferentes (SANTANA, 2008). O termo elemento-traço é preferido por alguns pesquisadores, devido ao fato desses metais se encontrarem em baixas concentrações no ambiente, geralmente em sua forma mais estável (ZENK, 1996). No entanto, na definição da Resolução CONAMA 375, que estabelece as premissas para a disposição agrícola de lodo de esgoto, foi utilizado o termo metal pesado.

Alguns metais são necessários para o desenvolvimento dos organismos, estes metais são conhecidos como micronutrientes ou metais essenciais, dentre eles pode se citar o cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe), níquel (Ni), cobalto (Co), cromo (Cr), selênio (Se), entre outros. A outros metais como o cádmio (Cd), alumínio (Al), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) não é atribuída qualquer função biológica, sendo então denominados de metais não essenciais. Contudo, tanto os micronutrientes quanto os não essenciais, tornam-se tóxicos para os organismos em determinadas concentrações (GADD, 1993).

Os metais presentes no lodo de esgoto podem ser provenientes de rejeitos domésticos e águas residuárias de lavagem, que são coletados e transportados por tubulações metálicas, águas pluviais que podem carrear metais dispersos na atmosfera e, principalmente, por efluentes industriais, que contribuem com tipos específicos de cátions de acordo com a atividade industrial (FERREIRA; ANDREOLI, 1999).

A concentração de metais no lodo é muitas vezes significativa. Dentre os elementos que oferecem maior perigo estão o cádmio (Cd), cobre (Cu), molibdênio (Mo), níquel (Ni) e zinco (Zn). Estima-se que do volume de esgoto que entra na estação, 1% corresponde ao volume de lodo produzido, e este por sua vez, retém entre 50 e 80% da quantidade de metais presente no efluente, e tem sua disponibilidade influenciada por reações como adsorção, complexação, precipitação, oxidação e redução (LESTER et al., 1983 apud DAMASCENO; CAMPOS, 1998).

Os limites para metais em lodo de esgoto com a finalidade de regulamentar sua aplicação na agricultura constituem uma forma de proteger o ambiente e a saúde do homem contra a disposição indiscriminada desse resíduo no solo, ao mesmo tempo em que estimula os geradores a produzirem um lodo de esgoto de melhor qualidade, que possa ser usado na agricultura com o menor risco possível. A concentração de metais no lodo de esgoto é um dos fatores que vai determinar a viabilidade de sua aplicação na agricultura e por quanto tempo o mesmo poderá ser aplicado até que a concentração dos mesmos no solo atinja um potencial elevado de risco para o ambiente e para a saúde humana (MELO et al., 2010).

A Resolução CONAMA 375 contempla 11 metais para avaliação no lodo de esgoto, determinando a concentração máxima para aplicação e o acúmulo máximo em determinada área de aplicação.

3.2.2. Poluentes Orgânicos

Talvez o maior entrave para a difusão da aplicação agrícola do lodo de esgoto esteja relacionado ao monitoramento de substâncias orgânicas presentes no lodo, uma vez que não existem limites estabelecidos para as 34 substâncias contempladas na Resolução, as quais requerem metodologias de análise bastante sofisticadas e de custo elevado, e assim, não apresenta um objetivo específico, somente a caracterização dos lodos para os diferentes tipos de tratamento empregados, sendo mais oportuno um levantamento em escala nacional (SAMPAIO, 2010). Nesse contexto, a legislação norte americana, regulamentada pela *Environmental Protection Agency* (USEPA), se utiliza da análise de risco por meio dos níveis críticos para classificação de

solos contaminados (SSL – *Superfund Soil Screening Levels*), com o intuito de aprimorar o conhecimento dos compostos presentes no lodo (HAY, 2010).

Um estudo realizado por Kinney et al. (2006) utilizando lodos de nove localidades, indicam que esteróides, metabólicos de detergentes e compostos de fragrância representam 90% da carga de poluentes orgânicos do lodo, independentemente de sua origem, enquanto a maioria dos poluentes industriais tradicionais que constam na lista prioritária da EPA são raramente detectados. Os mesmos autores afirmam ainda que a quantidade de contaminantes presentes no lodo pode sofrer variações em longo prazo, mas são relativamente uniformes em um curto intervalo de tempo.

Tomando este fato como exemplo, é bastante provável que os compostos presentes nos lodos das ETEs norte americanas tenham composição completamente diferente dos lodos existentes no Brasil, tornando-se necessário uma reavaliação da lista de poluentes orgânicos estabelecida pela resolução CONAMA 375, que atualmente se baseia nos mesmos compostos estabelecidos pela legislação norte americana.

3.2.3. Testes Microbiológicos

Dependendo do processo de tratamento de esgoto e do agente patogênico nele presente, é possível afirmar que o lodo resultante desse processo contém grande risco epidemiológico, uma vez que os animais domésticos e seres humanos podem ser parasitados por diferentes agentes patogênicos como *Salmonella* e ovos de *Ascaris* por exemplo. Logo, o lodo deve ser estabilizado de modo a assegurar sua qualidade sanitária para disposição final. Sendo assim, alguns países adotam como limites de segurança para a disposição do lodo na agricultura, a presença de ovos viáveis de helmintos, na França, por exemplo, ovos de nematóides são utilizados como indicadores de resistência aos processos de tratamento. Nos EUA, as normas são fundamentadas no uso de ovos de *Ascaris lumbricóides* como controle e manutenção em estufa por um período de quatro semanas para avaliação dos resultados de viabilidade, sendo um critério aceito também em grande parte da Europa (SOCCOL et al., 2010).

O CONAMA 375 define que o lodo de Classe A deve apresentar menos de 10^3 NMP (número mais provável) de coliformes termotolerantes, menos que 0,25 ovos viáveis de helmintos em 10 g de sólidos totais (ST), ausência de *Salmonella* em 10 g e vírus em quantidade inferior a 0,25 por unidade formadora de foco por grama de ST. Caso contrário o lodo é caracterizado como Classe B e tem sua aplicação mais restrita.

Esses valores vêm sendo muito questionados por diversos grupos de estudo, pois apresentam discordância aos padrões estabelecidos por todas as legislações existentes no mundo para lodos de Classe B, sendo fixada em 10 ovos de helmintos/g de ST, sem qualquer estudo preliminar. Vale lembrar que os pesquisadores não excluem a necessidade do monitoramento biológico do lodo, porém atentam para a imposição de limites, os quais não possuem justificativa técnica (SAMPAIO, 2010).

3.3. Ensaios de Genotoxicidade com Vegetais Superiores

A utilização de vegetais superiores é uma técnica pertinente para o monitoramento ambiental por apresentar grande sensibilidade, baixo custo e fácil manuseio. O biomonitoramento permite a detecção qualitativa dos efeitos de misturas complexas, mesmo para compostos em baixas concentrações. Essa técnica vem sendo empregada em vários estudos, indicando grande confiabilidade nos resultados, fato que auxilia nas tomadas de decisões quanto ao tratamento e disposição adequada do resíduo gerado (RODRIGUES, 1999).

Testes biológicos são indispensáveis para a avaliação de reações de organismos vivos à poluição ambiental (MORAES et al., 2003, apud SOUZA et al., 2006). Muitos tipos de organismos são utilizados em testes de mutagenicidade para avaliar os possíveis efeitos de substâncias antropogênicas ou substâncias naturalmente presentes no meio ambiente.

Segundo Mielli (2008) a escolha do organismo depende do objetivo do estudo, da disponibilidade de organismos e que possam ser comparáveis aos seres humanos e métodos validados. As plantas, por exemplo, apesar das suas diferenças estruturais e metabólicas, podem oferecer informações importantes sobre o potencial genotóxico e mutagênico de substâncias e

oferece algumas vantagens como cultivo de baixo custo e fácil manutenção, comparativamente, a roedores por exemplo.

Algumas espécies de vegetais são amplamente empregadas para avaliação de genotoxicidade de agentes químicos, devido às boas características de seus cromossomos, que permitem, além da investigação do potencial genotóxico, a avaliação dos mecanismos de ação dos agentes testados (MARIN-MORALES et al., 2008). Além disso, certas plantas possuem o ciclo de vida curto podendo indicar efeitos de poluentes em curto período de exposição (de horas a poucos dias). Plantas, particularmente *Allium cepa* (cebola), *Tradescantia* e *Vicia faba*, têm sido utilizados para avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de águas e amostras atmosféricas (WHITE, CLAXTON, 2004).

Kovalchuk et al. (1998) afirmam que o ensaio de aberrações cromossômicas (AC) com *A. cepa*, pode ser utilizado como ferramenta para quantificação e monitoramento de alterações genéticas em solos radioativamente contaminados. Além disso, o ensaio de AC em cebola foi o primeiro dos nove sistemas vegetais aceitos no Programa Genotóxico da USEPA e é amplamente utilizado para monitoramento de águas residuárias. Tal sensibilidade é atribuída por MA et al. (1995), devido ao grande tamanho dos cromossomos e por estes, serem metacêntricos em sua maioria.

Dentre os vegetais superiores, a cebola é o vegetal mais utilizado na determinação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de inúmeras substâncias. Sua característica de cinética celular propicia rápido crescimento das raízes, justamente pelo grande número de células em divisão. Além disso, espécies do gênero *Allium* possuem grande tolerância a diversas condições de cultivo, estão disponíveis o ano todo, apresentam fácil manuseio e possuem poucos cromossomos ($2n = 16$). Sendo assim, o registro da atividade mitótica e de anormalidades no ciclo celular das células meristemáticas de suas raízes podem ser facilmente visualizadas (GRANT, 1994).

Após analisarem o efeito de amostras de lodo de esgoto sobre células meristemáticas de *A. cepa* pelo ensaio de micronúcleo e outras alterações cromossômicas durante a anáfase, Grover e Satwinderjeet (1999) sugerem que tais protocolos possam ser realizados de forma simples como indicadores de

genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade (GROVER; SATWINDERJEET, 1999 *apud* MIELLI, 2008). Da mesma forma, Leme e Marin-Morales (2009) afirmam que o teste de *A. cepa* é uma técnica rápida e sensível para detectar substâncias genotóxicas e mutagênicas dispersas no ambiente. Além disso, permite avaliar vários parâmetros genéticos, bem como os mecanismos de ação dos agentes testados no DNA dos organismos expostos.

Uma das limitações do uso de plantas como indicadores é a falta de sensibilidade para certas classes de pró-mutágenos como as nitrosaminas, aminas, heterocíclicas, e algumas classes de HPAs (MAJER et al., 2005). No entanto, os vegetais superiores são descritos como os sistemas-teste mais indicados para avaliação de mutagenicidade em amostras ambientais. Embora um grande número de bioensaios esteja estabelecido para determinação de genotoxicidade aos agentes em laboratório, poucos são capazes de serem executados *in loco* (MA et al., 1996). Nesse aspecto, espécies de *Tradescantia*, são especialmente indicadas para aplicação direta em regiões e países em desenvolvimento, devido às vantagens como fácil manuseio e custo de manutenção relativamente baixo (SHIMA et al., 1997).

A *Tradescantia pallida*, também conhecida como coração roxo, é uma planta que apresenta fácil adaptação em qualquer ambiente e pode se desenvolver durante todo o ano, tanto ao ar livre, nas regiões subtropicais, quanto em estufas, em qualquer parte do mundo. O tamanho da planta, relativamente pequeno, e o material genético composto por seis pares de cromossomos relativamente grandes, tornaram essa planta um instrumento favorável para estudos citogenéticos (CARVALHO, 2005). As espécies diplóides possuem 24 cromossomos metacêntricos em sua maioria; as inflorescências produzidas se desenvolvem em sequência, permitindo exposição ao agente em todos os estágios de desenvolvimento (SAVAGE, PAPWORTH, 1998). Trata-se de um sistema bastante conhecido para avaliação de efeitos em radiologia, compostos químicos, poluição atmosférica, água e solo (MA et al., 1996).

Grant (1994) cita ainda outras vantagens no emprego de vegetais superiores:

- Vegetais superiores são eucariotos, sendo assim, sua estrutura e organização celular é similar à de seres humanos, sendo possível estabelecer comparações com animais.
- As técnicas empregadas para estudo são relativamente simples, podendo ser realizadas com agilidade. O cultivo dos organismos possui baixo custo e fácil manutenção.
- Os ensaios podem ser conduzidos sob um vasto espectro de condições ambientais, pH e temperatura. Vegetais superiores podem se regenerar com facilidade.
- Ensaios com vegetais superiores podem ser utilizados para avaliar potencial genotóxico de substâncias simples até misturas complexas.
- Pode ser utilizado para monitoramento *in situ*.
- Podem ser utilizados em monitoramento por vários anos e são altamente confiáveis. Estudos têm mostrado correlações com ensaios citogenéticos em mamíferos.
- Podem ser utilizados em conjunto com ensaios microbianos para detecção de metabólitos mutagênicos (pró-mutágenos).
- Estudos de genotoxicidade com vegetais vêm apresentando grande sensibilidade em testes com agentes carcinogênicos.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Caracterização do Local de Estudo

A Estância Turística de Atibaia está localizada na região bragantina, 65 km a norte da cidade de São Paulo. Situada à margem da Rodovia Dom Pedro I e Fernão Dias (BR-381), seu território compreende 491 Km², com limite geográfico em divisa com os municípios de Bragança Paulista a norte, Franco da Rocha e Mairiporã a sul, Piracaia e Bom Jesus dos Perdões a leste e a oeste com Jarinu e Campo Limpo Paulista (ATIBAIA, 2009).

De acordo com o censo 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Atibaia possui 126.614 habitantes, cuja distribuição é predominantemente urbana. A zona rural do município ocupa uma área de 299 Km², no setor agrícola; Atibaia destaca-se na produção de flores, frutas (principalmente morango), cogumelos tipo exportação e mercado nacional. A cidade abriga 480 indústrias nas áreas de produção e prestação de serviço.

A região possui clima tropical de altitude, com período de seca durante o inverno, temperatura média anual de 19°C, umidade relativa de 80% e índice pluviométrico de 1.500 mm ao ano. O município encontra-se em uma região serrana (cerca de 8% do município), com picos de até 1.450 metros de altitude, tornando facilitada a circulação dos ventos dominantes, mantendo o ar sempre limpo. Tais características levaram a região ser eleita pela UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization) como o segundo melhor clima do mundo, superada apenas pela Suíça (ATIBAIA, 2009).

A bacia do Rio Atibaia tem grande importância para a região; é represada na cabeceira para abastecer o sistema Cantareira (Fonte de água para a Região Metropolitana de São Paulo) e parte do município de Campinas. É pertencente à bacia dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí (PCJ) (Figura 1),

que compõem a quinta unidade de gerenciamento hídrico (UGRHI-5) (Figura 2) do Estado de São Paulo.



Figura 1 - Localização da Bacia PCJ. Fonte: Comitê PCJ (2011)

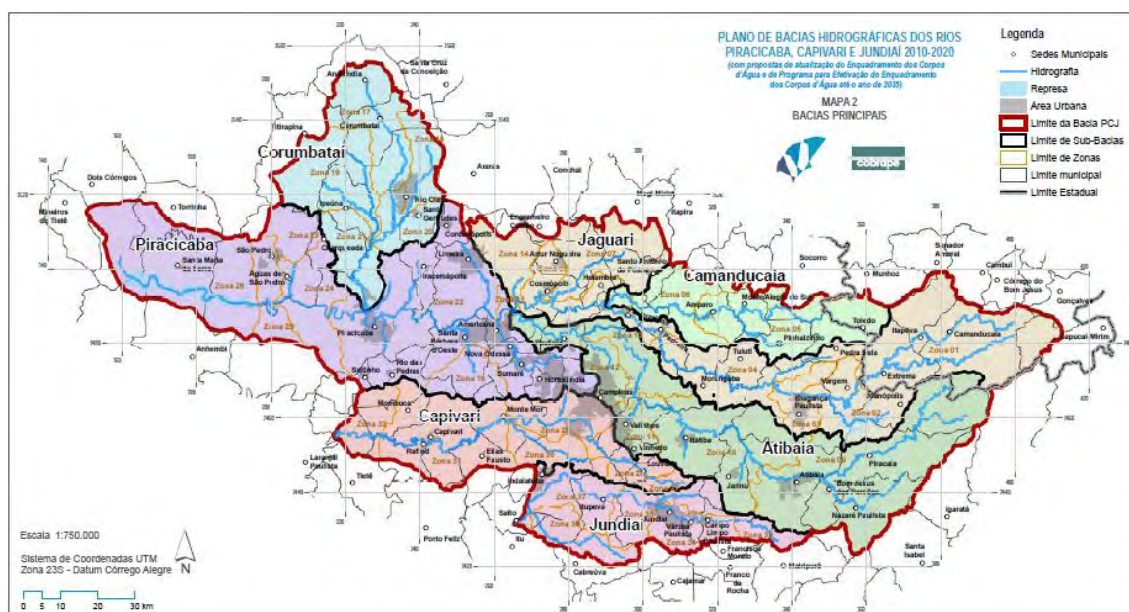


Figura 2 – Bacia PCJ e suas sub-bacias. Fonte: Comitê PCJ (2011)

O Rio Atibaia é formado pela junção dos rios Atibainha e Cachoeira. Nasce na cidade de Atibaia (Figura 3), avança pelas regiões das cidades de Campinas e Paulínia, deságua na represa de Americana, onde se junta ao Rio Jaguari, formando o Rio Piracicaba (SILVA; JARDIM, 2006).



Figura 3 – Mapa da sub-bacia do Rio Atibaia e a localização do município de Atibaia.
Fonte: Comitê PCJ (2011)

A empresa responsável pelo tratamento e abastecimento de água e esgoto no município é o SAAE Atibaia - Saneamento Ambiental de Atibaia – autarquia com autonomia econômica, financeira e administrativa, que se utiliza dos mananciais de uma mina da Serra do Itapetinga, do Rio Atibaia, e Córrego do Onofre para servir água tratada a 85.3% da população, e conta com a coleta de 57.79% do esgoto do município; o tratamento de 29.27% do esgoto é feito pela ETE Estoril (Figura 4), com vazão média de operação de 90 L/s (MORIYAMA, 2008).



Figura 4 - ETE Estoril, Atibaia-SP. A: vista geral da estação; B: chegada do esgoto; C: fase de aerção; D: fase de flotação/decantação; E: decantador de lodo; F: centrífuga desaguadora de lodo; G: chegada do lodo desaguado; H: lodo de esgoto desaguado.

A ETE Estoril conta com o processo de tratamento por batelada e o lodo gerado é desaguado por centrífuga, conferindo ao mesmo teor de sólidos de aproximadamente 20%. De acordo com Campos (1999), dependendo do sistema de tratamento, das condições de estabilidade e das condições operacionais, o lodo produzido pode apresentar bom grau de estabilização, desde que com adequado período de permanência do lodo na estação. Para a produção de lodo por batelada, o lodo produzido é uma mistura de material bastante estabilizado em avançado nível de maturação, com sedimentos orgânicos mais frescos, recentemente depositados e pouco estabilizados. O esgoto da ETE Estoril possui característica predominantemente doméstica, sendo desprezível a contribuição industrial; atualmente, a instituição realiza a revisão do Plano Diretor de Esgoto para a instalação de novas unidades de tratamento para melhor atender a cidade (SAAE, 2009).

4.2. Coleta e análise das amostras

As coletas do lodo de esgoto foram realizadas em abril de 2009 e maio de 2010 de acordo com os procedimentos estabelecidos pela ABNT-NBR 10007 (2004)- Procedimentos para Amostragem de Resíduos. O resíduo foi acondicionado em containers de plástico, com capacidade de 9L e armazenados em câmara fria, à 4°C até o início dos experimentos.

A solubilização das amostras seguiu a norma ABNT-NBR 10006 (1987)- Solubilização de Resíduos. Pesou-se 250 gramas de lodo (base seca) adicionado a 1 litro de água destilada sob agitação mecânica por 5 minutos. Após esse período a solução foi deixada em repouso por sete dias, em seguida filtrou-se a fase líquida em membrana com porosidade de 0,45 µm para obtenção do solubilizado.

A determinação dos parâmetros físico-químicos da amostra referente aos dados de macro e micronutrientes, teor de matéria orgânica, pH e metais pesados foi realizada por laboratórios credenciados (ICASA e GRANDIS). As amostras foram enviadas para análise no dia seguinte à coleta.

4.3. Ensaio citotóxico, genotóxico e mutagênico em *Allium cepa*

Para o teste com *A. cepa*, cerca de 100 sementes foram dispostas sobre a amostra desejada em placas de Petri e levadas para germinar em câmara BOD. Quando as raízes atingiram aproximadamente 1.5 cm de comprimento, foram fixadas em Carnoy I (álcool etílico e ácido acético 3:1) por 24 horas.

O bioensaio em sementes do sistema-teste *A. cepa* foi executado em tratamento contínuo seguindo-se o protocolo sugerido por Willian F. Grant (1982), validado pelo *Gene-Tox Program of USEPA*. Foram realizados tratamentos das sementes com o lodo bruto e solubilizado; o controle negativo foi feito com água destilada e os positivos com o herbicida Trifluralina à concentração de 0.84 ppm (FERNANDES et al., 2007) e metilmetano sulfonato (MMS) à 0,127 µL.

O potencial citotóxico foi avaliado por meio do cálculo do índice mitótico (IM) e pela presença de células em processo de morte celular (MC). O potencial genotóxico foi avaliado por meio da contagem de anormalidades mitóticas e cromossômicas: anáfases multipolares, C-metáfases, células poliplóides, aderências, perdas, quebras e pontes cromossômicas. Micronúcleos (MN) e quebra cromossômica (QC) foram quantificados para a avaliação da atividade mutagênica dos tratamentos. Foram contabilizadas 5.000 células, sendo 500 células em dez lâminas por tratamento. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi realizada por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

4.4. Ensaio mutagênico com *Tradescantia pallida* (TRAD-MCN)

Cerca de 15 ramos florais de *T. pallida* contendo inflorescências jovens foram colocadas em um Becker e expostas às amostras do esgoto bruto e solubilizado por 8 horas, seguidas de 24 horas de recuperação, enquanto o controle negativo foi feito com água destilada (LOBO, 2003); todos os tratamentos ocorreram sob aeração constante com bomba de aquário. Passado o período de recuperação, as inflorescências foram fixadas em Carnoy I por 48 horas. Decorrido este período, as inflorescências foram dissecadas em lâmina, na qual separou-se apenas o botão que continha as anteras com células em estágio de tétrade.

O teste com *T. pallida* foi realizado de acordo com o protocolo de Te-Hsiu Ma (1981), validado pela USEPA. O potencial mutagênico foi avaliado de acordo com a frequência de micronúcleo observada. Foram contabilizadas 3.000 células em fase de tétrade (300 células para dez lâminas de cada tratamento).

5. RESULTADOS

Durante a realização desta dissertação foram produzidos dois artigos, os quais serão submetidos à publicação em revistas especializadas.

Artigo 1

A utilização do sistema-teste *Tradescantia*: bases e aplicações dos bioensaios Trad-MCN e Trad-SHM.

Guilherme Thiago Maziviero e Carmem Silvia Fontanetti.

Artigo 2

Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de lodo de esgoto por meio dos sistemas-teste *Allium cepa* e *Tradescantia pallida*.

Guilherme Thiago Maziviero e Carmem Silvia Fontanetti.

ARTIGO 1

A utilização do sistema-teste *Tradescantia*: bases e aplicações dos bioensaios Trad-MCN e Trad-SHM.

GUILHERME THIAGO MAZIVIERO, CARMEM SILVIA FONTANETTI

UNESP – Instituto de Biociências, Laboratório de Mutagênese, Departamento de Biologia

e-mail: fontanet@rc.unesp.br

RESUMO

A *Tradescantia pallida*, também conhecida como coração roxo, é uma planta que apresenta fácil adaptação em qualquer ambiente e pode se desenvolver durante todo o ano, tanto ao ar livre quanto em estufas. Seu tamanho relativamente pequeno e o material genético composto por seis pares de cromossomos relativamente grandes tornaram essa planta um instrumento favorável para estudos citogenéticos. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo realizar um levantamento bibliográfico sobre duas técnicas padronizadas, o ensaio do micronúcleo (Trad-MCN) e o ensaio do pêlo estaminal (Trad-SHM), empregadas em estudos de monitoramento ambiental e discutir trabalhos publicados pela comunidade científica nas últimas décadas. O trabalho em questão discute ainda os pontos favoráveis desse versátil sistema-teste, trazendo um apanhado geral de seus diferentes campos de aplicação e diferentes formas de exposição aos agentes de interesse. Tendo em vista a grande aplicabilidade da *T. pallida* e seus diferentes marcadores (*endpoints*), pode-se concluir que esta espécie vegetal constitui valiosa ferramenta de monitoramento ambiental, devido a sua comprovada sensibilidade. Além disso, esta espécie apresenta resultados similares e, em alguns casos, superiores em comparação a outros testes com organismos vegetais e animais já estabelecidos.

Paravras-chave: micronúcleo, pêlo estaminal, genotoxicidade, monitoramento ambiental.

1. INTRODUÇÃO

As alterações cromossômicas vêm sendo estudadas há quase um século e são sempre associadas a efeitos deletérios. Atualmente, sabe-se que existem vários tipos de anomalias citogenéticas, as quais podem ser induzidas por uma gama bastante variada de agentes extrínsecos ou intrínsecos ao organismo, sendo alguns mecanismos de ação parcialmente conhecidos e outros ainda a ser compreendidos. Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que as alterações citogenéticas podem ser resultantes da exposição a substâncias químicas como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), metais, entre outros compostos, radiações ionizantes e não ionizantes provenientes de atividade antrópica ou natural (TUCKER; PRESTON, 1996).

A superfície terrestre é a maior fonte de armazenamento de poluentes, dessa forma, as pesquisas ambientais podem trazer à tona a história e o presente estado de contaminação de uma área por poluentes tóxicos. A noção da utilização de respostas biológicas para medir o efeito de poluentes em organismos sujeitos a ecossistemas contaminados surgiu juntamente com a ciência Ecotoxicologia na década de 60. Inicialmente, estas respostas eram baseadas em testes de laboratório limitados à avaliação de efeitos letais ou parâmetros fisiológicos não específicos (parâmetros sanguíneos e metabolismo energético, por exemplo) (PRINTES, 2006). Esta ciência se justifica em decorrência do crescimento acelerado da indústria petroquímica e farmacêutica, que todos os anos lançam novos compostos no mercado sem o conhecimento das conseqüências futuras; logo, a avaliação toxicológica e a toxicidade genética constituem ferramentas de monitoramento da qualidade ambiental, tendo como razão primária para o desenvolvimento deste tipo de avaliação, a proteção do homem contra danos ao DNA e suas conseqüências (TUCKER; PRESTON, 1996).

Danos ao DNA em células germinativas podem levar a doenças hereditárias ou causar redução da fertilidade. Somando-se a isso, o aumento da carga genotóxica nos ecossistemas pela liberação de produtos químicos e agentes físicos como radiação ultra-violeta (UV) podem causar impacto sobre

os organismos, induzindo aumento nas frequências de mutação; tais efeitos podem conduzir a uma diminuição do tamanho da população e, eventualmente, a extinção das espécies e, por consequência, afetar a estabilidade dos ecossistemas (MAJER et al., 2005).

Em termos gerais, o processo de avaliação de risco envolve identificação do perigo, avaliação dose-resposta e caracterização do risco, no qual os dados dos ensaios de genotoxicidade podem ser utilizados. Na avaliação do risco é importante identificar o mecanismo de indução e seus resultados adversos a saúde, desenvolvendo, para tanto, métodos quantitativos de precisão (TUCKER; PRESTON, 1996).

Para avaliar e prevenir a presença de agentes mutagênicos no ambiente são necessários indicadores sensíveis que permitam detectar todo o espectro de ação desses compostos, ou seja, aqueles que apresentam alta sensibilidade e baixa especificidade (RODRIGUES, 1999). Devido à estrutura altamente conservada do material genético é possível usar ampla variedade de espécies em testes de genotoxicidade; atualmente, os métodos mais difundidos para a rotina de testes baseiam-se na utilização de bactérias indicadoras e, também, de fungos basidiomicetos, plantas, insetos e células de mamíferos cultivadas ou, ainda, animais de laboratório para testes de mutagenicidade. Para testes em ambiente aquático, os peixes, bivalves, protozoários e algas, bem como plantas superiores, são comumente empregados (BIAGINI et al., 2009; CARITÁ, MARIN-MORALES, 2008; CHRISTOFOLETTI et al., 2009; DAVID et al. 2008; HOSHINA, MARIN-MORALES, 2010; MAJER et al., 2002; SOUZA, FONTANETTI, 2006).

De acordo com a revisão bibliográfica de White e Claxton (2004), o teste de Ames é o mais empregado em avaliações de genotoxicidade para solos. Não obstante, pode-se afirmar que testes com vegetais podem ser mais informativos, por apresentarem maior versatilidade.

Diversas plantas superiores são empregadas em ensaios de genotoxicidade, como *Nicotiniana tabacum* (tabaco) para a detecção de ozônio, *Vicia faba* (fava), *Arabidopsis thaliana* (mostarda) e *Hordeum vulgare* (cevada), para análise de solo, água e poluentes atmosféricos (COTELLE et al., 1999; GRANT, 1994; JORGE et al., 2007), porém, estudos indicam que o teste de

micronúcleo em *Tradescantia* chega a ser até oito vezes mais sensível que o ensaio com *Allium cepa* e até 62 vezes mais sensível que o ensaio com *V. faba*, para amostras de solos contaminados com grandes concentrações de poluentes, enquanto que para concentrações menores, a eficiência chega a quase o dobro (COTELLE et al., 1999). Com o aumento do uso documentado de materiais vegetais em genética toxicológica e avaliação de riscos, o interesse por sistemas-teste botânicos está fortalecido em meio à comunidade científica e autoridades políticas, pois proporcionam conhecimento da genotoxicidade e, especialmente, das aberrações mitóticas (FISKEJÖ, 1993).

As plantas detectam ampla variedade de compostos genotóxicos ambientalmente relevantes, em especial àqueles de ação direta, testes com pesticidas (BIANCHI, 2008; PEDRO, 2008) e produtos químicos industriais (MATSUMOTO et al., 2006; CARITÁ, MARIN-MORALES, 2008; VENTURA et al., 2008) apresentam resultados positivos. Os ensaios com plantas constituem boa ferramenta para a detecção de substâncias reativas às moléculas de DNA e metais no meio ambiente. Em estudos com misturas complexas, os vegetais também apresentam resultados satisfatórios, indicando que as plantas são suficientemente sensíveis para detectar os efeitos adversos de determinada substância (MAJER et al., 2005).

Segundo Majer et al. (2005), uma das limitações do uso de plantas como indicadores é a falta de sensibilidade para certas classes de pró-mutágenos como as nitrosaminas, aminas heterocíclicas e algumas classes de HPAs. Em contrapartida, Ventura (2009) demonstrou que o sistema *Allium cepa* é susceptível à nitro aminoazobenzeno, enquanto Mazzeo (2009) observou o mesmo efeito para benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX). Dessa forma, os vegetais superiores são descritos como os sistemas-teste mais indicados para avaliação de mutagenicidade em amostras ambientais. Espécies de *Tradescantia* são especialmente indicadas para aplicação em países em desenvolvimento, devido às vantagens com o fácil manuseio e custo de manutenção relativamente baixo (SHIMA et al., 1997). Embora um grande número de bioensaios esteja estabelecido para determinação de genotoxicidade aos agentes em laboratório, poucos são capazes de serem

executados *in loco* (MA et al., 1996), dentre eles, os bioensaios com *Tradescantia* demonstra boa aplicabilidade para este fim.

A *Tradescantia pallida* (Figura 1), também conhecida como coração roxo, é uma planta que apresenta fácil adaptação em qualquer ambiente e pode se desenvolver durante todo o ano, tanto ao ar livre, nas regiões subtropicais, quanto em estufas, em qualquer parte do mundo. O tamanho relativamente pequeno e o material genético composto por seis pares de cromossomos relativamente grandes tornaram essa planta um instrumento favorável para estudos citogenéticos (CARVALHO, 2005). As espécies diplóides possuem 24 cromossomos metacêntricos, suas inflorescências são produzidas e se desenvolvem em seqüência, permitindo exposição ao dano em todos os estágios de desenvolvimento (SAVAGE; PAPWORTH, 1998). Trata-se de um sistema bastante conhecido pela avaliação de efeitos em radiologia, compostos químicos, poluição atmosférica, hídrica e de solo (MA et al., 1996).



Figura 1 - Canteiro de *Tradescantia pallida*. Foto: G. T. Maziviero

Estudos sobre o genoma de *Tradescantia* iniciaram-se com os trabalhos pioneiros de Sax e Edmonds (1933), sobre o gametófito masculino de *Tradescantia reflexa*, quando foram descritas as várias fases do

desenvolvimento do micrósporo e determinados os períodos e o ritmo dos eventos meióticos. Foram feitas observações importantes sobre os efeitos de raios-X nos micrósporos dessa espécie. Primeiramente, foi observado que cromossomos meióticos eram mais suscetíveis a quebra que cromossomos mitóticos, sendo que os cromossomos em divisão eram ao menos dez vezes mais suscetíveis que aqueles em intérfase. Em segundo, as quebras não se distribuíam aleatoriamente nos cromossomos, isto é, *loci* posicionados próximo aos centrômeros apresentavam maior probabilidade de sofrer ruptura sob efeito de radiação. Estas observações levaram à conclusão de que as tensões mecânicas resultantes da espiralização dos cromossomos, durante a replicação, aumentariam a ocorrência de quebras, influenciando fortemente na suscetibilidade à aberrações cromossômicas (RODRIGUES et al., 1997).

O sistema-teste *Tradescantia* foi empregado para monitoramento de substâncias químicas, bem como na avaliação *in situ* de agentes mutagênicos do ar. Tais estudos datam desde o final dos anos 60, tornando-se um dos ensaios de avaliação mais popular. Dentre os mais utilizados, estão o ensaio do pêlo estaminal (Trad-SHM), para investigação de mutações em células somáticas, e o ensaio de micronúcleo em células-mãe do grão de pólen (Trad-MCN), para células germinativas. Geralmente são realizados com clones híbridos estéreis como *Tradescantia* clone BNL 4430, um híbrido interespecífico de *T. hirsutiflora* e *T. subcaulis* que possui 12 pares de cromossomos metacêntricos. A esterilidade dos clones é uma prática característica que garante a homogeneidade genética na ausência de efeitos mutagênicos (WHITE; CLAXTON, 2004).

Outro fator que garante sua popularidade entre a comunidade científica é sua versatilidade quanto às vias de exposição à amostra testada, tanto por absorção natural, no caso de poluentes gasosos, radiação ou plantio em solo, quanto por intoxicação, quando expostos os cortes de inflorescências jovens a extratos, soluções ou amostras sólidas em diferentes concentrações.

Além do Trad-MCN e Trad-SHM, os cortes da planta são bastante sensíveis aos agentes físicos e químicos do ambiente. Por exemplo, o surgimento de necroses nas folhas e a perda de vigor físico do talo, podem ser marcadores de toxicidade (MA et al., 1996).

O grande número de pesquisas com *Tradescantia* permite aos pesquisadores comparar e estender o teste a situações ambientais distintas e elaborar estratégias de monitoramento e prevenção. A caracterização genotóxica de contaminantes eventualmente dispostos no ar, água e solo, especialmente os metais, fornece informações permanentes de áreas historicamente contaminadas. Entretanto, existem alguns pontos desfavoráveis aos testes biológicos como: a diferença de reação entre os organismos empregados ao mesmo fator ambiental (CÉSNIENÉ et al., 2010); a dependência de condições ambientais em campo, além de não ser possível identificar qual contaminante é responsável pela mutação, quando se trata de uma mistura complexa como amostras ambientais.

Por outro lado, esses testes especificam as vias pelas quais se desenvolvem a mutação, indicando assim, os mecanismos de ação de certo contaminante. No caso do micronúcleo, podem ser decorrentes de mutações de ordem clastogênica (por fragmentos acêntricos) ou aneugênica (por ação nas fibras do fuso mitótico que desprende o material genético do núcleo principal), se analisado por meio de técnicas moleculares de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) na fase de tétrade da meiose (LEWINSKA et al., 2005).

Diante do exposto, nota-se que a *Tradescantia* vem ganhando espaço no cenário da avaliação e monitoramento ambiental, aplicando-se Trad-MCN e Trad-SHM, ou atrelado a outros sistemas-teste a fim de se estabelecer comparações e obter maior representatividade dos dados. Tal versatilidade permite sua aplicação nos mais diversos campos de estudo, merecendo posição de destaque entre os sistemas vegetais e, muitas vezes, sobressaindo-se aos sistemas *in vitro* bem estabelecidos.

2. O BIOENSAIO DE MICRONÚCLEO (TRAD-MCN)

O teste de micronúcleo em *Tradescantia* foi originalmente desenvolvido para mutágenos gasosos. Atualmente, é um dos mais aplicados entre os vegetais superiores para detecção de efeitos clastogênicos em condições ambientais como solos contaminados, especialmente, por metais, indústria

petroquímica, lodo urbano e poluição atmosférica em regiões intensamente expostas a diferentes poluentes.

O ensaio do micronúcleo em célula-mãe do grão de pólen de *Tradescantia* (Figura 2), também conhecido como Trad-MCN, é um teste de mutagenicidade extremamente sensível, de exposição curta e avaliação simples, aplicável tanto aos clones BNL 4430 e KU 20 quanto em *T. pallida*. A avaliação das alterações genéticas da *Tradescantia* pode ser feita pela detecção de mutações induzidas por agentes presentes no ar, no solo e na água mediante análise de micronúcleos. Além disso, dados obtidos em experimentos com esse vegetal são, em geral, consistentes, precisos e confiáveis (CARVALHO, 2005). O Trad-MCN é um teste bastante empregado para monitoramento ambiental, comparável aos testes com cultura de células de mamíferos e bactérias. As plantas podem ser diretamente expostas ao contaminante, sem qualquer diluição ou filtração da amostra (STEINKELLNER et al., 1999).

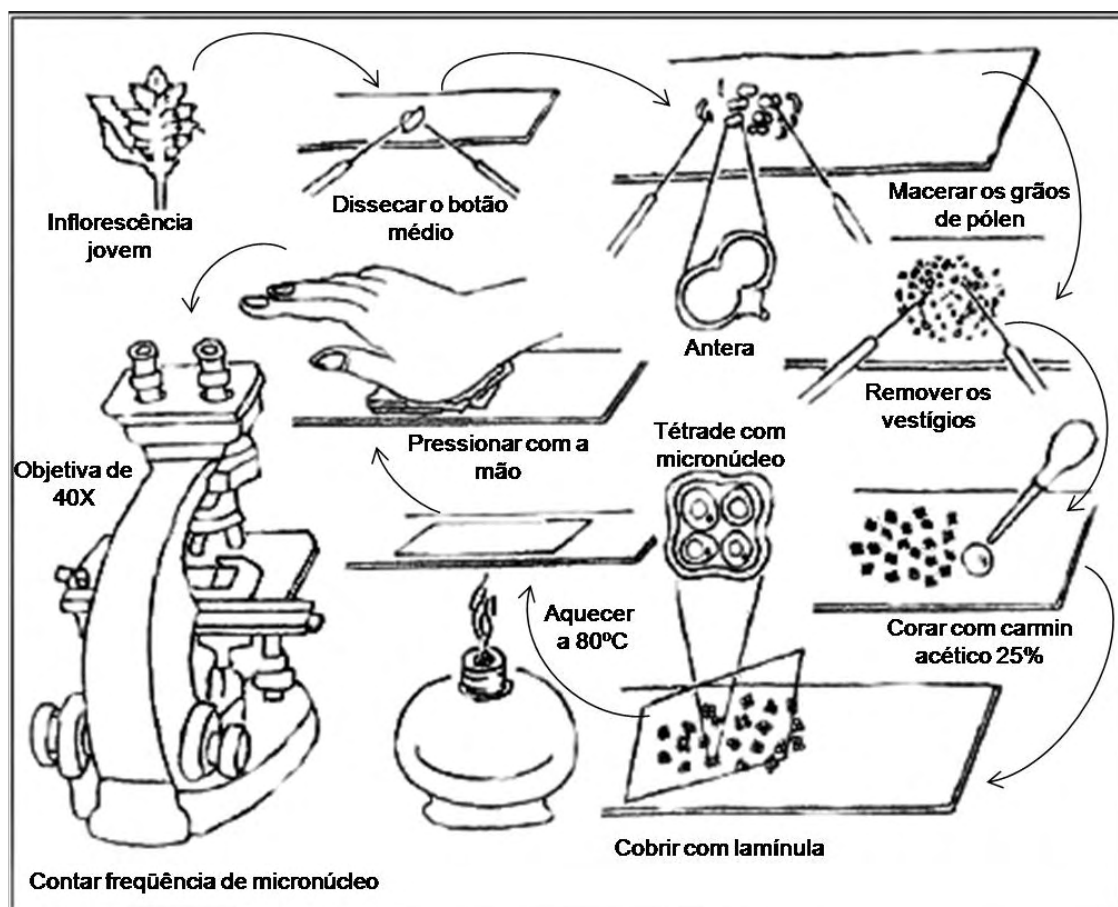


Figura 2 - Representação esquemática da montagem de lâmina para o teste de micronúcleo em *Tradescantia*. Fonte: Ma (1981) *apud* Sant'anna (2003)

O ensaio consiste na estimativa da frequência de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen. Micronúcleos podem ser observados em quase todos os tipos celulares, e por este motivo existem muitas variações do ensaio. Em comparação com outros ensaios citogenéticos, existem diversas vantagens na quantificação deste *endpoint*, incluindo a velocidade e facilidade de análise, além da possibilidade de contabilizar as células em diversos estágios de divisão. Ao mesmo tempo, muitos tipos celulares são passíveis de análise, incluindo estudos com seres humanos e animais de laboratório *in vivo* ou *in vitro* (TUCKER; PRESTON, 1996).

De acordo com Tucker e Preston (1996), diferentes mecanismos podem estar envolvidos na formação dos micronúcleos, incluindo quebras cromossômicas (clastogênese) e aneuploidia, decorrente da inibição da formação do fuso mitótico. Há alguns anos, a avaliação citológica previa pouca ou nenhuma informação sobre o tipo de dano inerente à sua formação, fato que gerou considerável debate sobre o tamanho de um micronúcleo e seus mecanismos de formação, chegando-se ao consenso de que os micronúcleos de tamanho maior apresentam cromossomos inteiros, enquanto os menores consistem em um ou mais fragmentos cromossômicos (LEME, MARIN-MORALES, 2008; VENTURA, 2009).

Os micronúcleos são pequenos fragmentos de cromossomos que podem ser resultantes de quebras induzidas por qualquer agente, quando as células precursoras dos grãos de pólen estão na fase inicial da meiose. Embora o efeito mutagênico aconteça no início do processo de meiose (prófase I), este é visualizado quando as células-mãe de grãos de pólen já estiverem na fase de tétrade (Figura 3) (SAVÓIA, 2007). Estruturas de micronúcleos também podem surgir a partir de cromossomos inteiros ou de fragmentos, que são perdidos durante a divisão celular e não são incorporados ao núcleo das células-filhas, permanecendo, assim, no citoplasma das células interfásicas (MEIRELES et al., 2009).

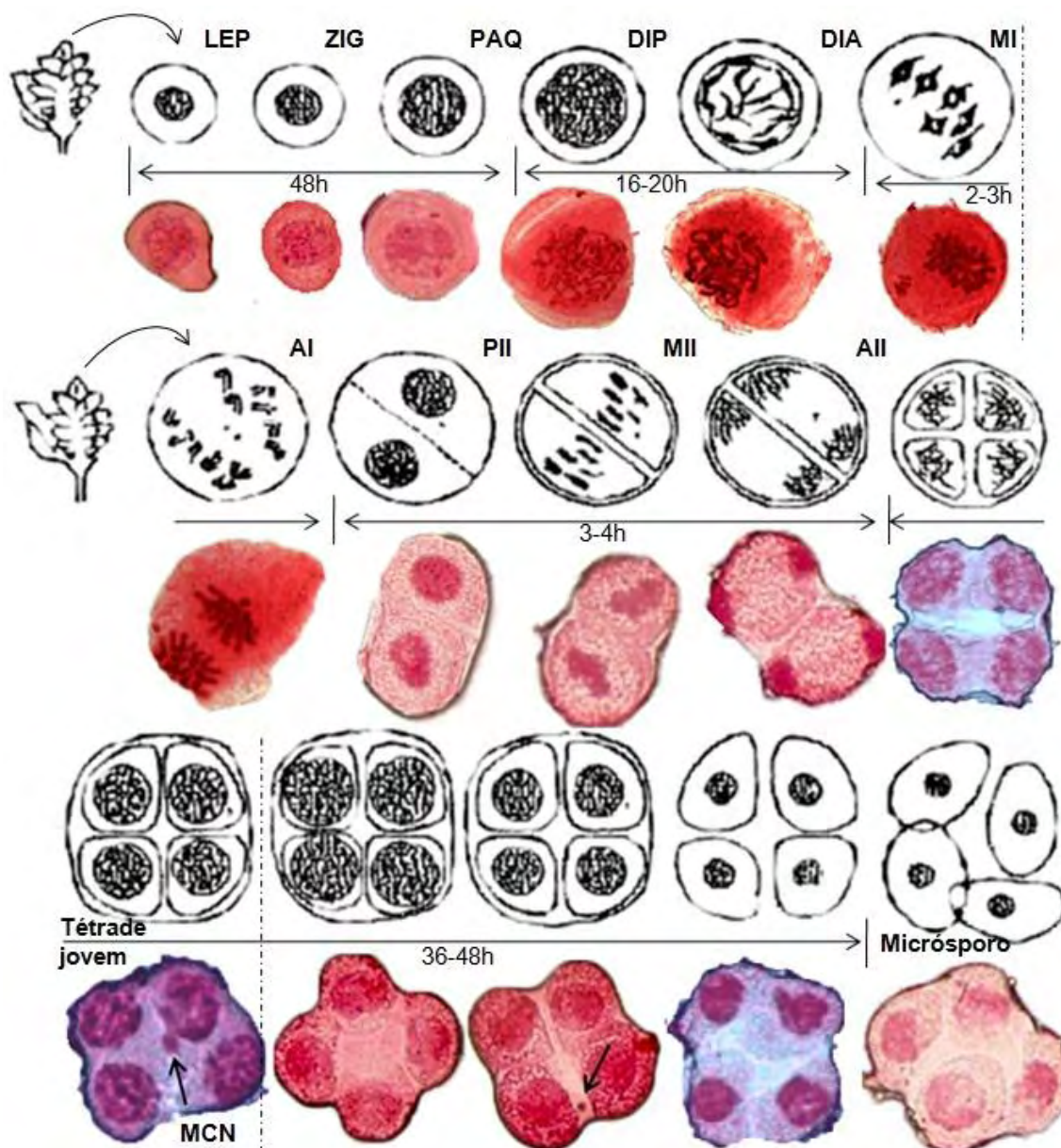


Figura 3 – Tempo de duração e morfologia geral dos estágios da meiose das células-mãe do grão de pólen da *Tradescantia*. Fonte: Adaptado de Ma (1983) apud Sant' Anna (2003)

3. O BIOENSAIO DO PÊLO ESTAMINAL (TRAD-SHM)

O ensaio Trad-SHM consiste em detectar mutações somáticas nas inflorescências jovens do clone híbrido BNL 4430. No entanto, atualmente, o clone KU 20 (Kyoto University) é mais aplicável a esta técnica, devido ao maior número de inflorescências por ciclo (Figura 4). A mutação resulta na expressão do alelo recessivo, que implica no fenótipo de coloração rosa. A elevada taxa de células róseas, bem como a perda da capacidade reprodutiva, são

indicativos de mutagenicidade (MA et al., 1996). O teste foi desenvolvido por Sparrow e colaboradores na década de 50, no Laboratório Nacional de Brookhaven, em Long Island, Nova Iorque. Esse ensaio foi utilizado em substituição às culturas microbianas, para avaliação de efeitos da radiação ionizante por Nayar e Sparrow em 1967, onde o crescimento normal dos pêlos correspondia ao crescimento da colônia, enquanto os pêlos atrofiados identificavam a diminuição da colônia pelos efeitos negativos ao agente exposto (MA et al., 1994). Além do marcador de coloração, é possível observar alterações como expressão de células gigantes, células duplas ou triplas, bifurcação do pêlo, bem como outras anomalias de crescimento e perda de integridade reprodutiva como indicadores de genotoxicidade (RODRIGUES, 1999).



Figura 4 - *Tradescantia* clone BNL 4430, utilizada para o ensaio Trad-SHM. Fonte: Knasmüller (2006)

O protocolo deste experimento, sugerido por Rodrigues (1999), se baseia na utilização de 20 a 30 ramos florais de clones híbridos por tratamento, contendo inflorescências jovens colhidas no dia anterior ao início da exposição. As plantas são mantidas sob aeração constante, em água destilada para o período de adaptação. Os ramos são então transferidos à amostra ou ao

ambiente de teste, por um tempo de exposição de 24 horas. O ensaio Trad-SHM requer um período de recuperação de 8 a 14 dias, sendo este o tempo necessário para que os botões floresçam, expondo os pêlos desenvolvidos para avaliação.

A coleta das flores podem ser realizadas à partir do oitavo dia, os estames removidos são colocados em lâminas de vidro, contendo uma gota de solução etanol e glicerina (1:1), as quais são avaliadas quanto à proporção de células rosas em microscópio. Em geral, são avaliadas 10 flores por ensaio, totalizando 3000 pêlos por tratamento, uma vez que cada flor possui seis estames (Figura 5), dotados de 50 pêlos cada e a quantificação se dá em frequência de mutações por 1000 pêlos (RODRIGUES, 1999).

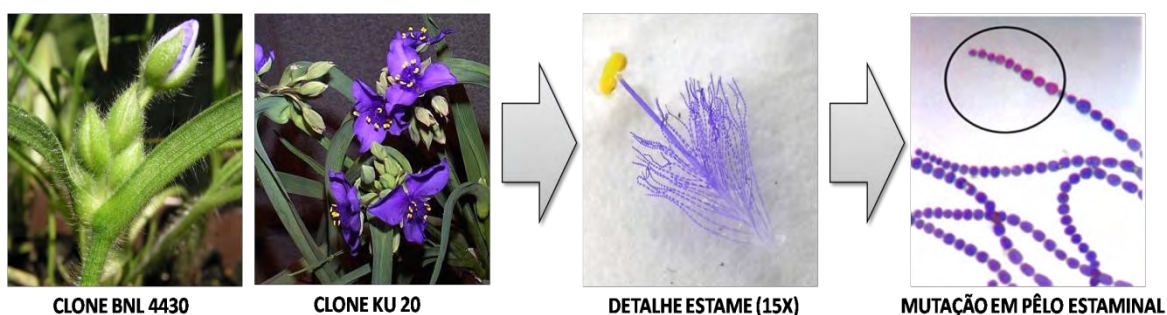


Figura 5 - Representação do ensaio Trad-SHM. Fonte: Knasmüller (2006)

A característica mais importante deste sistema é que cada pêlo estaminal é composto de uma cadeia única, com cerca de 20-35 células, sendo produto de repetidas divisões das células meristemáticas, com a diferenciação de uma célula terminal até o completo desenvolvimento do pêlo, como ilustrado na figura 6.

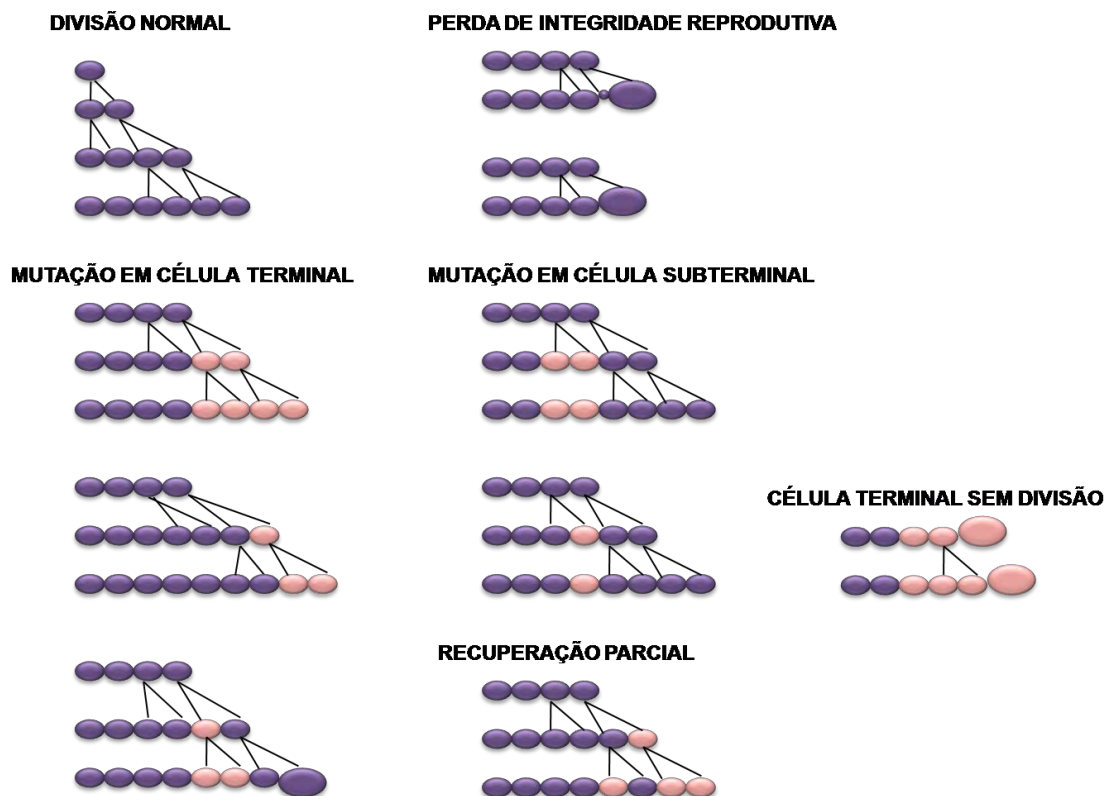


Figura 6 - Representação do crescimento celular do pêlo estaminal e surgimento de mutações. Fonte: Ichikawa (1981)

4. APLICABILIDADE DOS TESTES

4.1. RADIAÇÃO IONIZANTE

Vilallobos-Pietrini et al. (1999) avaliaram o efeito do radônio (Rn) em tétrades do clone híbrido 4430 de *Tradescantia* e observaram resposta significativa à indução de micronúcleos. Sabe-se que o Rn é um gás radioativo de meia-vida curta que pode ser perigoso ao penetrar no organismo por ingestão, inalação e/ou ferimento. Seu decaimento o converte para ^{218}Po e ^{214}Po , que pode se depositar nos pulmões, aumentando a probabilidade de câncer. Os pesquisadores realizaram análise histológica nos estômatos das plantas, onde não foram constatadas alterações, levando-os a concluir que o gás teve ação direta sobre a inflorescência. Em complementação, Heddle e Carrano (1977) avaliaram este tipo de mutação por FISH e detectaram que apenas uma pequena parte dos micronúcleos induzidos por radiação representava cromossomos inteiros, enquanto sua maioria era composta por

fragmentos acêntricos contendo região telomérica (VILALLOBOS-PIETRINI et al., 1999).

A alta sensibilidade dos cromossomos das células germinativas de *Tradescantia* é atribuída, principalmente, à fácil penetração do agente gasoso para os botões de flores, em contraste com os sistemas dos animais que tem muitos órgãos intermediários, tecidos e rotas metabólicas para atingir as células germinativas. Ao comparar os efeitos clastogênicos de vapores de formaldeídos e raios-X, pelo ensaio Trad-MCN, Xu e Ma (1998) estabeleceram eficácia dos formaldeídos, em referência ao conhecido efeito clastogênico dos raios-X. Observaram ainda que o efeito do formaldeído foi maior em baixas concentrações, guardando relação de 1:1 (1 ppm de formaldeído para 0.01 mGy de Raio-X).

O ensaio de Trad-SHM foi empregado para o monitoramento de radiação ionizante no entorno de usinas nucleares no Japão (ICHIKAWA, 1981); foi observado aumento significativo na indução de mutação, diretamente relacionada com a direção predominante dos ventos e os períodos de atividade das usinas. Em estudo similar, Cebulska-Wasilewska (1992) constatou aumento nas freqüências de mutação em pêlos estaminais em plantas expostas em uma região da Cracóvia, distante 700 quilômetros da cidade de Chernobyl, onde ocorreu, em 1986, o maior acidente nuclear da história. Aumentos similares na taxa de mutação também foram observados entre maio a junho de 1986 no Japão, distante 800 quilômetros de Chernobyl (ICHIKAWA et al., 1996).

4.2. POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA

Rodrigues (1999) considerou que a contribuição mais importante do ensaio de Trad-SHM, foi dada em uma série de estudos realizados nos Estados Unidos, com um laboratório móvel de monitoramento da poluição atmosférica, onde o ar obtido em locais poluídos induzia maiores freqüências de mutações que o ar filtrado das mesmas localidades ou ar coletado em áreas controle, como o Grand Canyon.

Vários estudos têm utilizado Trad-MCN para avaliar o potencial mutagênico da poluição atmosférica em centros urbanos em diferentes países.

Isidori et al. (2003), por exemplo, usaram Trad-MCN para monitorar a área urbana de Caserta, no sul da Itália. Os pesquisadores realizaram o experimento *in situ* em 17 locais com intensa circulação de veículos, onde o número de micronúcleos observados foi significativamente maior em plantas localizadas em regiões de alto fluxo, quando comparadas àquelas expostas em regiões de tráfego moderado.

O mesmo bioensaio foi utilizado por Batalha et al. (1999) no intuito de avaliar a genotoxicidade do material particulado inalável – MP10, na região metropolitana de São Paulo. Os autores realizaram amostragens de material particulado inalável, utilizando o amostrador de grande volume, sendo este dotado de filtro de 10 µm. O particulado retido no filtro foi solubilizado em água destilada e o extrato obtido foi utilizado para intoxicar os ramos de *T. pallida*. Dessa forma, foi possível constatar potencial mutagênico, uma vez que a fração solúvel do MP10 é constituída de oxidantes primários e secundários, metais e aldeídos. Meireles et al. (2009), observaram o mesmo comportamento ao avaliar o efeito da poluição veicular em três áreas, com diferentes fluxos de trânsito, na cidade de Feira de Santana, Bahia. Os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa nas taxas de micronúcleos entre as regiões, sendo maiores naquelas de tráfego intenso. Meireles et al. (2009) afirmaram que, embora seus resultados tenham corroborado com Carreras et al. (2006) e Savoia et al. (2007), a frequência de micronúcleo observada em Feira de Santana foi inferior às descritas por Carreras et al. (2006) em Córdoba, uma das cidades mais poluídas da Argentina e às descritas por Savoia et al. (2007), na cidade de Santo André, importante pólo industrial de região metropolitana de São Paulo, que apresenta grande tráfego de veículos. De acordo com os resultados do estudo, os locais com maior tráfego de veículos demonstraram significativamente maior poluição atmosférica. Portanto, os autores concluíram que a utilização do bioensaio com Trad-MCN, alerta para a necessidade de implementar programas de controle de qualidade do ar na cidade de Feira de Santana.

Maziviero e Ferreira (2007) utilizaram Trad-MCN com o objetivo de avaliar o potencial genotóxico do material particulado inalável na atmosfera de Limeira, cidade do interior de São Paulo. Os autores submeteram *T. pallida* à

solução extraída do filtro de um Amostrador de Grande Volume (AGV - MP10) após 24 horas de amostragem. Os resultados indicaram resposta positiva do sistema-teste, mesmo em concentrações abaixo dos limites preconizados pela legislação vigente. Os autores relacionaram a concentração de material particulado inalável com o período de estiagem, destacando-se o grande volume de queima da palha de cana-de-açúcar na região, durante a realização do experimento.

Um estudo realizado por Klumpp et al. (2004) teve por objetivo investigar a influência da temperatura e umidade relativa do ar no aumento da taxa basal de micronúcleos em *T. pallida*; paralelamente, compararam os dados obtidos com organismos expostos à poluição atmosférica, tendo em vista a aplicação *in situ* desse sistema-teste; foi observado que os organismos expostos em campo parecem ser mais susceptíveis à mudança climática do que os submetidos aos ensaios em laboratório. Klumpp et al. (2004) constataram que a variação da umidade relativa não afeta a mutação espontânea, mas é inversamente proporcional à frequência de mutação induzida por poluição atmosférica. A baixa temperatura causou aumento da geração de micronúcleos no controle negativo; em temperaturas elevadas foi possível notar danos físicos nos organismos testados, além da interrupção de maturação do grão de pólen. Entretanto, quando houve aumento gradual da temperatura, tais efeitos não foram observados. O choque térmico mostrou alta taxa de indução em todos os experimentos, comprovando que os fatores climáticos influenciam diretamente no sistema-teste em questão. Logo, os autores sugerem que os efeitos climáticos devem ser levados em consideração de modo a evitar resultados falso-positivos ou *backgrounds*.

Essas investigações foram executadas a partir de estudos com outras espécies de plantas, pois sabe-se que o ciclo da meiose, especialmente o desenvolvimento de células-mãe de pólen, são muito sensíveis ao estresse de alta temperatura, especialmente nas primeiras fases meióticas (KLUMPP et al., 2004). Em temperaturas extremamente elevadas (acima de 40°C), podem ocorrer danos fisiológicos severos, resultando em atraso de desenvolvimento meiótico, de modo que a primeira fase de tétrade, necessária para avaliação de micronúcleos, não possa ser detectada, ou acarretar em morte celular, como

encontrado em resposta à super dosagem aos agentes mutagênicos fortes (MA et al., 1983; MOHAMMED; MA, 1999).

Além de causarem prejuízos diretos, temperaturas extremas provocam efeitos indiretos em sistemas enzimáticos e influenciam na abertura estomática para respiração celular, aumentando assim a captação e transporte de substâncias mutagênicas para as células-alvo (KLUMPP et al., 2004).

4.3. POLUIÇÃO DE RECURSOS HÍDRICOS

A avaliação de corpos d'água foi extensamente estudada por meio da utilização de sistemas-teste como bactéria e cultura de células. No entanto, atualmente as plantas vêm ganhando espaço neste cenário, pois permitem mensurar diversos *endpoints*, e toleram exposição direta à amostra, sem qualquer tipo de diluição (CARITÁ, MARIN-MORALES, 2008; LEME, MARIN-MORALES, 2008; MONARCA et al., 2003).

Gong et al. (2003), utilizaram Trad-MCN para avaliar o efeito genotóxico do 2,4 dinitrotolueno e 2,6 dinitrotolueno, produtos intermediários de corantes, explosivos e propelentes. Estas substâncias são principalmente poluidoras das águas, sendo constantemente avaliadas pelo teste de Microtox e algas verdes, na qual se avalia a inibição de crescimento, mas que fornecem pouca informação quanto à mutagenicidade. O estudo demonstrou que o tempo de exposição de 30 horas, sem recuperação, não foi capaz de induzir diferença estatística entre as taxas de micronúcleo em relação à exposição por seis horas, com recuperação. Os autores presumiram que tal efeito se deu em decorrência do atraso meiótico, devido à ausência do período de recuperação, e não à superexposição ao intoxicante; ou então devido à propriedade mutagênica (de fraca a moderada) dos compostos testados que requerem a metabolização.

Considerando compostos nitrogenados, Yang (1999) utilizou Trad-MCN para monitorar diferentes pontos do lago Gaojian, na China oriental, e observou resultados positivos, que podem ter sido influenciados por altas concentrações de nitrito e nitrato em detrimento da poluição por esgoto doméstico e industrial no entorno da área. Monarca et al. (2003) realizaram um estudo como parte do programa de avaliação da influência de diferentes métodos de desinfecção de

água de abastecimento público, no qual diversos organismos foram empregados, dentre eles moluscos, peixes e plantas. De acordo com os autores, a desinfecção de água para abastecimento pode produzir compostos tóxicos, principalmente se captados em mananciais superficiais, uma vez que o processo de cloração resulta em subprodutos carcinogênicos/mutagênicos, derivados dos compostos clorados em contato com matéria orgânica. Dessa forma o ácido paracético (APA), vem sendo bastante empregado por apresentar baixa toxicidade e produzir subprodutos como ácidos carboxílicos, que não são considerados mutagênicos. O estudo foi realizado em estação de tratamento piloto, no lago Trasimeno, região central da Itália. Os organismos vegetais empregados (*A. cepa*, *T. pallida* e *V. faba*) se mostraram mais sensíveis à amostra do que o teste de Ames, provavelmente, por se tratar de *endpoints* diferentes (mutação/aberração cromossômica).

Em continuidade ao programa, as respostas se mantiveram similares, quando compararam hipoclorito de sódio (NaClO), dióxido de cloro (ClO₂) e APA, no qual os três reagentes foram avaliados por *A. cepa*, *V. faba* e *T. pallida*. Os organismos testados apresentaram boas respostas às amostras, utilizando-se os marcadores de micronúcleo, aberrações cromossômicas e fragmentos de DNA, evidenciando resposta sobre efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos (MONARCA et al., 2005). Os resultados indicaram que os oxidantes empregados possuem potencial clastogênico/aneugênico, sendo que o ClO₂ mostrou ao menos um resultado positivo para todos os organismos testados; o NaClO foi genotóxico para dois organismos em pH ácido; e o APA mostrou apenas uma resposta positiva em pH ácido. O teste com *V. faba* se mostrou mais sensível entre os organismos testados. Monarca et al. (2005) comentaram ainda, que o pH da amostra influenciou diretamente nos resultados.

Um grande estudo, realizado na Áustria, para monitorar água subterrânea, avaliou amostras de 43 pontos com o ensaio *Salmonella* microsome, e teste de micronúcleo em hepatócitos de rato, *V. faba* e *Tradescantia*. Tomados em conjunto, os dados indicaram que o ensaio Trad-MCN é igualmente adequado para a detecção de efeitos em amostras de água contaminada (MAJER et al., 2005).

Em revisão bibliográfica realizada por Knasmüller et al. (1998), os pesquisadores consideraram o uso de plantas na avaliação de genotoxicidade em ambientes aquáticos, e chegaram à conclusão de que os dados atualmente disponíveis indicam que os bioensaios com vegetais podem ser parte integrante da bateria de testes usada para detecção de genotoxicidade e contaminação do ambiente aquático, principalmente por apresentar resposta altamente sensível, tempo e custo efetivo relativamente baixos. A aplicação destes testes é especialmente adequada em áreas mundiais onde o apoio financeiro para o controle da poluição ambiental é limitada e as análises químicas apresentam custo elevado.

4.4. SOLOS CONTAMINADOS

O primeiro ensaio utilizando Trad-MCN e Trad-SHM para avaliação de lixiviados, a partir de resíduos de mineração, foi realizado na Alemanha oriental, onde grandes quantidades de escória foram depositadas nas montanhas de Harz, próximo a Mansfeld, gerando um passivo ambiental em decorrência de décadas de atividade mineradora da região (FOMIN et al., 1999). Estes rejeitos são carregados pelos ventos e causam diversos problemas, especialmente chuva ácida e subsequente drenagem de lixiviados na região; conseqüentemente, os metais tóxicos e compostos orgânicos tóxicos provenientes dos resíduos são freqüentemente liberados para o ambiente em concentrações elevadas. Dessa forma, um ensaio de lixiviabilidade foi desenvolvido para determinar a mobilização de metais tóxicos a partir de lodos e sedimentos em água. Mediante este procedimento foi possível determinar a capacidade de mobilização de substâncias nocivas e compostos químicos por extração ácida e seus efeitos genotóxicos foram avaliados pelos bioensaios com *Tradescantia*, que apresentou boa sensibilidade à amostra testada. Ao abordar a questão das amostras em meio ácido, os bioensaios Trad-MCN e Trad-SHM têm importante vantagem sobre os demais testes mutagênicos em que se utilizam bactérias, uma vez que a maioria dos testes bacterianos exigem condições de pH neutro do meio, que freqüentemente, significa alterar a amostra original (FOMIN et al., 1999).

Minouflet et al. (2005) estudaram a sensibilidade de *V. faba*, Trad-MCN e Trad-SHM à exposição por intoxicação dos sistemas-teste em regiões no leste da França que receberam depósitos radioativos do acidente de Chernobyl. Os pesquisadores descreveram a similaridade de comportamento do ^{137}Cs em relação às propriedades físico-químicas do potássio (K) no solo, sendo facilmente incorporado pelas plantas por meio do íon K^+ ou canais transportadores de K^+ . Além disso, a biodisponibilidade para as plantas depende das características físico-químicas do solo. Os pesquisadores concluíram que o teste com micronúcleo em *Tradescantia* foi o mais sensível entre os bioensaios empregados. Os mesmos autores citaram ainda um estudo utilizando culturas de grãos em regiões contaminadas de Chernobyl, que mostrou redução na taxa de transferência para as plantas em 50 vezes, anos após o acidente. A adsorção ao solo e a concentração de cinzas minerais desempenha parte essencial para a imobilização do isótopo, atenuando sua radiotoxicidade para as plantas (MINOUFLET et al., 2005).

Outra fonte de contaminação de solos é a aplicação indiscriminada de pesticidas. Grande parte dos compostos já estudados foram capazes de promover mutações em, ao menos, um sistema teste empregado, embora muitas vezes em doses maiores do que aquelas aplicadas em campo, especialmente, se considerar a diluição de compostos no solo imediatamente após a aplicação.

Rodrigues et al. (1998) avaliaram a genotoxicidade de três pesticidas e seus resíduos resultantes de práticas agrícolas recomendadas, utilizando Trad-MCN. O objetivo principal foi analisar a possível redução do potencial genotóxico por um programa de manejo integrado. Os resultados obtidos demonstraram que os pesticidas testados apresentaram respostas estatisticamente significativas em relação ao controle negativo em todas as concentrações (1, 10 e 50 ppm). Dessa forma, os autores concluíram que, mesmo em concentrações recomendadas para aplicação (1 ppm), foi evidenciada resposta genotóxica, demonstrando que a simples diminuição da dose aplicada do pesticida não é suficiente para a eliminação do efeito adverso. Em consonância, Mohammed e Ma (1999) buscaram avaliar as respostas de Trad-MCN e Trad-SHM a cinco herbicidas mais utilizados para

cultura de grãos (dimetoato, atrazina, simazina, dicamba e picloram), demonstrando que estes compostos causam mutações somáticas e danos cromossômicos em concentrações elevadas.

Os princípios ativos de pesticidas e herbicidas têm sido amplamente testados em fábrica, por meio de bioensaios e muitos deles, como cianazina, diclorovos, clorpirifos, atrazina, dicamba, picloram, dieldrin e aldrin induziram resultados positivos para *Tradescantia*. Alguns compostos, como triazenos, hidrazida maleica e azida sódica, apresentaram fitotoxicidade, ou seja, são ativadoras de metabólitos genotóxicos produzidos pelas plantas, que não são formados em mamíferos. Tal descoberta foi de fundamental importância no caso dos pesticidas, que apresentam resultados negativos em testes genotóxicos de rotina. No entanto, se estes compostos aplicados em espécies vegetais forem passíveis de conversão em metabólitos DNA-reativos, a saúde humana pode ser comprometida por ingestão de plantas (MAJER et al., 2002).

O efeito antagônico do etil metanosulfonato (EMS - agente alquilante monofuncional) com hidrazida maleica (pró-mutágeno ativado por ligações com peroxidases) foi avaliado pelo bioensaio em pêlo estaminal em *Tradescantia*, em diferentes intervalos de exposição, comprovando que o EMS inibe a ação mutagênica da hidrazida maleica (XIAO; ICHIKAWA, 1998).

Em estudo recentemente publicado por Cèsnienè et al. (2010), os pesquisadores avaliaram o grau de contaminação em regiões da Lituânia, alvo de ocupação de exército soviético para práticas militares que após a retirada das tropas, deixaram passivos de produtos derivados de petróleo, contaminando a área com óxido nitroso, dióxido de nitrogênio, amônia, ácido nítrico, HPA e metais. Durante o estudo foram comparadas áreas de ocupação militar e urbana. Os resultados de análises químicas indicaram traços no solo e em seu respectivo lixiviado; os autores sugeriram a complexação dos compostos metálicos com a fração orgânica do solo, tais como ácidos húmicos, dada a longa permanência de genotóxicos na superfície do solo. Ressaltaram ainda que o emprego dos testes com *Tradescantia* foram fundamentais para revelar as particularidades entre os diferentes pontos de amostragem. Uma comparação do lixiviado ajudou a elucidar o caráter específico da poluição do solo em vários pontos da cidade de Vilnius.

Nos últimos anos, o lançamento de metais ao meio ambiente vem aumentando consideravelmente. Diversas descobertas demonstram efeitos tóxicos, tanto agudos quanto crônicos, nos ecossistemas, promovendo impacto à saúde humana. O dano genético promovido por certos metais em plantas e animais, inclusive em humanos são conhecidos como indutores de câncer e responsáveis pela diminuição da fertilidade.

O dano genético induzido por metais em solo não pode ser monitorado por testes convencionais com bactéria, uma vez que os métodos existentes impossibilitam a extração de metais para utilização em cultura de células de mamíferos (MAJER et al., 2002). Alguns metais são capazes de causar aumento da taxa de micronúcleos. Por se tratar de um mecanismo de formação bastante conhecido e padronizado, o micronúcleo foi utilizado como marcador na avaliação dos efeitos de cinco metais (As, Pb, Cd, Cu e Zn), utilizando *Tradescantia*, *Vicia* e *Allium* (STEINKELLNER et al., 1999). O teste com as substâncias padrão dos metais causaram cinco vezes mais danos que o controle negativo (solução nutritiva), seguindo a relação $As > Pb > Cd > Zn > Cu$, na qual o Trad-MCN se mostrou mais sensível que os demais testes avaliados, uma vez que as células meióticas são mais susceptíveis a mutação do que as células meristemáticas. Ainda segundo Steinkellner et al. (1999), o As e o Cd^{2+} também mostrou toxicidade para células de mamíferos, causado pela interação com enzimas sulfidrilas. O íon As^+ se liga à enzima DNA-ligase II, levando à inibição do mecanismo de reparo do DNA, enquanto o Cd^{2+} é um aduto de DNA que reage com os radicais de hidroxila e interferem no mecanismo de reparo.

MAJER et al. (2002) analisaram a toxicidade de metais em solo, comparando alterações de parâmetros físico-químicos com o monitoramento de enzimas específicas, de modo a confrontar a concentração obtida aos níveis de mutação, pois sabe-se que algumas delas estão envolvidas em processos de mecanismos de reparo do DNA e podem ser inibidas por determinados metais. Os resultados indicaram relação inversa entre enzimas e metais na maioria dos pontos testados, enquanto o grau de genotoxicidade dependeu mais da característica físico-química do solo do que da concentração do elemento propriamente dita, concluindo que a mobilidade de metais é

fortemente influenciada pelo pH, granulometria e teor de cinzas do solo. Os dados apresentados confirmam o efeito genotóxico dos metais em relação à capacidade de inibir enzimas responsáveis pelo mecanismo de reparo do DNA da microbiologia do solo.

4.5. LODO DE ESGOTO

O tratamento de esgoto doméstico gera grande volume de resíduos sólidos. Dessa forma, o lodo produzido nas estações de tratamento pode conter substâncias tóxicas e seu potencial genotóxico também desperta grande preocupação. O potencial contaminante desses resíduos depende de suas características, determinadas pelo grau de desenvolvimento urbano da região.

Como se sabe, as substâncias genotóxicas podem ser removidas durante o processo de tratamento de esgoto, e assim ficar acumuladas no lodo produzido. O aumento do número de estações de tratamento de esgotos no Brasil, bem como as cidades em expansão proporcionam aumento do volume de lodo gerado. Este material é rico em matéria orgânica e nutrientes, podendo ser aplicado como fertilizante agrícola. Contudo testes químicos, complementados com testes genotóxicos/toxicológicos são recomendados para avaliação dos possíveis efeitos dependendo do tipo de resíduo aplicado. Infelizmente, não há uma metodologia padrão para avaliação desses efeitos. Sendo assim, alguns testes rápidos podem servir de alternativa para avaliação de efeitos adversos do emprego do lodo na agricultura (MIELLI et al., 2009).

Um estudo comparativo internacional foi realizado sob os auspícios do Programa Internacional de Segurança Química (IPCS), no qual vários países foram contemplados. Cabrera e Rodriguez (1999) participaram do ensaio Trad-MCN, no qual cinco das seis amostras de solos irrigados com água residuária testadas apresentaram resultados positivos, das quais quatro foram estatisticamente significativas em relação ao controle, sendo possível concluir que o solo irrigado com efluentes contém determinados agentes capazes de induzir mutações.

Por outro lado, o IPCS demonstrou que os bioensaios de plantas mostraram diferentes graus de sensibilidade para detectar danos cromossômicos potenciais. O Trad-MCN foi sensível e eficaz para os três locais

de eliminação de resíduos, enquanto o Trad-SHM foi menos sensível. Para o teste com cebola, alguns tratamentos foram tóxicos, manifestando-se como inibição da divisão celular (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999).

Hopker et al. (1982) examinaram a mutagenicidade do lodo utilizando Trad-MCN, *Zea mays* e *Salmonella*; neste estudo foram avaliados extratos aquosos de lodo de estações de tratamento de esgoto em Chicago. Os autores encontraram resultados positivos para mutagenicidade sob exposição a curto prazo. Mielli et al. (2009) utilizaram a contagem de micronúcleos em *T. pallida* e no clone 4430, para avaliar misturas de solo/lodo em diferentes concentrações (10, 25 e 50%), em exposição *in situ* durante três meses. A resposta de *T. pallida* se mostrou mais sensível que o clone 4430.

Os resultados indicaram que a exposição dos organismos, a longo prazo, parece mais efetiva que intoxicações feitas em laboratório, devido ao tempo de exposição, indicando que a vantagem de utilizar plantas em campo é simular a situação real. Fomin (1999) mostrou que, em exposição a extratos aquosos, a absorção de metais genotóxicos pelas plantas depende diretamente do pH das soluções e, assim, seu efeito pode ser minimizado quando incorporados ao solo (MIELLI et al., 2009).

5. CONCLUSÃO

Tendo em vista a grande aplicabilidade do organismo-teste *Tradescantia* e seus diferentes *endpoints*, pode-se concluir que este vegetal constitui valiosa ferramenta de monitoramento ambiental, devido a sua comprovada sensibilidade. Soma-se a isto os resultados similares encontrados em outros sistemas-teste bem estabelecidos para tal aplicação.

Os bioensaios Trad-MCN e Trad-SHM firmaram posição de destaque nas décadas de 80 e 90, sendo amplamente empregados em diversas partes do mundo e em diferentes aplicações, tanto por exposição em campo quanto para ensaios laboratoriais. Dessa forma, este organismo contribuiu, em grande monta, para o progresso das descobertas na área da genética toxicológica, evidenciando, em alguns casos, os mecanismos de ação de compostos até então desconhecidos. Não obstante, nota-se um avanço do emprego de

técnicas moleculares atreladas ao bioensaio de micronúcleo, no sentido de elucidar questões que ainda permanecem obscuras acerca da relação da indução de micronúcleos com os diferentes tipos de mutação.

Entretanto, como todo organismo, existem fatores que devem ser considerados durante a execução do experimento, principalmente, quando se consideram as exposições em campo, uma vez que estudos comprovam que fatores ambientais variáveis como umidade e temperatura, por exemplo, podem induzir a resultados falso-positivos, isto é, podem aumentar a taxa basal de alterações e, conseqüentemente, alterar a sensibilidade do organismo ao agente objeto principal do estudo. Sendo assim, faz-se necessário a padronização das técnicas de execução dos bioensaios para suas diversas vias de exposição. Além disso, deve-se ter certa cautela para extrapolação dos dados obtidos pelo bioensaio em sistema vegetal na correlação aos efeitos em seres humanos, uma vez que existem diferentes rotas metabólicas e mecanismos de defesa aos agentes extrínsecos.

O organismo-teste *Tradescantia* é especialmente indicado para aplicação em países em desenvolvimento, pois oferece vantagens quanto aos cuidados simples de manutenção e relativo baixo custo de execução do experimento. Além disso, os micronúcleos nas células mãe do grão de pólen, bem como a coloração rósea do pêlo estaminal são facilmente observáveis, diminuindo o grau de incerteza durante a avaliação dos testes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATALHA, J. R. F. et al. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo Brazil using the *Tradescantia* micronuclei assay. **Mutation Research**, v. 426, p. 229-232, 1999.

BIAGINI, F. R.; DAVID, J. A. O.; FONTANETTI, C.S. The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. **Micron**, v. 40, p. 839-844, 2009.

BIANCHI, J. **Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inceticida Malation, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e células de mamíferos.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro-SP, 165p., 2008.

CABRERA, G. I.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research**, v. 426, p. 211-214, 1999.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Introduction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722-725, 2008.

CARRERAS, H. A.; PIGNATA, M. L.; SALDIVA, P. H. N. *In situ* monitoring of urban air in Córdoba, Argentina using the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassay. **Atmospheric Environmental**, v. 40, p. 7824-7830, 2006.

CARVALHO, H. A. A *Tradescantia* como Bioindicador Vegetal na Monitoração dos Efeitos Clastogênicos das Radiações Ionizantes. **Radiologia Brasileira**. São Paulo-SP, v.38, p. 459-462, 2005.

CEBULSKA-WASILEWSKA, A. *Tradescantia* stamen-hair mutation bioassay on the mutagenicity of radioisotope-contaminated air following the Chernobyl nuclear accident one year later. **Mutation Research**, v. 270, p. 23-29, 1992.

CÉSNIENÉ, T. et al. Soil-surface genotoxicity of military and urban territories in Lithuania, as revealed by *Tradescantia* bioassays. **Mutation Research**, v. 697, p.10-18, 2010.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; DAVID, J. A.; FONTANETTI, C. S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): a methodological comparison. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p.155-158, 2009.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J-F.; FÉRARD, J-F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, p.167-171, 1999.

DAVID, J. A. O.; HOSHINA, M. M.; FONTANETTI, C. S. DNA damages in *Mytella falcata* (Mytiloidea, Mitilidae) cells: a new tool for biomonitoring studies in tropical estuarine eco systems. **Naturalia**, v. 31, p. 1-7, 2008.

FISKESJÖ, G. The *Allium* Test – a Potential Standart for the Assesment of Environmental Toxicity. **Environmental Toxicology Risk Assesment**, v.2, p. 331-345, 1993.

FOMIN A.; PASCHKE, A.; ARNDT, U. Assessment of the genotoxicity of mine-dump material using the *Tradescantia*-stamen hair (Trad-SHM) and the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassays. **Mutation Research**, v.426, p. 173-181, 1999.

GONG, P.; KUPERMAN, R. G.; SUNAHARA, G. I. Genotoxicity of 2,4- and 2,6-dinitrotoluene as measured by the *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) bioassay. **Mutation Research**, v. 538, p.13-18, 2003.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310; p. 175-185, 1994.

HEDDLE, J. A.; CARRANO A. V. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by g-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. **Mutation Research**, v.44, p.63–69, 1977.

HOPKER P. K.; PLEWA, M. J.; JOHNSTON. J. B.; WEAVER, D.; WOOD, S.G.; LARSON, R.A.; HINESLY, T.; Multi-technique screening of Chicago municipal sewage sludge for mutagenic activity. **Environmental Science Technology**, v. 16, p.140–147, 1982.

HOSHINA, M. M., MARIN-MORALES, M. A. Using the comet assay in *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Journal of the Brazilian Society Ecotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 75-79, 2010.

ICHIKAWA, S. *In situ* monitoring with *Tradescantia* around nuclear power plants. **Environmental Health Perspectives**, v. 37, p.145-164, 1981.

ICHIKAWA, S. et al. Yearly variation of spontaneous somatic mutation frequency in the stamen hairs of *Tradescantia* clone UK 9 grown outdoors, which showed a significant increase after the Chernobyl accident. **Mutation Research**, v.349, p. 249-259, 1996.

ISIDORI, M.; FERRARA, M.; LAVORGNA, M.; NARDELLI, A.; PARRELLA, A. *In situ* monitoring of urban air in Southern Italy with the *Tradescantia* micronucleus bioassays and semipermeable membrane devices (SPMDs). **Chemosphere**, n. 52, p.121-126, 2003.

JORGE, M. P. M. et al. **Biomonitoramento da qualidade do ar e educação ambiental: Relato da experiência em São José dos Campos**. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). São José dos Campos, São Paulo, 04 p., 2007.

KLUMPP, A. et al. Influence of climatic conditions on the mutations in pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and implications for the Trad-MCN bioassay protocol. **Hereditas**, n. 141, p.142-148, 2004.

KNASMÜLLER, S. et al. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. **Mutation Research**, v. 420, p. 37-48, 1998.

KNASMÜLLER, S. **Tradescantia SHM assay**. In.: Workshop on plant for the detection of mutagens and carcinogens in the environment. Piracicaba: CENA-USP, 2006. 1CD-Rom. Apresentação em Power Point.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – A case study. **Mutation Research**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LEWINSKA, D. et al. Increased incidence of micronuclei assessed with the micronucleus assay and the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique in peripheral blood lymphocytes of nurses exposed to nitrous oxide. **Mutation Research**, n. 581, p.1-9, 2005.

MA, T. H. **Tradescantia micronuclei (Trad-MCN) test for environmental clastogens**. In: Kolber, A. R.; Wong, T. K.; Grant, L. D.; DeWoskin, R. S.; Hughe, S. T. J., (Ed). In Vitro Toxicity Testing of Environmental Agents. Current and Future Possibilities. Part A: Survey of Test Systems. Nova Iorque. p. 191-214, 1983.

MA, T. H. et al. The Improved *Allium/Vicia* Root Tip Micronucleus Assay for Clastogenicity of Environmental Pollutants. **Mutation Research**, v. 334 (2), p. 185- 195, 1995.

MA, T. H.; CABRERA, G. L.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; CHEN, R.; LOARCA, F.; VANDENBERG, A. L.; SALAMONE, M. F. *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. **Mutation Research**, v. 310, n. 2, p.221-230, 1994.

MA, T. H.; XU, C.; LIAO, S.; MCCONNELL, H.; JEONG, B. S.; WON, C. D. In situ monitoring with the *Tradescantia* bioassays on the genotoxicity of gaseous emissions from a closed landfill site and an incinerator. **Mutation Research**, v.359, p. 39-52, 1996.

MAJER, B. J. et al. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. **Mutation Research**, n. 515, p.111-124, 2002.

MAJER, B.; GRUMMT, T.; UHL, M.; KNASMÜLLER, S. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. **Acta Hydrochim. Hydrobiol**, n 33, v 1, p 45-55, 2005.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTII, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MAZZEO, D. E. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BETX, antes e após o processo de biorremediação por microrganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro-SP, 144p., 2009.

MAZIVIERO, G. T.; FERREIRA, A. L. M. **Implantação do bioensaio de genotoxicidade com *Tradescantia pallida* do material particulado inalável.** Trabalho de Graduação Interdisciplinar. Limeira, SP, Centro Superior de Educação Tecnológica. Universidade Estadual de Campinas. 72 p., 2007.

MEIRELES, J.; ROCHA, R.; NETO, A. C.; CERQUEIRA, E. Genotoxic effects of vehicle traffic pollution as evaluated by micronuclei test in *Tradescantia* (Trad-MCN). **MutationResearch**, v.675, p.46-50, 2009.

MIELLI, A. C.; MATTA, M. E. M.; NERSESYAN, A.; SALDIVA, P. H. N.; UMBUZEIRO, G. A. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. **Mutation Research**, v.672, p.51-54, 2009.

MINOUFLET, M.; AYAUULT, S.; BADOT, P-M.; COTELLE, S.; FERARD, J-F. Assessment of the genotoxicity of ^{137}Cs radiation using *Vicia*-micronucleus, *Tradescantia*-micronucleus and *Tradescantia*-stamen-hair mutation bioassays. **Journal of Environmental Radioactivity**, v.81, p.143-153, 2005.

MOHAMMED, K. B.; MA, T. H.; *Tradescantia*-micronucleus and –stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides. **Mutation Research**, v.426, p. 193-199, 1999.

MONARCA, S. et al. Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using in situ plant tests. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, n. 41, p.353-359, 2003.

MONARCA, S. et al. Genotoxicity of Drinking Water Disinfectants in Plant Bioassays. *Environmental And Molecular Mutagenesis*, v. 46, p.96-103, 2005.

NAYAR, G. G.; SPARROW, A. H. Radiation-induced somatic mutations and the loss of reproductive integrity in *Tradescantia* stamen hairs. **Radiation Botany**, v.7, p.257-267, 1967.

PEDRO, J. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênico do inseticida Fipronil (Regente), usando sistema teste *Allium cepa***. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro-SP, 117p., 2008.

PRINTES, L. B. **Biomarcadores: Bases e Aplicações**. Mini Curso 4. IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. São Pedro-SP, 26p., 2006.

RODRIGUES, G. S. **Bioensaios de toxicidade genética com plantas superiores *Tradescantia* (MCN e SHM), milho e soja**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, São Paulo, 56p., 1999.

RODRIGUES, G. S., Ma, T.H., PIMENTEL, D., WEINSTEIN, L. H. *Tradescantia* Bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. **Critical Reviews Science**. Jaguariuna-SP, v.16, p. 325-359, 1997.

RODRIGUES, G. S.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L. H.. In situ assessment of pesticide genotoxicity in an integrated pest management program I-*Tradescantia* micronucleus assay. **Mutation Research**, n. 412, p.235-244, 1998.

SANT'ANNA, E. T. G. **Poluição atmosférica urbana na cidade de São Paulo e mutagênese: Avaliação de riscos utilizando-se bioindicadores vegetais do gênero *Tradescantia***. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 150 p., 2003.

SAVAGE, J. R. K.; PAPWORTH, D. G. An investigation of LET 'finger-prints' in *Tradescantia*. **Mutation Research**, v.422, p. 313-322, 1998.

SAVÓIA, E. J. L. **Potencial de *Tradescantia pallida* cv. *Purpurea* para biomonitoramento da poluição aérea de Santo André – São Paulo, por meio do bioensaio Trad – MCN e do acúmulo foliar de elementos tóxicos**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 118p., 2007.

SAX, K.; EDMONDS, H. W. Development of the male gametophyte in *Tradescantia*. **Botanical Gazette**, v.95, p.156-163, 1933.

SHIMA, N.; XIAO, L. Z.; SAKURAMOTO, F.; ICHIKAWA, S. Young inflorescence-bearing shoots with roots of *Tradescantia* clone BNL 4430 cultivated on nutrient solution circulating systems: an alternative to potted plants and cuttings for mutagenicity tests. **Mutation Research**, v.395, p. 199-208, 1997.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, v. 605, p. 87-93, 2006.

STEINKELLNER, H.; KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S. *Tradescantia*-micronucleus assay for the assessment of the clastogenicity of Austrian water. **Mutation Research**, v.426, p.113-116, 1999.

TUCKER, J. D.; PRESTON, J. R. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. **Mutation Research**, v. 365, p.147-159, 1996.

VENTURA, B. C.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Evidences of mutagenic and genotoxic action of the atrazine herbicide using *Oreochromis niloticus* as test system. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.90, p. 42-51, 2008.

VENTURA, B. C. **Investigação da mutagenicidade do azocorante comercial BDCP (Black Dye Commercial Product), antes e após tratamento microbiano, utilizando o sistema-teste de *Allium cepa***. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro-SP, 205p., 2009.

VILLALOBOS-PIETRINI, R. et al. Genetic effects observed in tetrads of *Tradescantia* induced by radon. **Mutation Research**, n. 426, p.215-219, 1999.

XIAO, L. Z.; ICHIKAWA, S. Antagonistic effects of ethyl methanesulfonate and maleic hydrazide in inducing somatic mutations in the stamen hairs of *Tradescantia* clone BNL 4430. **Genes Genetical Systems**, n. 73, p.287-292, 1998.

XU, Z.; MA, T-H. Clastogenicity of formaldehyde fumes and X-rays evaluated by the *Tradescantia* micronucleus assay. **Environmental And Experimental Botany**, n. 39, p.169-175, 1998.

WHITE, P. A.; CLAXTON, L. D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation Research**, v.567, p.227-345, 2004.

YANG, G. *Tradescantia*-micronucleus assay on the water quality of lake Hongzhe in Jiangsu Province, China. **Mutation Research**, n. 426, p.155-157, 1999.

ARTIGO 2

Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de lodo de esgoto por meio dos sistemas-teste *Allium cepa* e *Tradescantia pallida*

GUILHERME THIAGO MAZIVIERO, CARMEM SILVIA FONTANETTI

UNESP – Instituto de Biociências, Laboratório de Mutagênese, Departamento de Biologia

e-mail: fontanet@rc.unesp.br

RESUMO

Atualmente, um problema ambiental muito sério, observado em regiões metropolitanas e em cidades de porte médio que implantaram sistemas de tratamento de esgoto sanitário é relativo ao destino dos lodos produzidos em suas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), que é bastante oneroso, podendo chegar a 50% do custo operacional. A adição ao solo parece ser a melhor opção sob o ponto de vista econômico e ambiental. Todavia, o lodo de esgoto pode conter substâncias tóxicas, estar contaminado com metais e até mesmo por compostos químicos persistentes, sendo assim, a disposição inadequada do lodo pode fazer tais poluentes retornarem ao ambiente e, eventualmente, entrar na cadeia alimentar, caso sejam absorvidos pelas plantas. Tendo em vista tal problemática, o monitoramento do lodo gerado nas ETEs é de suma importância, principalmente quanto à presença de metais. Logo, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do lodo gerado em uma ETE do interior do estado de São Paulo, por meio dos sistemas-teste *Allium cepa* e *Tradescantia pallida*. Estas avaliações foram feitas através da exposição dos organismos-teste ao lodo de esgoto bruto e solubilizado. Os resultados alertam sobre a necessidade de cuidado na disponibilização deste tipo de resíduo em solos. O biomonitoramento permite a detecção qualitativa dos efeitos de misturas complexas, mesmo para compostos em baixas concentrações, fato que pode auxiliar nas tomadas de decisões quanto à disposição adequada do resíduo gerado, alimentando a base de dados sobre o tema, que se encontra em estágio inicial no Brasil.

Palavras-chave: ETE, aberrações cromossômicas, micronúcleo, Trad-MCN.

1. INTRODUÇÃO

O lodo de esgoto apresenta-se tipicamente com 98% de água. Dos sólidos contidos, 70 a 80% são matéria orgânica, incluindo óleos e graxas (DAMASCENO; CAMPOS, 1998). A maior preocupação com esse lodo se restringe à estabilização e secagem, visando atingir um teor de sólidos entre 15% a 40%, para a sua retirada da ETE, normalmente, seu destino é a disposição do lodo desaguado em aterro sanitário (TSUTIYA et al., 2001).

Quanto à qualidade dos lodos, além de sua composição química resultante da presença ou não de despejos industriais no esgoto tratado, e da qualidade bacteriológica deve-se ter cuidado especial com seu condicionamento. Com o processo de estabilização adequado, a decomposição do lodo no solo produz agentes complexantes que facilitam a movimentação de fosfatos combinados com ferro e alumínio, além de permitir melhor aproveitamento dos nutrientes pelas plantas em decorrência da lenta liberação dos mesmos por meio do processo de mineralização da matéria orgânica. Esse aspecto mereceu a atenção de agrônomos envolvidos em estudos de uso de lodo de esgoto na agricultura desde a década passada (TSUTIYA et al., 2001).

O conhecimento dos agentes químicos presentes no lodo permite avaliar o risco de contaminação alimentar e ambiental decorrente da utilização de lodos como fertilizantes agrícolas, também chamados de biossólidos. Entretanto estudos relatam que efeitos adversos em sistemas biológicos, tais como genotoxicidade e carcinogenicidade, têm sido atribuídos a metais e poluentes orgânicos presentes no lodo (PARAIBA et al., 2007).

Neste sentido, os testes biológicos são indispensáveis para a avaliação de reações de organismos vivos à poluição ambiental complexa e para indicação dos potenciais efeitos sinérgicos de vários poluentes, uma vez que biomonitoramento permite a detecção qualitativa dos efeitos de misturas complexas, mesmo para compostos em baixas concentrações, enquanto as análises físico-químicas identificam a presença e as respectivas concentrações de diferentes poluentes (SOUZA et al., 2006).

Sendo assim, a utilização de vegetais superiores é uma técnica pertinente para o monitoramento ambiental por apresentar grande sensibilidade, baixo custo e fácil manuseio (RODRIGUES, 1999). Dentre os

vegetais superiores a espécie *A. cepa* é o vegetal mais utilizado na determinação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de inúmeras substâncias (FERNANDES et al. 2009; MAZZEO et al. 2010; VENTURA et al. 2008). Tal sensibilidade é atribuída por MA et al. (1995), devido ao grande tamanho dos cromossomos e por serem metacêntricos em sua maioria. Sua característica de cinética celular propicia rápido crescimento das raízes, justamente pelo grande número de células em divisão. Além disso, espécies do gênero *Allium* possuem grande tolerância a diversas condições de cultivo, são disponíveis o ano todo, apresentam fácil manuseio e possuem poucos cromossomos ($2n=16$). Sendo assim, o registro da atividade mitótica e de anormalidades no ciclo celular das células meristemáticas de suas raízes pode ser facilmente visualizado (GRANT, 1994; LEME, MARIN-MORALES, 2008).

Da mesma forma, a *Tradescantia pallida*, é uma planta que apresenta fácil adaptação em qualquer ambiente e pode ser cultivada em qualquer parte do mundo. O ensaio do micronúcleo em célula mãe do grão de pólen de *Tradescantia* (Trad-MCN) é um teste de mutação em célula germinativa extremamente sensível, de exposição curta, avaliação simples e as plantas podem ser diretamente expostas ao contaminante, sem qualquer diluição ou filtração da amostra (STEINKELLNER et al., 1999). Dados obtidos em experimentos com esse vegetal são, em geral, consistentes, precisos e confiáveis, indicando resultados similares aos testes com cultura de células de mamíferos e bactérias (CARVALHO, 2005).

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo investigar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do lodo de esgoto gerado por uma ETE do interior do estado de São Paulo, pertencente à bacia hidrográfica dos rios Piracicaba Capivari e Jundiaí (PCJ-UGRHI-5), mediante ensaio de micronúcleo com *Tradescantia pallida* (TRAD-MCN) e o teste de aberrações cromossômicas, micronúcleo e morte celular com *Allium cepa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização do Local de Estudo: O município é localizado no interior do estado de São Paulo (Figura 1) e pertence à sub-bacia do rio Atibaia. A cidade possui uma população de 126.614 habitantes, cuja

distribuição é predominantemente urbana (IBGE, 2010). A ETE possui vazão média de operação de 90 L/s e conta com o processo de tratamento por batelada e o lodo gerado é desaguado por centrífuga, conferindo ao mesmo, teor de sólidos de aproximadamente 20% (MORIYAMA, 2008). O esgoto gerado possui característica predominantemente doméstica, sendo desprezível a contribuição industrial. A autarquia responsável pela administração dos serviços de saneamento do município tem o objetivo de realizar a disposição agrícola do lodo de esgoto devido à grande demanda de produção de plantas ornamentais na região.

Coleta e análise das amostras: As coletas do lodo de esgoto foram realizadas em abril de 2009 e maio de 2010 de acordo com os procedimentos estabelecidos pela ABNT-NBR 10007 (2004) - Procedimentos para Amostragem de Resíduos. O resíduo foi acondicionado em containers de plástico, com capacidade de 9L e armazenados em câmara fria, à 4°C até o início dos experimentos.

A solubilização das amostras seguiu a norma ABNT-NBR 10006 (1987) - Solubilização de Resíduos. Pesou-se 250 gramas de lodo (base seca) adicionado a 1 litro de água destilada sob agitação mecânica por 5 minutos. Após esse período a solução foi deixada em repouso por sete dias, em seguida filtrou-se a fase líquida em membrana com porosidade de 0,45 µm para obtenção do solubilizado.

A determinação dos parâmetros físico-químicos da amostra referente aos dados de macro e micronutrientes, teor de matéria orgânica, pH e metais pesados foi realizada por laboratórios credenciados (ICASA e GRANDIS). As amostras foram enviadas para análise no dia seguinte à coleta, e a determinação de metais foi realizada por Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES).

Bioensaio em *Allium cepa*: O bioensaio em sementes do sistema-teste *A. cepa* em região meristemática foi executado em tratamento contínuo seguindo-se o protocolo de Grant (1982). Foram realizados tratamentos das sementes com o lodo bruto e solubilizado; o controle negativo foi feito com água destilada e os positivos com o herbicida trifluralina à 0.84 ppm (FERNANDES et al., 2007) e metilmetano sulfonato (MMS) à 0,127 µL. O potencial citotóxico foi avaliado por meio do cálculo do índice mitótico (IM) e

morte celular (MC). O potencial genotóxico foi avaliado pelo teste de aberrações cromossômicas (AC). Micronúcleos (MN) e quebras cromossômicas (QC) foram quantificados para a avaliação da atividade mutagênica dos tratamentos. A região subsequente ao meristema, denominada F1, também foi avaliada pela contagem de micronúcleo de modo a estabelecer comparações com os resultados mutagênicos da região meristemática e do Trad-MCN. Foram contabilizadas 5.000 células por tratamento.

Bioensaio em *Tradescantia pallida* (TRAD-MCN): Cerca de 15 ramos florais de *T. pallida* contendo inflorescências jovens foram expostas à amostras de lodo de esgoto bruto e solubilizado por 8 horas, seguidas de 24 horas de recuperação; o controle negativo foi feito com água destilada; todos os tratamentos ocorreram sob aeração constante conforme sugerido por Lobo (2003). Após a recuperação, as inflorescências foram fixadas em Carnoy I por 48 horas. O teste com *T. pallida* foi realizado de acordo com Ma (1981). O potencial mutagênico foi avaliado de acordo com a frequência de micronúcleo observada nas células mãe do grão de pólen em estágio de tétrade. Foram contabilizadas 3.000 células por tratamento.

Análise estatística: Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para a análise estatística foi realizado o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

3. RESULTADOS

Análises físico-químicas

Os dados obtidos nas análises físico-químicas estão representados na Tabela 1.

Os resultados das amostras avaliadas indicam que todos os metais avaliados se apresentam em concentrações bem inferiores ao limite preconizado pela Resolução CONAMA 375.

Análise do potencial citotóxico genotóxico e mutagênico

Bioensaio em região meristemática de *A. cepa*: No bioensaio com *A. cepa*, observou-se inibição da germinação das sementes na exposição ao lodo bruto, logo, os resultados de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade

na Tabela 2, referem-se apenas ao solubilizado e aos controles positivo e negativo.

Não foi evidenciado potencial citotóxico nas amostras analisadas, uma vez que os testes de IM e MC não apresentaram valores estatisticamente significativo em relação ao controle negativo (Tabela 2).

Quanto ao teste de AC, pode-se notar que os tratamentos com lodo solubilizado apresentaram efeito genotóxico em relação aos controles negativos. Em relação à amostra de 2009, observa-se que o efeito genotóxico foi similar ao controle com MMS, enquanto para o teste realizado no ano seguinte, a indução de aberrações cromossômicas foi superior ao controle com metilmetano sulfonato, apesar de não apontar relação estatisticamente significativa entre eles (Tabela 2).

Para MN+QC, é possível observar que a amostra de 2009 foi estatisticamente significativa apenas para o controle positivo-MMS, enquanto que a trifluralina e a solução de lodo apresentaram índices similares ao controle negativo. Já para o ensaio realizado em 2010, todos os tratamentos apresentaram diferença estatística em relação ao controle negativo, evidenciando atividade mutagênica da solução de lodo de esgoto, superando inclusive o controle positivo trifluralina.

As alterações mais encontradas foram: micronúcleo e quebra cromossômica (*endpoints* de mutagenicidade), broto celular, ponte cromossômica, núcleo lobulado e aderência cromossômica (*endpoints* de genotoxicidade), as quais estão representadas na Tabela 3. Foram observadas ainda: c-metáfases, células multipolares e poliplóides, porém em menor frequência (Figura 2). De acordo com os dados da Tabela 3 é possível observar que todos os *endpoints* apresentaram resultados estatisticamente significativo em ao menos uma das amostras avaliadas.

Bioensaio em região F_1 de *A. cepa*: De acordo com a Tabela 4 é possível observar que todos os tratamentos apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, evidenciando atividade mutagênica das soluções. Em relação à amostra de abril de 2009 para o teste em F_1 observa-se que o lodo de esgoto solubilizado apresentou comportamento similar ao do controle positivo trifluralina. Com relação à amostra de maio de 2010, o solubilizado apresentou maior mutagenicidade que

os controles positivos, apesar dessa atividade não ser evidenciada estatisticamente no teste em F_1 .

Bioensaio Trad-MCN: Para o Trad-MCN pode-se observar que o teste de micronúcleo (Figura 3) apresentou resposta mutagênica bastante superior à taxa basal representada pelo controle negativo (Tabela 4).

4. DISCUSSÃO

Análises físico-químicas

A matéria orgânica (MO) desempenha importante papel nas características químicas, físicas e microbiológicas do solo, sendo responsável por mais de 70% da capacidade de troca catiônica (CTC) dos solos. A MO do solo é a principal fonte de nitrogênio (N) para as plantas, além de fornecedora de elementos como fósforo e enxofre e de vários micronutrientes. O N, dentre os nutrientes minerais de plantas, é o que mais limita a produtividade agrícola por fazer parte da estrutura de grande número de compostos vitais aos vegetais. Suas formas orgânicas constituem 95% ou mais do total presente na camada arável.

Dentre os nutrientes existentes na MO, o nitrogênio destaca-se com maior ênfase no processo de mineralização, visto que a grande maioria deste elemento é absorvida na forma inorgânica, sob sua forma hidrolisada do íon amônio (NH_4^+), e principalmente, o produto de sua oxidação, o nitrato (NO_3^-) (COTTA et. al., 2007). As reações de decomposição da MO que dão origem à produção do nitrogênio inorgânico utilizado pelos vegetais dependem, em grande parte, de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade, pH, força iônica e outras características do solo. O nitrogênio é um nutriente que requer atenção, pois se apresenta na maioria das vezes sob formas solúveis, sofrendo lixiviação com rapidez, e dessa forma podem refletir no aumento da contaminação subterrânea (BAYER; BERTOL, 1999).

O NTK indica a concentração de nitrogênio orgânico total e amônia da amostra; de acordo com Von Sperling (1996), a proporção entre as diferentes formas da amônia está intrinsecamente ligada ao pH, obedecendo a seguinte relação:

- $\text{pH} < 8$: Praticamente toda amônia ionizada em NH_4^+ ;

- pH=9,5: Aproximadamente 50% entre NH_3 e NH_4^+ ;
- pH>11: Praticamente toda amônia na forma de NH_3 .

Dessa forma, segundo os dados apresentados na tabela 1, onde o pH de ambas as amostras se encontram abaixo de 8 (6,7 e 6,3), a amônia apresenta-se praticamente na forma ionizada, conseqüentemente, disponível para absorção das plantas.

Campos (1999), afirma que o lodo proveniente do sistema de tratamento de esgoto por batelada é uma mistura de material bastante estabilizado em avançado nível de maturação, com sedimentos orgânicos frescos, recentemente depositados e pouco estabilizados. Sendo assim, os dados obtidos indicam maior maturação do lodo coletado em maio de 2010 em relação à amostra de abril de 2009, uma vez que a concentração de NTK aponta maior carga de nitrogênio orgânico, evidenciando menor grau de oxidação.

Quanto à umidade pode-se observar que o lodo manteve sua característica praticamente constante, indicando o teor de sólidos de aproximadamente 16,5% em detrimento do processo de desaguamento utilizado na ETE, enquanto o teor de matéria orgânica se apresentou bastante elevado, devido à característica predominantemente doméstica do efluente da estação de tratamento, apresentando boas características para aplicação agrícola.

Para Silva et al. (2006), o acúmulo de metais pesados, em função de aplicações de lodo de esgoto é um dos aspectos que causa maior preocupação com relação à segurança ambiental para a viabilização do uso desse resíduo na agricultura. Entretanto, para as análises físico-químicas do ensaio de solubilização das amostras, foi possível observar que as concentrações dos metais analisados não ultrapassaram os limites preconizados pela resolução CONAMA 375, sendo assim, pode-se afirmar que as amostras de lodo avaliadas possuem bom potencial agrícola após estabilização adequada. Deve-se lembrar, portanto, que as análises realizadas referem-se apenas à massa bruta e seu respectivo solubilizado, não obstante, a resolução CONAMA 375 estabelece ainda análises complementares no que diz respeito aos agentes patogênicos (bactérias, ovos de helmintos, *Salmonella* e vírus), os quais estabelecem limites questionáveis por alguns pesquisadores (SAMPALIO,

2010), uma vez que foi estabelecido sem qualquer estudo preliminar. Para outras substâncias orgânicas potencialmente tóxicas (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, poluentes orgânicos persistentes, fenóis clorados, entre outros), a Resolução não impõe limites, mas a quantificação.

Análise do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico

Bioensaio em região meristemática de A. cepa: No bioensaio com *A. cepa*, observou-se inibição da germinação das sementes na exposição ao lodo bruto, provavelmente devido à elevada concentração de amônia, desempenhando potencial tóxico como discutido anteriormente.

O teste de IM demonstrou que todas as amostras apresentaram comportamento similar, não havendo diferença estatisticamente significativa, dessa forma pode-se concluir que o teste é válido, uma vez que, ao contrário do lodo bruto, as soluções não prejudicaram o desenvolvimento celular das sementes de cebola. Comparando-se os tratamentos de abril de 2009 e maio de 2010, não foi possível notar diferença estatisticamente significativa, indicando complementaridade dos dados apresentados. Da mesma forma, Brossi (2008) não observou diferença significativa na frequência do índice mitótico em sementes de *A. cepa*, submetidas à aplicação de doses de lodo de esgoto, indicando que o lodo em questão não causou toxicidade, mas sim promoveu efeito benéfico ao desenvolvimento da planta. O autor atribui o efeito benéfico à grande quantidade de matéria orgânica presente no lodo de esgoto; diante do exposto pode-se afirmar que o lodo avaliado apresenta potencial agrícola.

Os resultados obtidos no teste de AC corroboram os de Caritá (2007) que observou indução de pontes cromossômicas em *A. cepa* submetido a amostras de lodo de esgoto. Fernandes (2005) afirma que núcleos lobulados podem ser originados a partir de anáfases multipolares portadoras de pontes cromossômicas; uma vez ocorrida a alteração, o processo de divisão nuclear parece não impedir que o envoltório nuclear se reestruture. Sendo assim, o envoltório acompanha a distribuição irregular do material genético na célula e origina o núcleo lobulado. Segundo esse autor, aberrações como perdas e atrasos cromossômicos podem ser derivados de alterações nos microtúbulos, responsáveis pela formação do fuso mitótico, que são responsáveis pela

segregação correta dos cromossomos para as células filhas. De acordo com Brossi (2008) as pontes em anáfase podem ser formadas como consequência da aderência cromossômica, porém, o evento de aderência cromossômica foi pouco observado no presente estudo.

Segundo Matsumoto et al. (2006) a ação clastogênica leva a formação de micronúcleos através de quebras cromossômicas durante a divisão celular. Já a ação aneugênica é responsável pela inibição da formação do fuso mitótico, ocorrendo perda por cromossomos inteiros. Como foram encontradas tanto quebras quanto perdas cromossômicas não é possível atribuir o mecanismo de ação do lodo avaliado a partir do teste de aberrações cromossômicas sendo necessário, para tanto, o emprego de técnicas moleculares.

Bioensaio em região F_1 de *A. cepa*: A região F_1 caracteriza-se por células resultantes da diferenciação celular das células meristemáticas (MA; XU, 1986); portanto, as lesões induzidas nas células da região meristemática, quando não corrigidas e/ou corrigidas erroneamente, podem fixar-se sob forma de micronúcleo na região F_1 . Logo, este teste apresenta a confirmação do efeito mutagênico do lodo solubilizado em *A. cepa*.

Com base nos efeitos genotóxico/mutagênico evidenciados pelo teste de aberrações cromossômicas e mutagenicidade em região meristemática, reforçados pelos resultados em F_1 , pode-se afirmar que o mecanismo de reparo celular não foi capaz de reverter a mutação causada pelo agente exposto durante o processo de divisão, dessa forma, as taxas de micronúcleo em F_1 mostraram-se superiores às encontradas em região meristemática.

Bioensaio Trad-MCN: Quando comparado ao ensaio em F_1 , é possível constatar que o Trad-MCN apresentou melhor resposta ao solubilizado, tendo em vista as médias apresentadas, mesmo apresentando maior desvio padrão. Além disso, destaca-se o sucesso para o tratamento com o lodo bruto, que inibiu a germinação das sementes de cebola, impossibilitando a análise para este organismo. Ma (1981), atribui maior sensibilidade do Trad-MCN por se tratar de ensaio em células germinativas, mais suscetíveis a lesões cromossômicas se comparadas às células somáticas.

Foi possível observar também que o lodo solubilizado apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao lodo bruto, induzindo

maior mutagenicidade. Logo, deve-se considerar a hipótese de que a substância mutagênica encontra-se na fração solúvel, apresentando riscos potenciais à contaminação ambiental devido à mobilidade por meio da percolação e carreamento.

5. CONCLUSÃO

Quando comparados os resultados obtidos nos bioensaios com as análises físico-químicas não é possível estabelecer relação de causa e efeito com nenhum composto em específico, uma vez que todos os parâmetros avaliados se encontram dentro dos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 375, apresentando potencial agrícola se tratado adequadamente, no entanto, ambos os organismos apresentaram respostas genotóxicas e mutagênicas estatisticamente significativas para as amostras.

Sabe-se que o lodo de esgoto é uma mistura complexa, de composição variada de acordo com o tipo de efluente que o origina e do processo de tratamento empregado, sendo assim, a caracterização físico-química torna-se essencial de modo a conhecer a composição do lodo gerado. Da mesma maneira, a caracterização microbiológica do material gerado desempenha sua importância do ponto de vista epidemiológico de modo a balizar sua disposição segura do ponto de vista sanitário.

De acordo com os dados apresentados, é possível afirmar que ensaios de toxicidade genética com vegetais superiores podem ser empregados para o monitoramento do lodo em solos agrícolas em complementaridade às análises físico-químicas e microbiológicas, podendo evidenciar um efeito preditivo, e conseqüentemente a possível assimilação de determinada substância pelas culturas expostas ao bio-sólido, reduzindo de sobremaneira o tempo de análise dos ensaios toxicológicos de exposição crônica convencionais, mesmo para substâncias presentes em baixas concentrações. Além disso, os testes de genotoxicidade são técnicas simples, precisas e de custo relativamente baixo.

6. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio do SAAE-Atibaia, pelo fornecimento das amostras de lodo, à Prof. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis que cedeu o laboratório para realização dos ensaios, à Cintya A. Christofolletti, Janaína Pedro Escher, Sandra Veloso e Tatiana Silva Souza, pela ajuda durante a realização dos ensaios.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – NBR 10006. **Solubilização de Resíduos**. Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1987.

BAYER, C.; BERTOL, I. Características químicas de um cambissolo húmico afetadas por sistemas de preparo, com ênfase à matéria orgânica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, p.687-694, 1999.

BROSSI, M. J. L. **Ecotoxicologia de um sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto**. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 87p., 2008.

CAMPOS, J.R. **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. Rio de Janeiro; ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária; PROSAB – Programa de Pesquisa em Saneamento Básico. 443p., 1999.

CARITÁ R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de lodos provenientes de estações de tratamento de esgoto de grandes centros urbanos do estado de São Paulo, pela metodologia de aberrações cromossômicas em *Allium cepa***. Monografia – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 190p., 2007.

CARVALHO, F. G.; JABLONSKI, A., TEIXEIRA, E. C. Estudo das Partículas Totais em Suspensão e Metais Associados em Áreas Urbanas. **Química Nova**, v. 23, p.614-617, 2000.

CARVALHO, H. A. A *Tradescantia* como Bioindicador Vegetal na Monitoração dos Efeitos Clastogênicos das Radiações Ionizantes. **Radiologia Brasileira**, v.38, p. 459-462, 2005.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 375 de 19 de agosto de 2006. **Critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados**. Brasília-DF, 32p., 2006.

COTTA, J. A. O.; SALAMI, F. M.; MARQUES, A. R.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D. Validação do método para determinação de Nitrogênio Kjeldahl Total. **Revista Analytica**, n. 26, p. 68-75, 2007.

DAMASCENO, S; CAMPOS, J. R. Caracterização de lodo de estação de tratamento de esgotos sanitários para uso agrícola. **Asociación Peruana de Ingenierya Sanitaria y Ambiental**; AIDIS. Gestión ambiental em el siglo XXI. Lima, APIS, 1998.

FERNANDES, T. C. C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos de herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 212p., 2005.

FERNANDES, T.C.C; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n.3, p. 252-259, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1680-1686, 2009.

GRANT, W. F. Chromosome Aberration Assays in *Allium* – A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310; p. 175-185, 1994.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Disponível em: www.ibge.gov.br. 2010.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – A case study. **Mutation Research**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LOBO, D. A. **Manual prático para utilização de *Tradescantia* como biomonitor**. Escola de Medicina USP, São Paulo, 29p., 2003.

MA, T. H. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for *in situ* monitoring and mutagen screening. **Environmental Health Perspectives**, n. 37, p. 85-90, 1981.

MA, T. H. et al. The Improved *Allium/Vicia* Root Tip Micronucleus Assay for Clastogenicity of Environmental Pollutants. **Mutation Research**, v. 334 (2), p. 185- 195, 1995.

MA, T.H.; XU, Z. Validation of a new protocol of the *Allium* micronucleus test for clastogens. **Environmental Mutagenesis**, v.8, n.6, p.65-66, 1986.

MATSUMOTO, S. T. et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bactéria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v. 47, p. 1255-1264, 2010.

MORIYAMA, M. **Modelo de Gestão – SAAE Atibaia/SP**. Apresentação Didática, 2008.

PARAIBA, L. C.; BOEIRA, R. C.; JONSSON, C. M. **Fator de Bioconcentração de Poluentes de Lodo em Laranjeiras**. Comunicado técnico 43, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Jaguariúna, 7p., 2007.

RODRIGUES, G. S. **Bioensaios de toxicidade genética com plantas superiores Tradescantia (MCN e SHM), milho e soja**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariuna-SP, 30p., 1999.

SAMPAIO, A. O. Adequação das Estações de Tratamento de Esgotos Sanitários à Resolução Número 375 do CONAMA. In: COSCIONE, A., NOGUEIRA, T. A. R., PIRES, A. M. M. **Uso Agrícola de Lodo de Esgoto: Avaliação Após a Resolução nº 375 do CONAMA**. cap. 12, p. 265-280, 2010.

SILVA, C. A.; RANGEL, O. J. P.; BETTIOL, W.; MANZATTO, C. V.; BOEIRA, R. C.; DYNIA, F. Dinâmica de metais pesados em latossolo adubado com lodo de esgoto e em plantas de milho. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. (Eds.) **Lodo de esgoto: impactos ambientais na agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p. 45-77, 2006.

SOUZA, V. H. E.; et al. **Utilização de Testes Citogenéticos para Avaliação de Mutagênese Ambiental**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

STEINKELLNER, H.; KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S. *Tradescantia*-micronucleus assay for the assessment of the clastogenicity of Austrian water. **Mutation Research**, v.426, p.113-116; 1999.

TSUTIYA, M. T. et al. **Biossólidos na Agricultura**. 1ª Ed., SABESP, São Paulo, 468p., 2001.

VENTURA, B. C.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Evidences of mutagenic and genotoxic action of the atrazine herbicide using *Oreochromis niloticus* as test system. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 650, p. 80-86, 2008.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. v.1, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, DESA-UFMG, 2ª Ed, 243 p., 1999.

Tabela 1: Análises físico-químicas das amostras de lodo solubilizado, lodo bruto e limites determinados pela Resolução CONAMA 375 (2006)

METAL	CONAMA 375	Abr/2009	Mai/2010
	LODO SOLUBILIZADO		
	[ppm]		
Arsênio (As)	41	0.19	<LQ
Bário (Ba)	1300	55.12	--
Boro (B)	NE	15	0.096
Cádmio (Cd)	39	0.2	<LQ
Cálcio (Ca)	NE	0.18	12.78
Chumbo (Pb)	300	<0.5	0.01
Cobre (Cu)	1500	<LQ	0.01
Cobalto (Co)	NE	<LQ	<LQ
Cromo (Cr)	1000	10	0.043
Ferro (Fe)	NE	0.26	3.52
Fósforo (P)	NE	5.7	11.8
Manganês (Mn)	NE	32.5	--
Mercúrio (Hg)	17	<0.5	<1
Molibdênio (Mo)	50	--	--
Níquel (Ni)	420	4.6	0.28
Potássio (K)	NE	1100	3029
Selênio (Se)	100	--	--
Zinco (Zn)	2800	215	0.049
PARÂMETRO	LODO BRUTO		
pH	NE	6.7	6.3
Umidade %	NE	83.6	82.6
MO [g.kg ⁻¹]	NE	136.17	360
NTK [g.kg ⁻¹]	NE	75	62

--: Análise não realizada; <LQ: Abaixo do limite de quantificação; NE: Não especificado pela Resolução CONAMA 375; MO: matéria orgânica; NTK: nitrogênio kjeldahl. Análise de metais ICP-OES/SM21-3120 B.

Tabela 2 - Frequência de aberrações cromossômicas (AC), micronúcleo e quebra cromossômica (MN+QC), morte celular (MC) e índice mitótico (IM) obtidos no bioensaio com o sistema teste de *A. cepa*, nas amostras de abril de 2009 e maio de 2010

Amostra	Tratamento	AC	MN+QC	MC	IM
Abr/2009	CN	0,49±0,23	0,85±0,52	0,25±0,21	14,22±2,51
	MMS	1,08±0,45*	4,52±3,66*	0,41±0,32	15,29±1,87
	TRIF	2,34±0,44*	0,81±0,37	0,60±0,42	15,12±2,79
	SOL	1,12±0,41*	0,85±0,52	0,54±0,42	14,02±1,68
Mai/2010	CN	0,27±0,22	0,53±0,32	0,39±0,58	13,79±1,45
	MMS	0,78±0,55*	2,07±0,72*	0,49±0,56	15,03±2,52
	TRIF	2,32±1,06*	1,06±0,52*	0,97±0,94	13,78±3,46
	SOL	1,11±0,51*	1,85±1,34*	0,36±0,49	14,24±2,23

CN: Controle negativo água destilada (H₂O); **MMS:** Controle positivo metilmetano sulfonato [0,127 µL]; **TRIF:** Controle positivo trifluralina [0.84 ppm]; **SOL:** Lodo de esgoto solubilizado; *: Estatisticamente significativo em relação a CN, Kruskal-Wallis (p<0.05).

Tabela 3 - Alterações mais observadas em região meristemática de *A. cepa* nas amostras de abril de 2009 e maio de 2010

Tratamento	MN	Broto	Ponte	Núcleo Lobulado	Quebra	Aderência	Outras Alterações	Células Contabilizadas
<i>Abr/2009</i>								
CN	0,53±3,20	0,09±1,14	0,05±0,69	0,23±0,01	0,03±0,25	0,01±1,05	0,02±0,54	5336
MMS	1,59±2,52*	0,25±2,58*	0,12±1,28*	0,00±0,00*	0,35±0,91*	0,18±2,31*	0,04±1,52	5381
TRIF	0,92±2,71*	0,66±2,21*	0,27±1,44*	0,29±3,11	0,05±0,61	0,36±2,09*	0,12±4,04*	5161
SOL	1,63±7,53*	0,46±0,70*	0,16±0,78*	0,23±1,67	0,1±0,96*	0,07±0,07*	0,03±2,08	5574
<i>Mai/2010</i>								
CN	0,46±1,88	0,14±0,7	0,11±0,48	0,00±0,00	0,01±0,63	0,13±0,42	0,05±0,81	5570
MMS	3,04±3,77*	0,22±1,77*	0,16±0,58*	0,16±0,00*	0,16±0,80*	0,31±0,76*	0,1±4,04*	5397
TRIF	0,32±2,59*	0,25±3,09*	0,21±1,29*	0,69±1,57*	0,09±0,3*	0,23±1,48*	0,16±0,69*	5432
SOL	0,71±2,17*	0,32±1,70*	0,28±0,73*	0,16±1,64*	0,09±0,57*	0,12±0,59	0,02±0,04	5568

CN: Controle negativo água destilada (H₂O); **MMS:** Controle positivo metilmetano sulfonato [0,127 µL]; **TRIF:** Controle positivo trifluralina [0.84 ppm]; **SOL:** Lodo de esgoto solubilizado; **Outras alterações:** c-metáfase, poliploidia e multipolaridade; *: Estatisticamente significativo em relação a CN, Kruskal-Wallis (p<0.05).

Tabela 4 - Teste de micronúcleo em células F_1 de *A. cepa* e em células do grão de pólen de *T. pallida* (Trad-MCN)

Amostra	Tratamento	Média±DP
<i>A. cepa-F1</i>		
Abr/2009	CN	1.60±1.14
	MMS	11.80±3.56*
	TRIF	6.40±2.07*
	SOL	6.20±1.48*
Mai/2010	CN	2.00±0.53
	MMS	4.70±1.33*
	TRIF	3.90±0.99*
	SOL	5.00±1.49*
<i>Trad-MCN</i>		
Abr/2009	CN	2.75±1.38
	MMS	-
	LB	7.77±1.20*
	SOL	12.2±4.36**
Mai/2010	CN	2.71±0.95
	MMS	14.00±2.00*
	LB	8.55±1.01*
	SOL	11.70±2.00**

CN: Controle negativo água destilada (H₂O); **MMS:** Controle positivo metilmetano sulfonato [0,127 µL]; **TRIF:** Controle positivo trifluralina [0.84 ppm]; **SOL:** Lodo de esgoto solubilizado; **LB:** Lodo bruto; *: Estatisticamente significativo em relação a CN, Kruskal-Wallis (p<0.05); **: Estatisticamente significativo em relação à CN e LB, Kruskal-Wallis (p<0.05); -: Análise não realizada.

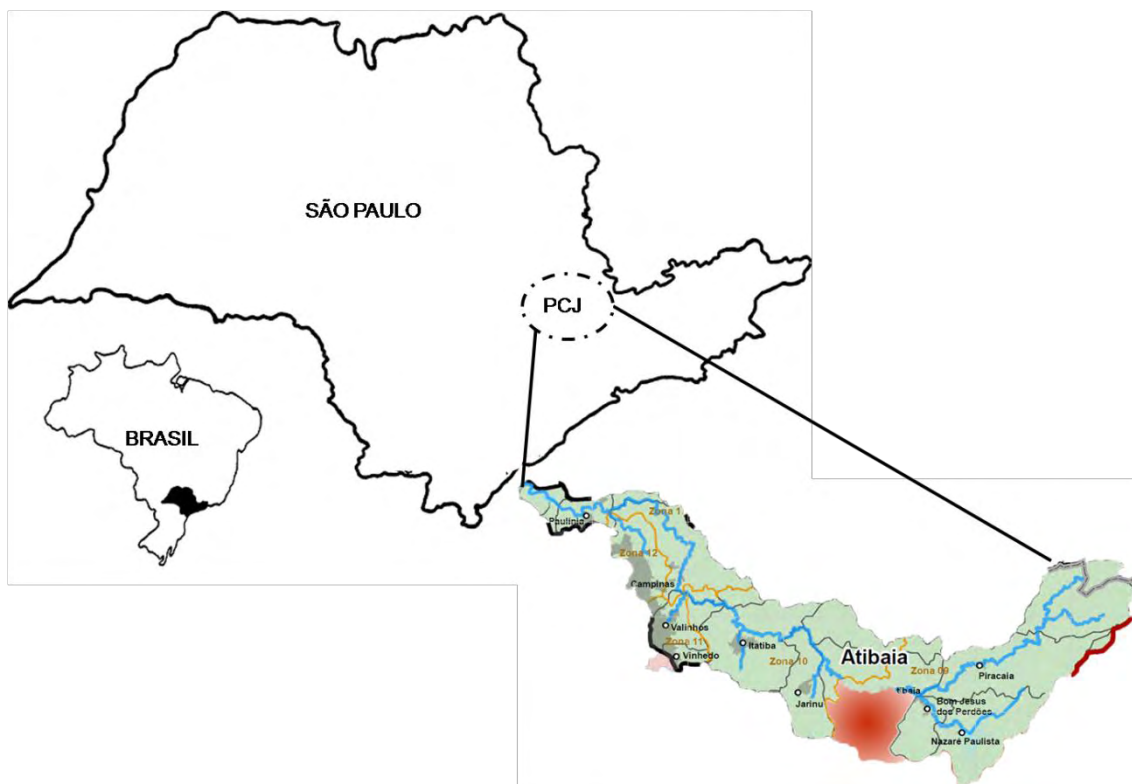


Figura 1 – Localização da área de estudo (Sub-bacia do rio Atibaia). Fonte: adaptado do comitê PCJ.

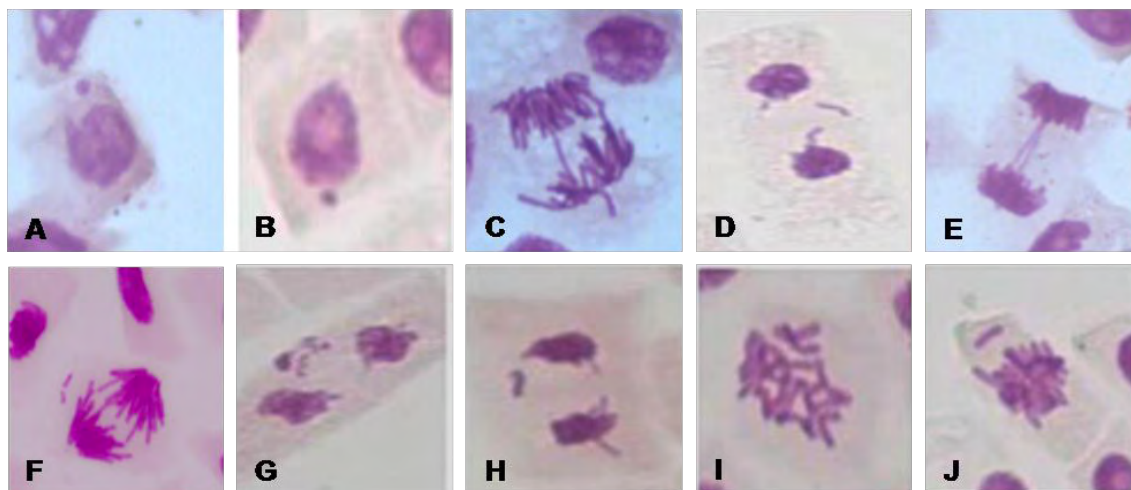


Figura 2 – A e B: células com micronúcleo; **C:** anáfase com ponte; **D:** telófase com perda e atraso cromossômico; **E:** telófase com ponte; **F:** anáfase com fragmento cromossômico; **G:** telófase com fragmento cromossômico; **H:** telófase com perda cromossômica; **I:** C-metáfase; **J:** metáfase com perda cromossômica. Aumento 400x.



Figura 3 - Tétrade de *Tradescantia*; seta: micronúcleo. Aumento 400x.

6. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram utilizados dois organismos vegetais para a avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do lodo de esgoto e seu respectivo solubilizado. Para tanto, foram quantificados micronúcleos em células F_1 de *A. cepa* e *T. pallida* (Trad-MCN) e realizado o teste de aberrações cromossômicas na região meristemática de *A. cepa*.

Na amostra solubilizada foi constatado que o lodo avaliado não apresentou efeito citotóxico, de acordo com o teste de morte celular e índice mitótico em células da região meristemática de *A. cepa*, ao contrário disso, foi possível observar efeito positivo ao desenvolvimento das raízes, provavelmente em detrimento da matéria orgânica como fonte de nutrientes. No entanto, os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade genética foram estatisticamente significativos, indicando efeito genotóxico e mutagênico. A amostra de lodo bruto impediu a germinação das sementes de *A. cepa*, provavelmente devido à alta concentração de amônia.

Com relação ao Trad-MCN foi constatado que o lodo solubilizado induziu maior mutagenicidade em relação ao lodo bruto, dessa forma, é possível concluir que o elemento mutagênico encontra-se na fração solúvel, e assim representa risco de contaminação ambiental, pois pode ser carregado ou percolado, representando uma fonte difusa de contaminação, caso aplicado diretamente ao solo. Fomin (1999) mostrou que, em exposição a extratos aquosos, a absorção de metais genotóxicos pelas plantas depende diretamente do pH das soluções e, assim, seu efeito pode ser minimizado quando incorporados ao solo. Mielli et al. (2009) demonstrou que a exposição dos organismos, em longo prazo, parece mais efetiva que intoxicações feitas em

laboratório, devido ao tempo de exposição, indicando que a vantagem de utilizar plantas em campo é simular a situação real.

Tendo em vista a grande aplicabilidade do organismo-teste *Tradescantia* pode-se concluir que este vegetal constitui valiosa ferramenta de monitoramento ambiental, devido a sua comprovada sensibilidade. A revisão apresentada mostrou que os bioensaios Trad-MCN e Trad-SHM firmaram posição de destaque nas décadas de 80 e 90, sendo amplamente empregados em diversas partes do mundo e em diferentes aplicações.

O objetivo desse estudo não foi identificar os possíveis contaminantes presentes no lodo de esgoto, logo, as análises físico-químicas foram realizadas para comparação da concentração dos metais presentes no lodo com relação à Resolução CONAMA 375, de modo a verificar se o lodo em questão é passível de aplicação agrícola. De acordo com as análises, foi possível verificar que o teor de metais se encontra abaixo dos limites estabelecidos pela Resolução, sendo assim, pelo menos para esse parâmetro, o lodo estudado possui potencial de reuso.

Vale lembrar ainda de que se trata de um estudo pontual, onde foi avaliado o lodo bruto, enquanto a legislação estabelece o tratamento e estabilização prévia do resíduo, o que talvez possa reduzir o efeito genotóxico e mutagênico do lodo em questão. Deve-se ressaltar também que as concentrações de metais apresentadas são aceitáveis pelo CONAMA 375, porém o efeito genotóxico e mutagênico do lodo pode estar relacionado à outros compostos como poluentes orgânicos por exemplo.

De acordo com Harrison et al. (2006) no lodo de esgoto existe uma gama bastante diversificada de grupos químicos (como PCBs, pesticidas, HPAs), enquanto há outros para os quais pouco se tem conhecimento, tais como nitrosaminas. Avaliando os riscos de produtos químicos individuais, os efeitos sinérgicos ou antagônicos não são avaliados, gerando um alto grau de incerteza.

O preenchimento dessas lacunas do conhecimento sobre a concentração, destino e toxicidade de contaminantes provenientes do lodo são fundamentais para o conhecimento dos riscos associados à aplicação ao solo (HARRISON et al., 2006). A matéria orgânica pode aumentar o transporte de substâncias químicas em solução, aumentando assim o potencial de lixiviação.

Estes cenários são de difícil previsão e os compostos podem ser transferidos para o lençol freático e ocasionar contaminação do subsolo. Portanto, a avaliação de risco é um requisito fundamental para a plena compreensão do comportamento complexo dessa substância de característica heterogênea (SINGH; AGRAWAL, 2008).

Dessa forma, levando-se em consideração a escassez de recursos dos sistemas públicos no setor de saneamento, juntamente com o alto custo da bateria de testes estabelecidos pela Resolução CONAMA 375 para a viabilidade da aplicação de lodo de esgoto em solos agrícolas, pode-se dizer que:

- Os ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade poderiam ser aplicados como estudos preliminares de avaliação, pois são capazes de indicar o efeito direto do lodo, em um curto período, e indicar as conseqüências futuras dessa aplicação, uma vez que os danos permanentes apresentados ao DNA podem ser passados às gerações futuras como conseqüências irreversíveis;
- A aplicação dessa técnica permite reduzir de sobremaneira o tempo de análise dos ensaios toxicológicos de exposição crônica convencionais, e são sensíveis mesmo para substâncias presentes em baixas concentrações;
- Alguns parâmetros observáveis no ensaio de aberrações cromossômicas podem evidenciar os mecanismos de ação da substância ao organismo exposto, e assim, fornecer informações valiosas sobre os efeitos adversos até mesmo para extrapolação para os seres humanos ou a descoberta de mecanismos para tratamento de reversão desse efeito;
- A Resolução encontra-se em fase de revisão, sendo válido qualquer estudo e sugestão sobre o tema proposto, de modo a representar maiores informações sobre os riscos e benefícios da aplicação do lodo de esgoto na agricultura, bem como o comportamento dessa substância no meio ambiente.

Conclui-se, que o objetivo desse trabalho foi alcançado, uma vez que os organismos utilizados ofereceram respostas às amostras analisadas. Portanto, os testes de toxicidade genética com vegetais superiores são pertinentes para regulamentação da aplicação de lodo de esgoto na agricultura. Contudo, mais testes se fazem necessários para estabelecer os limites seguros da atividade genotóxica e mutagênica, ou ainda, qual o risco que se pode assumir ao dano

genético, de forma ambientalmente segura, da área de aplicação para qual o lodo se destina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – NBR 10004. **Classificação de Resíduos Sólidos**, Rio de Janeiro-RJ, Associação Brasileira de Normas Técnicas, 74p., 2004.

ABNT – NBR 10006. **Solubilização de Resíduos**, Rio de Janeiro-RJ, Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2p., 1987.

ABNT – NBR 10007. **Procedimentos para Amostragem de Resíduos**, Rio de Janeiro-RJ, Associação Brasileira de Normas Técnicas, 25p., 2004.

ANDRADE, C. A. **Fração orgânica de bio sólido e efeito no estoque de carbono e qualidade da matéria orgânica de um latossolo cultivado com eucalipto**, Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 121p., 2004.

APHA - **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, Estados Unidos, 21 th Ed, 2005.

ATIBAIA - **Prefeitura da Estância de Atibaia** - Disponível em: www.atibaia.sp.gov.br. Acessado em abril de 2009.

AVERY, S.V.; HOWLETT, N.G.; RADICE, S. Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependence on plasma membrane fatty acid composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3960–3966, 1996.

AZEVEDO, M. M. S. **Toxicity of metals in aquatic hyphomycetes: cellular targets and defense mechanisms**, Tese (Doutorado) em Ciências, Escola de Ciências da Universidade do Minho, Braga-Portugal, 126 p., 2007.

BATALHA, J. R. F. et al. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo Brazil using the *Tradescantia* micronuclei assay. **Mutation Research**, v. 426, p. 229-232, 1999.

BAYER, C.; BERTOL, I. Características químicas de um cambissolo húmico afetadas por sistemas de preparo, com ênfase à matéria orgânica. **Revista Brasileira de Ciência e Solo**, v.23, p.687-694, 1999.

BIAGINI, F. R.; DAVID, J. A. O.; FONTANETTI, C.S. The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. **Micron**, v. 40, p. 839-844, 2009.

BIANCHI, J. **Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida Malation, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e células de mamíferos**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro-SP, 165p., 2008.

BOEIRA, R. C.; LIGO, M. A. V.; MAXIMILIANO, V. C. B. Emissão de C-CO₂ em amostras de latossolo tratadas com lodos de esgoto. **Embrapa meio ambiente - Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, Jaguariúna-SP n. 53, 20p., 2009.

BROSSI, M. J. L. **Ecotoxicologia de um sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto**. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 87p., 2008.

CABRERA, G. I.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research**, v. 426, p. 211-214, 1999.

CAMARGO, O. A.; ALLEONI, L. R. F.; CASAGRANDE, J. C. Reações dos micronutrientes e elementos tóxicos no solo. In: FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P.; RAIJ, B.; ABREU, C. A. (Ed.). **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**, Jaboticabal: CNPq/ FEPESP/POTAFOS, p. 89-124, 2001.

CAMARGO, O. A.; PIRES, A. M. M.; BETIOL, W. Uso de resíduo de esgoto como adubo exige cuidado com contaminantes: Lodo na agricultura. **Revista Ciência Hoje**, v.42, n. 248, p 68-70, 2008.

CAMPOS, J.R. **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. Rio de Janeiro; ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária; PROSAB – Programa de Pesquisa em Saneamento Básico, 443p.,1999.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Introduction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722-725, 2008.

CARRERAS, H. A.; PIGNATA, M. L.; SALDIVA, P. H. N. *In situ* monitoring of urban air in Córdoba, Argentina using the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassay. **Atmospheric Environmental**, v. 40, p. 7824-7830, 2006.

CARVALHO, F. G.; JABLONSKI, A., TEIXEIRA, E. C. Estudo das Partículas Totais em Suspensão e Metais Associados em Áreas Urbanas. **Química Nova**, v. 23, p.614-617, 2000.

CARVALHO, H. A. A *Tradescantia* como Bioindicador Vegetal na Monitoração dos Efeitos Clastogênicos das Radiações Ionizantes. **Radiologia Brasileira**, v.38, p. 459-462, 2005.

CEBULSKA-WASILEWSKA, A. *Tradescantia* stamen-hair mutation bioassay on the mutagenicity of radioisotope-contaminated air following the Chernobyl nuclear accident one year later. **Mutation Research**, v. 270, p. 23-29, 1992.

CÉSNIENÉ, T. et al. Soil-surface genotoxicity of military and urban territories in Lithuania, as revealed by *Tradescantia* bioassays. **Mutation Research**, v. 697, p.10-18, 2010.

CETESB – Companhia Estadual de Tecnologia em Saneamento Básico. Norma P 4.230. **Aplicação de Lodos de Sistemas de Tratamento Biológico em Áreas Agrícolas – Critérios para Projeto e Operação**. São Paulo-SP, 32p., 1999.

CHENON, P.; GAUTHIER, L.; LOUBIÈRES, P.; SÉVERAC, A. ; DELPOUX, M. Evaluation of genotoxic and teratogenic potential of a municipal sludge-amended soil using the amphibian *Xenopus laevis* and the tobacco: *Nicotiana tabacum* L. var. *xanthi* Dulieu. **The Science of the Total Environment**, v. 301, p. 139-150, 2003.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; DAVID, J. A.; FONTANETTI, C. S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): a methodological comparison. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p.155-158, 2009.

COMITÊ PCJ. **Plano de Bacias Hidrográficas dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí 2010-2020**. Disponível em: www.comitepcj.sp.gov.br. Acessado em janeiro de 2011.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 375 **Critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados**, Brasília-DF, 32 p., 2006.

COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M. **Uso agrícola de lodo de esgoto: avaliação após a Resolução nº 375 do CONAMA**. Botucatu-SP, FEPAF, 407 p., 2010.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J-F.; FÉRARD, J-F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the

Tradescantia-micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, p.167-171, 1999.

COTTA, J. A. O.; SALAMI, F. M.; MARQUES, A. R.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D. Validação do método para determinação de Nitrogênio Kjeldahl Total. **Revista Analytica**, n. 26, p. 68-75, 2007.

DAMASCENO, S; CAMPOS, J. R. Caracterização de lodo de estação de tratamento de esgotos sanitários para uso agrícola. **Asociación Peruana de Ingenierya Sanitaria y Ambiental**, AIDIS. Gestión ambiental em el siglo XXI. Lima, APIS, 1998.

DAVID, J. A. O.; HOSHINA, M. M.; FONTANETTI, C. S. DNA damages in *Mytella falcata* (Mytiloidea, Mitilidae) cells: a new tool for biomonitoring studies in tropical estuarine eco systems. **Naturalia**. v. 31, p. 1-7, 2008.

DI BERNARDO, L. **Tratamento de água para abastecimento por filtração direta**. Rio de Janeiro: ABES, Ed. RiMa,. Projeto PROSAB, 491p., 2003.

IUPAC - DUFFUS, J.H. "Heavy metals" – a meaningless term?, Technical Report, **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002.

FERNANDES, T. C. C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos de herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 212p., 2005.

FERNANDES, T.C.C; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n.3, p. 252-259, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1680-1686, 2009.

FERREIRA, A. C.; ANDREOLI, C. V. **Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura. Cap. III: Riscos associados ao uso do lodo de esgoto.** PROSAB. Curitiba, 98p.,1999.

FISKESJÖ, G. The *Allium* Test – a Potential Standard for the Assessment of Environmental Toxicity. **Environmental Toxicology Risk Assessment**, v.2, p. 331-345, 1993.

FOMIN A.; PASCHKE, A.; ARNDT, U. Assessment of the genotoxicity of mine-dump material using the *Tradescantia*-stamen hair (Trad-SHM) and the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassays. **Mutation Research**, v.426, p. 173-181, 1999.

GADD, G. M. Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, v.124, p. 25-60, 1993.

GHINI, R.; BETTIOL, W. **Uso agrícola de lodo de esgoto pode ter efeitos na ocorrência de doenças de plantas.** Embrapa Meio Ambiente, Jaguariuna-SP, 3 p., 2004.

GONG, P.; KUPERMAN, R. G.; SUNAHARA, G. I. Genotoxicity of 2,4- and 2,6-dinitrotoluene as measured by the *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) bioassay. **Mutation Research**, v. 538, p.13-18, 2003.

GRANT, W. F. Chromosome Aberration Assays in *Allium* – A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310; p. 175-185, 1994.

GUEDES, M. C. **Ciclagem de nutrientes após aplicação de lodo de esgoto (biossólido) sobre latossolo cultivado com *Eucalyptus grandis***. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 154p., 2005.

HARRISON, E. Z.; OAKES, S. R.; HYSELL, M.; HAY, A. Review: Organic chemicals in sewage sludges. **Science of the Total Environment**, v. 367, p. 481-497, 2006.

HAY, A. N. **Compostos orgânicos em lodos de esgoto: "The book is on the table"**. p. 315-328, in: COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M. **Uso agrícola de lodo de esgoto: avaliação após a Resolução nº 375 do CONAMA**. Botucatu-SP, FEPAF, 407 p., 2010.

HEDDLE, J. A.; CARRANO A. V. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by g-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. **Mutation Research**, v.44, p.63–69, 1977.

HOLLEMAN, A. F.; WIBERG, E. **Lehrbuch der Anorganischen Chemie**. Walter de Gruyter. Berlin, p. 868, 1985.

HOPKER P. K.; PLEWA, M. J.; JOHNSTON. J. B.; WEAVER, D.; WOOD, S.G.; LARSON, R.A.; HINESLY, T.; Multi-technique screening of Chicago municipal sewage sludge for mutagenic activity. **Environmental Science Technology**, v. 16, p.140–147, 1982.

HOSHINA, M. M., MARIN-MORALES, M. A. Using the comet assay in *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Journal of the Brazilian Society Ecotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 75-79, 2010.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Disponível em: www.ibge.gov.br. 2010.

ICHIKAWA, S. *In situ* monitoring with *Tradescantia* around nuclear power plants. **Environmental Health Perspectives**, v. 37, p.145-164, 1981.

ICHIKAWA, S. et al. Yearly variation of spontaneous somatic mutation frequency in the stamen hairs of *Tradescantia* clone UK 9 grown outdoors, which showed a significant increase after the Chernobyl accident. **Mutation Research**, v.349, p. 249-259, 1996.

ISIDORI, M.; FERRARA, M.; LAVORGNA, M.; NARDELLI, A.; PARRELLA, A. *In situ* monitoring of urban air in Southern Italy with the *Tradescantia* micronucleus bioassays and semipermeable membrane devices (SPMDs). **Chemosphere**, n. 52, p.121-126, 2003.

JANUÁRIO, G. F.; FERREIRA, FILHO, S.S. Planejamento e aspectos ambientais envolvidos na disposição final de lodos das estações de tratamento de água na região metropolitana de São Paulo. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 117-126, 2007.

JORGE, M. P. M. et al. **Biomonitoramento da qualidade do ar e educação ambiental: Relato da experiência em São José dos Campos**. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). São José dos Campos, São Paulo, 04 p., 2007.

KINNEY, C. A. et al. Presence and distribution of wastewater-derived pharmaceuticals in soil irrigated with reclaimed water. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, p. 317-326, 2006.

KLUMPP, A. et al. Influence of climatic conditions on the mutations in pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and implications for the Trad-MCN bioassay protocol. **Hereditas**, n. 141, p.142-148, 2004.

KOVALCHUK, O. *et al.* The *Allium cepa* chromosome Aberration Test Reliably Measures Genotoxicity of Soils of Inhabited Areas in the Ukraine Contaminated by the Chernobyl Accident. **Mutation Research**, v. 415, p. 47-57, 1998.

KNASMÜLLER, S. *et al.* Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. **Mutation Research**, v. 420, p. 37-48, 1998.

KNASMÜLLER, S. **Tradescantia SHM assay**. In.: Workshop on plant for the detection of mutagens and carcinogens in the environment. Piracicaba: CENA-USP, 2006. 1CD-Rom. Apresentação em Power Point.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v.682, p. 71-81, 2009.

LEWINSKA, D. *et al.* Increased incidence of micronuclei assessed with the micronucleus assay and the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique in peripheral blood lymphocytes of nurses exposed to nitrous oxide. **Mutation Research**, n. 581, p.1-9, 2005.

LIRA, A. C. S.; GUEDES, M. C.; SCHALCH, V. Reciclagem de lodo de esgoto em plantação de eucalipto: Carbono e nitrogênio. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, n. 2, p. 207-216, 2008.

LOBO, D. A. **Manual prático para utilização de *Tradescantia* como biomonitor**. Escola de Medicina USP, São Paulo, 29p., 2003.

MA, T. H. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for *in situ* monitoring and mutagen screening. **Environmental Health Perspectives**, n. 37, p. 85-90, 1981.

MA, T. H. **Tradescantia micronuclei (Trad-MCN) test for environmental clastogens**. In: Kolber, A. R.; Wong, T. K.; Grant, L. D.; DeWoskin, R. S.; Hughe, S. T. J., (Ed). *In Vitro Toxicity Testing of Environmental Agents. Current and Future Possibilities. Part A: Survey of Test Systems*. Nova Iorque. p. 191-214, 1983.

MA, T. H. et al. The Improved *Allium/Vicia* Root Tip Micronucleus Assay for Clastogenicity of Environmental Pollutants. **Mutation Research**, v. 334 (2), p. 185- 195, 1995.

MA, T. H.; CABRERA, G. L.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; CHEN, R.; LOARCA, F.; VANDENBERG, A. L.; SALAMONE, M. F. *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. **Mutation Research**, v. 310, n. 2, p.221-230, 1994.

MA, T.H.; XU, Z. Validation of a new protocol of the *Allium* micronucleus test for clastogens. **Environmental Mutagenesis**, v.8, n.6, p.65-66, 1986.

MA, T. H.; XU, C.; LIAO, S.; MCCONNELL, H.; JEONG, B. S.; WON, C. D. *In situ* monitoring with the *Tradescantia* bioassays on the genotoxicity of gaseous emissions from a closed landfill site and an incinerator. **Mutation Research**, v.359, p. 39-52, 1996.

MAJER, B. J. et al. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. **Mutation Research**, n. 515, p.111-124, 2002.

MAJER, B.; GRUMMT, T.; UHL, M.; KNASMÜLLER, S. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. **Acta Hydrochim. Hydrobiol**, n 33, v 1, p 45-55, 2005.

MANAHAN, S. E. **Toxicological Chemistry and Biochemistry**. Lewis Publishers Third Ed., 424p., 2003.

MARIN-MORALES, M. A. et al. **A utilização de *Allium cepa* como organismo teste na detecção da genotoxicidade ambiental**. Rio Claro-SP, Apostila Teórica, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 54p., 2008.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTII, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MAZIVIERO, G. T.; FERREIRA, A. L. M. **Implantação do bioensaio de genotoxicidade com *Tradescantia pallida* do material particulado inalável**. Trabalho de Graduação Interdisciplinar. Limeira, SP, Centro Superior de Educação Tecnológica. Universidade Estadual de Campinas. 72 p., 2007.

MAZZEO, D. E. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BETX, antes e após o processo de biorremediação por microrganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro-SP, 144p., 2009.

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bactéria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v. 47, p. 1255-1264, 2009.

MEIRELES, J.; ROCHA, R.; NETO, A. C.; CERQUEIRA, E. Genotoxic effects of vehicle traffic pollution as evaluated by micronuclei test in *Tradescantia* (Trad-MCN). **MutationResearch**, v.675, p.46-50, 2009.

MELO, W. J., MELO, G. M. P., MELO, V. P., BERTIPAGLIA, L. M. A. **A Resolução CONAMA 375 e os metais pesados.** p. 113-135, in: COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M. **Uso agrícola de lodo de esgoto: avaliação após a Resolução nº 375 do CONAMA.** Botucatu-SP, FEPAF, 407 p., 2010.

MIELLI, A. C. **Avaliação da atividade genotóxica de lodo de esgoto tratado do Estado de São Paulo com teste de micronúcleo em células germinativas de *Tradescantia* (Trad-MN).** Tese (Doutorado), Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 121p., 2008.

MIELLI, A. C.; MATTA, M. E. M.; NERSESYAN, A.; SALDIVA, P. H. N.; UMBUZEIRO, G. A. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. **Mutation Research**, v.672, p.51-54, 2009.

MINOUFLET, M.; AYAUULT, S.; BADOT, P-M.; COTELLE, S.; FERARD, J-F. Assessment of the genotoxicity of ¹³⁷Cs radiation using *Vicia*-micronucleus, *Tradescantia*-micronucleus and *Tradescantia*-stamen-hair mutation bioassays. **Journal of Environmental Radioactivity**, v.81, p.143-153, 2005.

MOHAMMED, K. B.; MA, T. H.; *Tradescantia*-micronucleus and –stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides. **Mutation Research**, v.426, p. 193-199, 1999.

MONARCA, S. et al. Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using in situ plant tests. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, n. 41, p.353-359, 2003.

MONARCA, S. et al. Genotoxicity of Drinking Water Disinfectants in Plant Bioassays. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, v. 46, p.96-103, 2005.

MORIYAMA, M. **Modelo de Gestão – SAAE Atibaia/SP**. Apresentação Didática, 2008.

NAYAR, G. G.; SPARROW, A. H. Radiation-induced somatic mutations and the loss of reproductive integrity in *Tradescantia* stamen hairs. **Radiation Botany**, v.7, p.257-267, 1967.

PARAIBA, L. C.; BOEIRA, R. C.; JONSSON, C. M. **Fator de Bioconcentração de Poluentes de Lodo em Laranjeiras**. Comunicado técnico 43, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Jaguariúna, 7p., 2007.

PARKPAIN, P.; SREESAI, S.; DELAUNE, R. D. Bioavailability of heavy metals in sewage sludge-amended Thai soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.122, p. 163-182, 2000.

PEDRO, J. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênico do inseticida Fipronil (Regente), usando sistema teste *Allium cepa***. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro-SP, 117p., 2008.

PIRES, A. M. M. **Uso agrícola do lodo de esgoto: Aspectos legais**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Jaguariúna, 4p., 2006.

PRINTES, L. B. **Biomarcadores: Bases e Aplicações**. Mini Curso 4. IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. São Pedro-SP, 26p., 2006.

RODRIGUES, G. S. **Bioensaios de toxicidade genética com plantas superiores *Tradescantia* (MCN e SHM), milho e soja**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, São Paulo, 56p., 1999.

RODRIGUES, G. S., Ma, T.H., PIMENTEL, D., WEINSTEIN, L. H. *Tradescantia* Bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. **Critical Reviews Science**, v.16, p. 325-359, 1997.

RODRIGUES, G. S.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L. H.. In situ assessment of pesticide genotoxicity in an integrated pest management program I-*Tradescantia* micronucleus assay. **Mutation Research**, n. 412, p.235-244, 1998.

SAAE – Saneamento Ambiental de Atibaia, 2009. Disponível em: www.saaeatibaia.com.br. Acessado em abril de 2009.

SAMPAIO, A. O. **Adequação das estações de tratamento de esgotos sanitários à Resolução número 375 do CONAMA**. p. 265-280, in: COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M. **Uso agrícola de lodo de esgoto: avaliação após a Resolução nº 375 do CONAMA**. Botucatu-SP, FEPAF, 407 p., 2010.

SANTANA, G. P. **Elemento-traço ou metal pesado?** Universidade Federal do Amazonas, 2008.

SANT'ANNA, E. T. G. **Poluição atmosférica urbana na cidade de São Paulo e mutagênese: Avaliação de riscos utilizando-se bioindicadores vegetais do gênero *Tradescantia***. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 150 p., 2003.

SAVAGE, J. R. K.; PAPWORTH, D. G. An investigation of LET 'finger-prints' in *Tradescantia*. **Mutation Research**, v.422, p. 313-322, 1998.

SAVÓIA, E. J. L. **Potencial de *Tradescantia pallida* cv. *Purpurea* para biomonitoramento da poluição aérea de Santo André – São Paulo, por meio do bioensaio Trad – MCN e do acúmulo foliar de elementos tóxicos**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 118p., 2007.

SAX, K.; EDMONDS, H. W. Development of the male gametophyte in *Tradescantia*. **Botanical Gazette**, v.95, p.156-163, 1933.

SHIMA, N.; XIAO, L. Z.; SAKURAMOTO, F.; ICHIKAWA, S. Young inflorescence-bearing shoots with roots of *Tradescantia* clone BNL 4430 cultivated on nutrient solution circulating systems: an alternative to potted plants and cuttings for mutagenicity tests. **Mutation Research**, v.395, p. 199-208, 1997.

SINGH, R. P.; AGRAWAL, M. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. **Waste Management**, v. 28, p. 347-358, 2008.

SILVA, G. S; JARDIM, W. F. Um Novo Índice de Qualidade das Águas para Proteção da Vida Aquática Aplicado ao Rio Atibaia, Região de Campinas/Paulínia – SP. **Química Nova**, v.29, n.4, p.689-694, 2006.

SILVA, E. P.; MOTA, S.; AQUINO, B. F. Potencial de utilização do lodo de esgoto de indústria têxtil como fertilizante agrícola. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 8, n. 1-2, p. 69-76, 2003.

SILVA, C. A.; RANGEL, O. J. P.; BETTIOL, W.; MANZATTO, C. V.; BOEIRA, R. C.; DYNIA, F. Dinâmica de metais pesados em latossolo adubado com lodo de esgoto e em plantas de milho. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. (Eds.) **Lodo de esgoto: impactos ambientais na agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p. 45-77, 2006.

SOCCOL, V. T. et al. **Organismos patogênicos presentes em lodo de esgoto a ser aplicado no solo e a Resolução nº375 do CONAMA**. p.83-112, in: COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M. **Uso agrícola de lodo de esgoto: avaliação após a Resolução nº 375 do CONAMA**. Botucatu-SP, FEPAF, 407 p., 2010.

SOUZA, V. H. E.; et al. **Utilização de Testes Citogenéticos para Avaliação de Mutagênese Ambiental**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, v. 605, p. 87-93, 2006.

STEINKELLNER, H.; KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S. *Tradescantia*-micronucleus assay for the assessment of the clastogenicity of Austrian water. **Mutation Research**, v.426, p.113-116, 1999.

TSUTIYA, M. T. et al. **Biossólidos na Agricultura**. 1ª Ed., SABESP, São Paulo, 468p., 2001.

TUCKER, J. D.; PRESTON, J. R. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. **Mutation Research**, v. 365, p.147-159, 1996.

VENTURA, B. C. **Investigação da mutagenicidade do azocorante comercial BDCP (Black Dye Commercial Product), antes e após tratamento microbiano, utilizando o sistema-teste de *Allium cepa***. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro-SP, 205p., 2009.

VENTURA, B. C.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Evidences of mutagenic and genotoxic action of the atrazine herbicide using *Oreochromis niloticus* as test system. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.90, p. 42-51, 2008.

VILLALOBOS-PIETRINI, R. et al. Genetic effects observed in tetrads of *Tradescantia* induced by radon. **Mutation Research**, n. 426, p.215-219, 1999.

VIEIRA, R. F.; SILVA, C. M. M. S. Utilização de lodo de esgoto como fonte de fósforo na cultura de soja. **Embrapa meio ambiente – Circular Técnica**. Jaguariúna-SP, n. 6, 3p., 2004.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** v.1, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, DESA-UFMG, 2ª ed; 243 p., 1999.

XIAO, L. Z.; ICHIKAWA, S. Antagonistic effects of ethyl methanesulfonate and maleic hydrazide in inducing somatic mutations in the stamen hairs of *Tradescantia* clone BNL 4430. **Genes Genetical Systems**, n. 73, p.287-292, 1998.

XU, Z.; MA, T-H. Clastogenicity of formaldehyde fumes and X-rays evaluated by the *Tradescantia* micronucleus assay. **Environmental And Experimental Botany**, n. 39, p.169-175, 1998.

WHITE, P. A.; CLAXTON, L. D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation Research**, v.567, p.227-345, 2004.

YANG, G. *Tradescantia*-micronucleus assay on the water quality of lake Hongzhe in Jiangsu Province, China. **Mutation Research**, n. 426, p.155-157, 1999.

ZENK, M.H. Heavy metal detoxification in higher plants—a review. **Gene**, v. 179, n. 1, p. 21–30, 1996.

628.2 Maziviero, Guilherme Thiago
M476a Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e
mutagênico de lodo de esgoto por meio dos sistemas-teste
Allium cepa e Tradescantia pallida / Guilherme Thiago
Maziviero. - Rio Claro : [s.n.], 2011
114 f. : il., figs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

1. Esgotos. 2. ETE. 3. Aberrações cromossômica. 4.
Trad-MCN. 5. Micronúcleo. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP