

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
Programa de Pós-Graduação em Patologia**

**ESTUDO DA TOXICIDADE ORAL DE 90 DIAS (DOSES
REPETIDAS) DO LODO DE ESTAÇÃO DE
TRATAMENTO DE ESGOTO (LETE) EM RATOS WISTAR**

João Francisco Lozano Luvizutto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Botucatu - SP

2008

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Programa de Pós-Graduação em Patologia

**ESTUDO DA TOXICIDADE ORAL DE 90 DIAS (DOSES
REPETIDAS) DO LODO DE ESTAÇÃO DE
TRATAMENTO DE ESGOTO (LETE) EM RATOS WISTAR**

Mestrando: João Francisco Lozano Luvizutto

Orientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Botucatu - SP

2008

Aos meus pais Donizetti e Sueli, exemplos de fé e perseverança, pelo amor incondicional, pelos sacrifícios em prol da minha felicidade e pelo apoio nos momentos difíceis. Sou eternamente grato a vocês.

A minha irmã Luciana, que me acompanha sempre, pelos momentos felizes e de companheirismo.

Ao amor da minha vida, Patrícia, por seu amor, carinho e companheirismo, mas principalmente pela sua força perante os obstáculos. Você torna a minha vida mais feliz a cada dia. Te amo muito, hoje e sempre.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo, pela orientação segura, pelo exemplo de dedicação a carreira científica, pela confiança no desenvolvimento deste trabalho

A Dra. Carla Adriene da Silva Franchi exemplo de dedicação e trabalho, pela grande e inestimável ajuda, pela amizade e pelos momentos de alegria.

À Deus por ser infinitamente generoso comigo. Por me presentear com uma família e amigos maravilhosos.

À Marize de Loudes Marzo Solano pela amizade e inestimável ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos queridos amigos do anexo Tony, Merielen, Liane, Tânia, Meire, Rodrigo e Andréia pelos inúmeros momentos felizes e de descontração e por agüentarem o meu humor cítrico (limão). Vocês fazem parte das melhores lembranças.

Ao eterno amigo Fernando Batisteli Rodrigues, pela amizade, companheirismo, por momentos inesquecíveis e por estar sempre presente na minha vida.

À Cristina Dorico por toda ajuda e incontestável eficiência.

Ao Paulo Cezar Georgette, pela ajuda e participação em toda a etapa experimental.

Ao Paulo Roberto Cardoso e Maria Luísa Ardanaz (Mara), pelo profissionalismo, companheirismo e colaboração no processamento de todo material histológico

Aos amigos e colegas do Toxicam, Alexandre, Bruno, João Paulo, Mariana, Mitschelli, Paula Regina, Renato, Viviane, Bianca e Shadia, pela amizade e convívio.

Aos professores e funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-SP, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Grupo de Apoio a Pesquisa (GAP) na pessoa de Hélio Rubéns de Carvalho Nunes pela realização dos testes estatísticos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP pelo auxílio financeiro.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Ó mar salgado, quanto do teu sal
São lágrimas de Portugal!
Por te cruzarmos, quantas mães choraram,
Quantos filhos em vão rezaram!
Quantas noivas ficaram por casar
Para que fosses nosso, ó mar!

Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.

Fernando Pessoa

Sumário

| | |
|--|-----------|
| Revisão de Literatura | 01 |
| Lodo de estação de tratamento de esgoto (LETE) | 01 |
| Ensaio de Toxicidade | 09 |
| Referências | 12 |
| Artigo científico | 16 |
| Resumo | 17 |
| <i>Abstract</i> | 18 |
| Introdução | 19 |
| Material e Métodos | 22 |
| Resultados | 27 |
| Discussão | 29 |
| Referências | 32 |
| Tabelas | 34 |
| Figuras | 44 |
| Anexos | 46 |

Lista de Ilustrações

| | | |
|-----------------|---|-----------|
| Figura 1 | Delineamento Experimental..... | 44 |
| Figura 2 | Evolução de peso corpóreo médio dos animais dos grupos experimentais ao longo do estudo de 90 dias..... | 45 |

Lista de Tabelas

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Tabela 1 | Peso corpóreo inicial, final e ganho de peso dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final de 28 dias..... | 34 |
| Tabela 2 | Peso corpóreo inicial, final e ganho de peso dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final do estudo de 90 dias..... | 35 |
| Tabela 3 | Consumo médio estimado de ração e água e ingestão estimada de lodo pelos animais dos diferentes grupos experimentais durante o estudo de 28 dias..... | 36 |
| Tabela 4 | Consumo médio estimado de ração e água e ingestão estimada de lodo pelos animais dos diferentes grupos experimentais durante o estudo de 90 dias..... | 37 |
| Tabela 5 | Pesos relativos dos órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final do estudo de 28 dias..... | 38 |
| Tabela 6 | Pesos relativos dos órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final do estudo de 90 dias..... | 39 |
| Tabela 7 | Exames de bioquímica sérica dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final do estudo de 28 dias..... | 40 |
| Tabela 8 | Exames de bioquímica sérica dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final do estudo de 90 dias..... | 41 |
| Tabela 9 | Resultado do exame hematológico dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final do estudo de 90 dias..... | 42 |
| Tabela 10 | Hepatócitos GST-P+ dos grupos tratados com 50.000 ppm ao final de 90 dias ¹ | 43 |

REVISÃO DE LITERATURA

1- Lodo de estação de tratamento de esgoto (LETE)

O desenvolvimento econômico tem levado ao aumento progressivo das cidades, que em alguns casos chegam a atingir milhões de habitantes. Dentre os motivos que levam este grande contingente à procura das cidades estão maiores oportunidades de emprego, maior nível de educação, e mais opções de lazer. Por outro lado, esta migração gera problemas como alta densidade populacional, precariedade de saneamento básico e produção crescente de esgoto urbano. De fato, a coleta e o processamento dos resíduos gerados pelos seus habitantes são algumas das maiores dificuldades gerenciais de qualquer núcleo populacional. Em geral, o volume dos resíduos extrapola a capacidade natural de assimilação do entorno desses centros urbanos e o resultado é uma crescente deterioração das condições ambientais.

No caso específico dos resíduos de esgoto, durante muito tempo a única providência foi a construção de sistemas de coleta que se limitavam a despejar os resíduos não tratados (brutos) em rios e mares, gerando uma série de problemas ambientais e de saúde pública para os que vivem nas regiões banhadas por essas águas. No Brasil, atualmente, 32% do esgoto urbano é coletado por meio de redes sanitárias, sendo que, deste montante, somente 20% são tratados (IBGE, 2000).

A transformação do esgoto em água reutilizável pelas estações de tratamento de esgoto (ETE) produz secundariamente um resíduo conhecido como “lodo de estação de tratamento de esgoto” (LETE). Este lodo é uma mistura complexa de material inorgânico, orgânico e biológico, de característica pastosa, odor pútrido e cor escura, constituído por detritos domésticos e

industriais, que são removidos por processos como coagulação, floculação, decantação e filtração (Tsutiya, 2001).

A conscientização sobre a questão ambiental tem levado à busca de soluções mais adequadas para este tipo de problema, obrigando maiores investimentos em novas tecnologias para o tratamento e disposição final dos resíduos sanitários, que idealmente devem atender padrões de qualidade de controle ambiental (Shirota & Rocha, 1999).

Nos últimos anos, a produção do LETE aumentou consideravelmente no Brasil devido à construção de novas estações de tratamento e ao maior número de conexões na rede coletora de esgoto (Van Voorneburg & Van Veen, 1993). Na região metropolitana de São Paulo, a produção de LETE prevista pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP) é de até 784 toneladas/dia em 2015 (Santos e cols., 1997).

O LETE tem composição muito variável, pois depende da origem do esgoto, ou seja, se proveniente de uma área residencial ou industrial, de fatores sazonais, da composição do esgoto a ser tratado, do seu grau de estabilização ou mineralização e do tipo de processo utilizado no tratamento (Van Vooneburg & Van Veen, 1993).

Quando bem conduzido, o tratamento do esgoto pode produzir um LETE sem características desagradáveis quanto ao aspecto ou odor, particularidades importantes que podem contribuir para sua disponibilização e uso alternativo (Shirota & Rocha, 1999). Dentre as várias opções utilizadas para a disposição final do LETE existem o descarte em superfícies (aterros sanitários), nos oceanos, em lagoas de armazenagem, incineração ou a reciclagem agrícola. Alternativas como a incineração e a disposição em aterros sanitários

apresentam alto custo por tonelada tratada e requerem tecnologia sofisticada (Carvalho & Barral, 1981; Saabye e cols., 1994).

A disposição do LETE em aterros sanitários pode ser realizada de duas maneiras: em conjunto com os resíduos sólidos urbanos ou disposição em aterros exclusivos para este material, sendo que essa prática diminui a vida útil dos aterros destinados a resíduos sólidos, necessariamente em áreas próximas dos centros geradores, já que o custo do transporte é alto (Tsutya, 2001).

A incineração é empregada quando a contaminação biológica e/ou química é muito alta ou quando faltam áreas adequadas à implantação de aterros específicos, como no Japão (Endo e cols., 1997). Apesar de ter alguns defensores (Lundin e cols., 2004), devido à possibilidade de reaproveitamento de seus componentes, ou à produção de calor e eletricidade substituindo outras fontes energéticas, como o óleo combustível ou gás natural, a incineração tem como desvantagens o consumo de enorme quantidade de energia e a poluição atmosférica, havendo necessidade de grandes investimentos em filtros para retenção de gases tóxicos, como as dioxinas produzidas durante o processo (USEPA, 1999).

Atualmente, o manejo adotado pela maioria das ETEs no Brasil consiste em sua retirada por caminhões, e seus destinos mais comuns são os aterros sanitários, as lagoas de lodo e até mesmo o uso de maneira não-controlada em áreas agrícolas (Alem Sobrinho, 2001).

Devido às várias restrições, muitos países têm adotado formas alternativas de dispor este resíduo; uma delas é a sua incorporação na matéria prima da indústria cerâmica para confecção de tijolos. Materiais cerâmicos produzidos

com argila, como tijolos e telhas, são heterogêneos devido a grande variação natural de sua composição, podendo tolerar a presença de outros resíduos em porcentagens consideráveis. Resultados como absorção de água, resistência à compressão e lixiviação de metais pesados indicam que até 40 % de lodo pode ser incorporado com sucesso em tijolos, garantindo sua utilização para alvenaria de vedação sem função estrutural (Liew e cols., 2004).

A composição e as propriedades físico-químicas do LETE tornam-no especialmente interessante para a recuperação de solos agrícolas desgastados. A reciclagem agrícola se destaca por reduzir os efeitos potenciais adversos à saúde causados pela incineração, por substituir alguns fertilizantes químicos, e por promover melhorias físicas do solo, como a estrutura e aeração, com conseqüente melhoria da infiltração e retenção de água (Andreoli e cols., 1994). A conseqüente melhoria da microbiologia do solo pela utilização do lodo, permitindo a redução da aplicação de fertilizantes químicos, foi destacada por Obreza (2004). Finalmente, esta alternativa parece ser mais vantajosa também do ponto de vista econômico (Korentajer, 1991).

Há tempos que se reconhece que o uso do LETE como fertilizante orgânico representa o reaproveitamento integral de seus nutrientes e a substituição de parte da adubação química sobre as culturas, com rendimentos equivalentes ou superiores aos conseguidos com fertilizantes comerciais (USEPA, 1999). A base racional para a utilização do LETE como fertilizante orgânico e condicionador de solos é o retorno à natureza dos nutrientes e da matéria orgânica, que haviam sido transferidos para os resíduos urbanos pelo aumento no consumo de alimentos e produtos agrícolas (Corrêa & Corrêa, 2003).

O LETE fornece nutrientes como nitrogênio, potássio e fósforo para as plantas e também os micronutrientes níquel, zinco e cobre, a maior parte na forma orgânica e com liberação de forma lenta, sendo esse um fator importante no cultivo de espécies que possuem um ciclo de produção longo (Bettiol, 1982).

Diversos estudos mostraram aumento na produção de espécies agrícolas cultivadas em solos tratados com LETE (Defelipo e cols., 1991; Da Ros e cols., 1993). Em alguns casos, os aumentos são equiparáveis ou superiores aos obtidos com a adubação mineral recomendada para as respectivas culturas (Da Ros cols., 1993). Portanto, sua aplicação com monitoramento regular pode possibilitar maior redução do uso indiscriminado de fertilizantes químicos e orgânicos (Muchovej & Obresa, 2001). O lodo pode ser empregado como adubo na produção de milho, não apresentando toxicidade ao desenvolvimento e produtividade da cultura (Biscaia & Miranda 1996). Entre os anos de 2002 a 2004 constatou-se o LETE é uma fonte eficiente de nitrogênio e fósforo para a cana-de-açúcar, não sendo necessária aplicação adicional de fertilizantes nitrogenados (Chiba e cols., 2005).

Nos Estados Unidos, o programa de utilização de biossólidos funciona desde 1970, de tal modo que cerca de 60% do LETE gerado são usados como fertilizantes e não mais incinerados ou enterrados. Mas ainda existem muitas dúvidas quanto deste uso, devido ao seu impacto potencial sobre a saúde humana e animal (USEPA, 1995). Na Europa, estabeleceu-se um padrão comum de disposição pelo qual aterros sanitários são permitidos apenas para resíduos impróprios para a reciclagem (Fernandes, 1997).

Um dos maiores problemas na utilização do LETE no meio ambiente é o

aumento na concentração de metais pesados no solo e rios. Indústrias metalúrgicas, de tintas, de cloro e de plástico PVC (vinil), entre outras, utilizam mercúrio e diversos metais em suas linhas de produção e acabam lançando parte deles nos cursos de água (Tyler & McBride, 1989).

Os metais pesados são altamente reativos e bioacumulativos, pouco eliminados pelo organismo. Os seres vivos necessitam de pequenas quantidades de alguns desses metais, incluindo cobalto, cobre, manganês, molibdênio, vanádio, estrôncio, e zinco, para algumas funções vitais. Porém, níveis excessivos desses elementos podem ser extremamente tóxicos. Outros metais pesados como o mercúrio, chumbo e cádmio aparentemente não possuem qualquer função nos organismos e seu acúmulo pode provocar doenças graves, sobretudo em mamíferos. Quando lançados como resíduos industriais, na água, no solo ou no ar, esses elementos podem ser absorvidos pelos vegetais e animais, podendo provocar intoxicações ao longo da cadeia alimentar (Glanze, 1996).

A absorção, translocação e acúmulo de componentes do LETE por plantas e animais são variáveis cruciais para a assimilação desses materiais pelo solo e estão relacionadas principalmente ao comportamento químico de cada um deles no ambiente (Berton, 1989). Por exemplo, a transferência de metais pesados difere em verduras, como cenoura, brócolis, alface, espinafre, couve, beterraba, aipo e alho poró, assim como varia entre os diferentes metais, sendo o cádmio e zinco aqueles com maiores taxas de transferência, e o cromo e chumbo as menores (Korentajer, 1991).

O mercúrio e chumbo, aparentemente não apresentam riscos elevados para o homem quando incorporados ao solo via LETE, pois adquirem formas

minerais quase insolúveis neste meio, além de serem imóveis em sistemas radiculares fibrosos, levando à fitotoxicidade em concentrações abaixo das problemáticas para os animais (Sommers & Barbarick, 1986).

Os fertilizantes químicos também podem conter metais pesados oriundos da matéria-prima utilizada ou do próprio processo de fabricação causando acúmulo no solo. A concentração de metais nos tecidos de plantas em solo tratado com LETE não diferiu significativamente das que estavam em solo tratado com fertilizantes químicos. Por outro lado, se o LETE for aplicado em taxas inadequadamente elevadas, o escoamento superficial pode conduzir os contaminantes até fontes de águas superficiais ou lençóis subterrâneos de água, colocando a população em contato indireto com este material (Frosta & Ketchum Júnior, 2000)

Por ser um resíduo do tratamento de esgoto sanitário, podemos encontrar no LETE também microorganismos causadores de doenças humanas. A eliminação desses agentes pelo tratamento do esgoto é uma etapa importante já que, no solo, as bactérias intestinais desaparecem por estarem em meio pouco adequado, mas os parasitas encistados (helmintos e protozoários) e seus ovos são mais resistentes (Fernandes & Andreoli, 1997). Alguns dos tratamentos eficazes para redução desses últimos são a compostagem e a desinfecção química em lagoas de tratamento, com cal e ou microondas (Strauch e cols.,1984). No Brasil, os tratamentos térmicos e químicos apresentam excelentes resultados na desinfecção do lodo (Martins & Sanches, 1986).

A Academia norte-americana de Ciência (NAS) recomendou que o EPA realizasse novos levantamentos sobre os produtos químicos e patógenos

encontrados no LETE, além de estudos epidemiológicos sistemáticos dos agravos à saúde humana e de monitoramento do impacto ambiental, possivelmente relacionados ao lodo (Tollefson, 2008).

Nesse contexto, no Brasil os órgãos estatais, como a Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB), estão investindo em novas tecnologias para o tratamento do LETE, assim como apoiando iniciativas para resolver a questão do descarte seguro dos resíduos sanitários, que pode representar mais de 50% do custo de seu processamento. Por outro lado, se as medidas para disposição final do lodo não forem adequadas, os benefícios obtidos na coleta e tratamento podem ser comprometidos (Alem Sobrinho, 2001; Silvério, 2004).

O Estado de São Paulo, baseado na "CFR 40 Part 503" (USEPA, 1995), regulamentou a utilização agrícola de biossólidos por meio da Norma Técnica N/CETESB/P4.230 (CETESB, 1999). E O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), órgão do Sistema Nacional do Meio Ambiente, aprovou a Resolução 375 em 29 de agosto de 2006, que define critérios de qualidade, aplicação e procedimentos para o uso agrícola do LETE, proibindo sua utilização em pastagens, cultivo de olerícolas, tubérculos e demais culturas cuja parte comestível entre em contato com o solo. Com a entrada da norma em vigor, as estações de tratamento de esgoto no Brasil passaram a contar com um instrumento legal de controle de padrão e de monitoramento, bem como de instrução dos cuidados que devem ser observados ao disponibilizar o resíduo para a agricultura. Assim, o LETE pode ser aplicado na agricultura quando suas características estiverem dentro daquela norma, sem que deixe de ser necessário monitorar periodicamente os solos quanto aos níveis de

metais pesados, compostos orgânicos e patógenos humanos. Ao lado dos aspectos positivos do uso do LETE em solos agrícolas, deve ser destacado que pouco se conhece a respeito dos efeitos desta mistura complexa sobre organismos superiores, como o homem. Como já foi referido, existe uma preocupação com eventuais efeitos toxicológicos do LETE quando há exposição humana. Considerando todas essas informações, faz-se necessário o conhecimento do eventual potencial toxicológico do LETE sobre mamíferos, a fim de calcular quantidades seguras para sua incorporação ao solo, sem riscos às espécies expostas.

2 - Ensaio de Toxicidade

Os testes de toxicidade permitem caracterizar a nocividade (perigo) de determinados agentes químicos, possíveis doses-resposta entre exposição a esses agentes e seus efeitos adversos, doses críticas de exposição, informações que, no conjunto, contribuem para estimar o risco humano decorrente de cada uma dessas exposições (Eaton & Klaassen, 2001).

O potencial tóxico de uma substância pode ser determinado por metodologias de complexidade biológica variável, que dependem dos sistemas estudados (*in vivo*, *in vitro*, organismos uni ou pluricelulares, vias potenciais de exposição) e das respostas esperadas por parte de determinadas espécies. Para organismos superiores, como os mamíferos, vários testes têm sido utilizados, objetivando particularmente aumentar a confiabilidade na extrapolação dos seus resultados para o homem.

Os ensaios convencionais estão devidamente validados e protocolados por diferentes agências técnico-científicas e reguladoras ao redor do mundo,

dentre as quais se destacam a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA). No Brasil, a Resolução 1/78 (D.O. 17/10/78) do Conselho Nacional de Saúde, reconhece 5 tipos convencionais de ensaios de toxicidade: aguda, sobreaguda, crônica, teratogenicidade, embriofetotoxicidade, além de ensaios especiais (estudos de comportamento, carcinogenicidade e outros).

O ensaio para determinação da toxicidade aguda é uma avaliação preliminar das propriedades tóxicas de uma substância, fornecendo dados a partir da exposição de roedores a doses repetidas e de curta duração (Cazarin e cols., 2007). Os ensaios de toxicidade subcrônica fornecem informações sobre os potenciais agravos resultantes da exposição a doses repetidas por período maior de tempo (30 ou 90 dias). Adicionalmente, geram informações sobre órgãos-alvo e sobre efeitos cumulativos, assim como permitem estimativas de doses críticas da substância teste, como os níveis de exposição sem qualquer efeito (NOEL – *No observed effect level*) ou o nível de exposição sem efeito adverso (NOAEL -- *No observed adverse effect level*), etc (OECD, 1995; 1998).

Os estudos padrão de avaliação de toxicidade em animais de experimentação são feitos com substâncias individuais, geralmente em níveis de pureza bem definidos. Para a avaliação do risco toxicológico de biossólidos, atualmente se utiliza a base de dados disponível para cada um de seus componentes, (chumbo, outros metais pesados, microrganismos), de forma isolada. É nesse contexto que a avaliação toxicológica do LETE como um todo difere dos estudos convencionais, pois se trata de uma mistura complexa e variável em sua composição. Embora essas misturas possam ser avaliadas

pelos testes convencionais, a análise dos resultados deve ser cautelosa, porque vários fatores podem complicar esta avaliação, como o fato de dois ou mais compostos poderem exercer efeitos aditivos, antagonistas ou sinérgicos sobre um mesmo órgão-alvo e ou alterarem o metabolismo de alguns órgãos, inativando os agentes nocivos ou formando novos metabólitos tóxicos (Mantovani, 2006).

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo verificar parte do perfil toxicológico sistêmico do LETE pelo ensaio *in vivo* de toxicidade subcrônica (90 dias) de doses repetidas em ratos. As informações geradas poderão subsidiar a estimativa do risco de eventual exposição humana e, conseqüentemente, sustentar decisões técnicas para o reaproveitamento do LETE produzido em regiões urbanas.

REFERÊNCIAS*

Alem Sobrinho P. Tratamento de esgoto e geração de lodo. In: Tsutiya MT, Comparini JB, Alem Sobrinho P, Hespanhol I, Carvalho PCT, Melfi AJ, et al. *Biossólidos na agricultura*. São Paulo: SABESP; 2001. p.7-40.

Andreoli CV, Barreto CLG, Bonnet BRP. Tratamento e disposição final do lodo de esgoto no Paraná. *Sanare*. 1994; 1:10-5.

Bettiol W, Carvalho PCT, Franco BJDC. Utilização do lodo de esgoto como fertilizante. *O Solo*. 1983; 75:44-54.

Berton RS, Camargo AO, Valadares JMAS. Absorção de nutrientes pelo milho em resposta a adição de lodo de esgoto a cinco solos paulistas. *Rev Bras de Ciênc Solo*. 1989; 13:187-92.

Biscaia RCM, Miranda GM. Uso de lodo de esgoto calado na produção de milho. *Sanare*. 1996; 5:86-9.

Carvalho PCT, Barral MF. Aplicação de lodo de esgoto como fertilizante. *Fertilizantes*. 1981; 3:1-4.

Cazarin KCC, Corrêa CL, Zambrone FAD. Toxicidade aguda: a contribuição dos novos métodos de ensaio. *ILSI Brasil Notícias*. 2007; 3:4-6.

Chiba MK. *Uso de lodo de esgoto na cana-de-açúcar como fonte de nitrogênio e fósforo: parâmetros de fertilidade do solo, nutrição da planta e rendimentos da cultura*.(Tese) Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo; 2005.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. *Aplicação de lodos de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas: critérios para projeto e operação*. São Paulo: CETESB; 1999. (Manual Técnico, Norma P4. 230).

CETESB - Companhia e Tecnologia e Saneamento Ambiental. *Critérios específicos para Aplicação do Lodo de Esgoto no Estado de São Paulo*. São Paulo; 1999.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 375, 11 de julho de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências, *Diário Oficial da União, Brasília*, 29 agosto de 2006 (Acesso em: 9 out. 2007). Disponível em: www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res3750.

Corrêa RS, Corrêa AS. Eficiência agronômica e produção vegetal de cinco biossólidos aplicados a dois solos tropicais. *Sanare*, 2003; 20:49-57.

*As referências bibliográficas seguem a norma de Vancouver

Da Ros CO, Aita C, Ceretta CA, Fries MR. Lodo de esgoto: efeito imediato no milho e residual na associação aveia-ervilhaça. *Rev Bras Ciênc Solo*. 1993; 17:257-61.

Defelipo BV, Nogueira AV, Loudes EG, Alvares ZVH. Eficiência agrônômica do lodo de esgoto proveniente de urna siderurgia. *Rev Bras Ciênc Solo*. 1991; 15:389-93.

Eaton DL, Klaassen CD. Principles of Toxicology. In: Casarett LJ. and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 6st. ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2001. p.11-34.

Endo H, Nagayoshi Y, Suzuki K. Production of glass ceramics from sewage sludge. *Water Sci. Technol*. 1997; 36:235–41.

Fernandes F. Lodo em estação de tratamento de água e esgoto. *Eng Sanit Ambient*. 1997; 1:169.

Fernandes F, Andreoli CV. Manual técnico para utilização agrícola do lodo de esgoto no Paraná. Curitiba: SANEPAR, 1997. 96p.

Frosta HL, Ketchum júnior LH. Trace metal concentration in durum wheat from application of sewage sludge and commercial fertilizer. *Adv Environ Res*. 2000; 4:347-55.

Glanze WD. *Mosby Medical Encyclopedia*. St. Louis; C.V. Mosby; 1996.

Korentajer L. A review of the agricultural use of sewage sludge: benefits and potential hazards. *Water Sci Technol*. 1991; 3:189-96.

Liew AG, Idris A, Samad AA, Wong CHK, Jaafar MS, Baki AM. Reusability of sewage sludge in clay bricks. *J Mater Cycles Waste Manag*. 2004; 6:41-47.

Lourenço RS, Anjos ARM, Libardi PL, Medrado MJS. Efeito do lodo de esgoto na produtividade de milho e feijão, no sistema de produção da bracinga. *Sanare*. 1996; 5:90-2.

Ludin M, Olofsson M, Pettersson GJ, Zetterlund H. Environmental and economic assessment of sewage sludge handling options. *Resour Conserv Recycl*. 2004; 41:255-78.

Mantovani A. Risk assessment of endocrine disrupters: the role of toxicological studies. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1079:239-52.

Martins MT, Sanches PS. Eficácia do tratamento químico e térmico na destruição de patógenos em lodo digerido. *Rev Bras Microbiol*. 1986; 17:148-54.

Muchovej, R. M., Obreza T.A. Biosolids: are these residuals all the same? Florida: University of Florida; 2001 (cited 6 fev 2008) available from: <http://edis.ifas.ufl.edu/AG114>.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. OECD Guideline for Testing the Chemicals, No. 407. Paris, OECD, 1995.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. OECD Guideline for Testing the Chemicals No. 408. Paris, OECD, 1998.

Saabye A, Krüger AS, Schwinning HG. Treatment and beneficial use of sewage sludge in the European Union. In Proceedings of a WEF Conference; 1994. [S.l.]; 12p.

Santos HF, Tsutiya MT, Miki MK, Ebert R, Delatorre C, Furukawa NA, et al. Critérios para o uso agrícola dos bio sólidos de ETEs da SABESP. São Paulo: SABESP; 1997. 35p.

Shirota R, Rocha MT. 1998 e o meio ambiente: 1999 e os novos rumos. Preços Agríc. 1999; 147:29.

Silvério J. Uso agrícola do lodo, da matéria orgânica do lixo urbano e de resíduos industriais. O Agrônomo. 2004; 56:5-8.

Sommers LE, Barbarick KA. Constraints to land application of sewage sludge. In: RUNGE ECA. Utilization, treatment, and disposal of waste on land. Madison: Soil Science Society of America; 1986. p.193-216.

Strauch D, Havelaar AH, L'hermite P. Inactivation of microorganisms in sewage sludge by stabilization processes. London: Elsevier; 1984.

Tollefsson J. Raking through sludge exposes a stink. Nature. 2008,453/15:262-263.

Tyler LD, McBride MB. Mobility and extractability of cadmium, copper, nickel and zinc in organic mineral soils columns. Soil Sci. 1989; 134:198-205.

Tsutiya MT. Características de bio sólidos gerados em estações de tratamento de esgotos. In: Tsutiya MT, Comparini JB, Alem PS, Hespanhol I, Carvalho PCT, Melfi AJ, et al. Bio sólidos na agricultura. São Paulo: SABESP; 2001. p. 89-131.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. A guide to the biosolids risk assessments for the EPA Part 503 rule, 1995. Washington: Office of Wastewater Management, EPA/832-B-93-005, 1995. 195p.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. Environmental Regulations and Technology: Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge (Including Domestic Septage) Under 40 CFR Part 503 (Revised July 2003). EPA, Washington, 1999.

Van Voorneburg F, Van Veen HJ. Treatment and disposal of municipal sludge in the Netherlands. *J Inst Water Environ Manage.* 1993; 7:117-21.

**ESTUDO DA TOXICIDADE ORAL DE 90 DIAS (DOSES REPETIDAS)
DO LODO DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO (LETE) EM
RATOS WISTAR***

**SUBCHRONIC ORAL TOXICITY STUDY OF SEWER-TREATED SLUDGE WITH
WISTAR RATS**

João Francisco L. Luvizutto^a, Paula Regina P. da Silva^a, Marize de Lourdes
M. Solano^a, Daniele Passarelli^b, João Lauro Viana de Camargo^a

^aNúcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana
(TOXICAM) – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

^bFaculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Botucatu

Autor Correspondente: João Lauro Viana de Camargo

Faculdade de Medicina Botucatu – UNESP

Departamento de Patologia

Distrito de Rubião Júnior, S/N

Botucatu/SP – CEP 18.618-000

Telefone (14) 3882-8255 – Fax (14) 3815-2348

e-mail: decam@fmb.unesp.br

Resumo

O processamento do esgoto urbano pelas estações de tratamento (ETE) produz o lodo (LETE), uma mistura complexa constituída por material orgânico, inorgânico (hidrocarbonetos aromáticos, minerais, metais pesados, etc.) e biológico (microorganismos, vegetais, etc.). Diante da possibilidade de reutilização do LETE para enriquecer áreas agrícolas e como insumo incorporado na matéria-prima da indústria cerâmica, o objetivo do presente trabalho foi avaliar parte do perfil toxicológico deste material pelo ensaio de toxicidade oral subcrônica de doses repetidas. Para tanto, foram utilizados 116 ratos Wistar machos e fêmeas com 6 semanas de idade, expostos via ração à concentrações de 0, 5.000, 10.000 e 50.000 ppm de LETE durante 90 dias. Nos animais tratados com o LETE e sacrificados após 28 e 90 dias não ocorreram quaisquer sinais clínicos expressivos, assim como não ocorreram alterações nos exames hematológicos, no ganho de peso, no consumo de água e ração, nos pesos absolutos e relativos de órgãos determinados, quando comparados aos respectivos controles. Alterações histológicas também não foram observadas nos animais expostos às maiores concentrações de LETE. Nas fêmeas de todos os grupos tratadas com o LETE e sacrificadas aos 90 dias houve aumento dos níveis da enzima aspartato aminotransferase (AST), o que sugere alguma agressão hepática. No entanto, em conjunto, os resultados indicam que a exposição oral a altas concentrações de um determinado lote de LETE durante 28 e 90 dias não exerce toxicidade sistêmica relevante em ambos os gêneros de ratos Wistar.

Palavras-chave: Lodo, estação de tratamento de esgoto, toxicidade oral, bio sólidos, ratos.

Abstract

The solid residue generated by the urban sewage treatment is called sewage-sludge (LETE). This complex mixture of organic and inorganic materials has been proposed for use in agriculture and as raw material for the pottery industry. The present study was conducted to determine the potential toxic effects of LETE to Wistar rats. After a 2-week acclimatizing period, 6-week old male and female rats were fed *ad libitum* during 90 days a commercial diet containing 0, 5000, 10000 or 50000 ppm of LETE. Five animals of each group were sacrificed at the 28th day of study. In those animals, and in the remaining animals sacrificed after 90 days of experiment, no alterations were registered on food and water consumptions, body weights, body weight gain and relative organ weights and in blood cell counts, when compared to the respective controls. Histological alterations were also not observed in all collected organs of the high-dose treatment animals. After 13 weeks there was significant increase of aspartate transaminase (AST) levels in all treated females of all treated groups, what suggest some liver damage. However, in general the present findings indicate the specific parcel studied does not induce toxicity when administered at very high doses during up to 90 days to both genders of Wistar rats.

Key words: sewage sludge, Wistar rats, sub-chronic oral toxicity.

INTRODUÇÃO

A transformação do esgoto em água reutilizável pelas estações de tratamento de esgotos (ETE) produz, secundariamente, uma mistura complexa de material inorgânico, orgânico e biológico, denominada “lodo de ETE” (LETE), basicamente constituída por detritos domésticos e industriais. A composição do LETE pode variar de acordo com sua origem, região, tipo de tratamento e época do ano (USEPA, 1999). Em geral, fazem parte da composição do LETE agentes tóxicos, como metais pesados, praguicidas e solventes, que podem representar risco potencial para o ambiente e para a biota exposta de forma direta ou indireta a ele. A designação “lodo de esgoto” tem sido substituída pelo termo “biossólido”; nos EUA, esse termo especifica o lodo que já passou por tratamento e atinge os padrões governamentais para a sua reutilização (USEPA, 1999).

A disposição final do LETE tem sido uma preocupação mundial pelo crescente aumento do seu volume, pelo fato de que alguns países têm adotado esse material para enriquecer o solo e, também, pelo desconhecimento quase completo de seu potencial tóxico (Bettiol e Camargo, 2000; Tollefsson, 2008). Esta prática de enriquecimento do solo não é muito difundida no Brasil, particularmente porque ainda são relativamente poucas as zonas urbanas que possuem estações de tratamento. No entanto, poderia ser uma solução para escoar o LETE produzido por regiões metropolitanas como a cidade de São Paulo, onde a produção do lodo é enorme e aterros sanitários são escassos. Uma possível limitação à esta medida é a intensa atividade industrial dessas regiões, que geram um lodo com altas concentrações de metais pesados e compostos orgânicos persistentes, que pode torna-lo potencialmente nocivo.

A possibilidade de reutilização do LETE para enriquecer áreas agrícolas é interessante porque aparentemente ele melhora as condições físicas do solo, permitindo a incorporação de macro e micronutrientes, além de proporcionar benefícios agrônômicos como elevação do pH do solo (Silva e cols., 2001), redução da acidez potencial (Berton e cols., 1989; Da Ros e cols., 1993). Existem informações do uso favorável do LETE em culturas de arroz, aveia, trigo, pastagens, feijão, soja, girassol, café e pêssego, e no cultivo de plantas do gênero *Eucalyptus*, entre outras, de modo que o produto apresenta potencial para substituição dos fertilizantes minerais. (Bettiol e Camargo, 2000; Gonçalves e cols., 1997).

Assim, a incorporação do LETE ao solo pode representar um benefício social, pela possibilidade de disposição final deste composto com um hipotético pequeno impacto no ambiente. No entanto, esta aplicação gera a possibilidade de exposição direta ou indireta dos seres humanos aos componentes do lodo. Em países onde o LETE é aplicado na agricultura, como nos Estados Unidos, existem normas que regulamentam as concentrações máximas de metais pesados no lodo e seu teor máximo acumulado no solo. No Brasil, a Resolução Nº 375 do CONAMA estabeleceu normas para o uso agrícola do LETE, vinculadas ao monitoramento periódico dos solos quanto aos níveis de metais pesados, compostos orgânicos e patógenos humanos (CONAMA, 2006).

A literatura nacional tem informações sobre a incorporação do LETE em solos cultiváveis, mas não provê subsídios para a regulamentação, manejo, fiscalização e controle da aplicação do lodo na agricultura. Por isso, é indispensável o conhecimento do potencial tóxico do LETE e de seu impacto no ambiente, para calcular quantidades seguras para sua incorporação ao solo

sem riscos às espécies expostas.

Dentre os vários ensaios toxicológicos possíveis, o ensaio de toxicidade subcrônica pode gerar informações para sustentar decisões técnicas sobre o reaproveitamento do LETE e, eventualmente, subsidiar a estimativa do risco da eventual exposição humana, embora o lodo constitua uma mistura complexa e não uma substância determinada (Monosson, 2005). O ensaio de toxicidade de doses repetidas por 90 dias, que tem seu protocolo validado internacionalmente (OECD, 1998), fornece indicações sobre os possíveis efeitos adversos decorrentes da exposição subcrônica à substância-teste, bem como identifica potenciais órgãos-alvo e as doses mais críticas.

O presente estudo procurou verificar a nocividade do LETE pelo ensaio de toxicidade oral de 90 dias. Além de examinar a histologia de todos os órgãos previstos por um protocolo validado internacionalmente (OECD, 1998), particular atenção foi dada ao fígado, onde foi verificado o aparecimento de hepatócitos que expressavam a enzima glutathione S-transferase, forma placentária (GST-P). Estes hepatócitos alterados podem ocorrer isoladamente ou em focos, sendo importantes para análise dos processos de iniciação e promoção da carcinogênese no fígado em roedores (Sato e cols., 1985; Moore e cols., 1999). Como o fígado é o principal órgão envolvido na biotransformação e eliminação de agentes químicos no organismo, a quantificação destes hepatócitos transformados pode fornecer uma indicação da exposição do órgão a componentes potencialmente genotóxicos existentes no LETE.

MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de Botucatu (Protocolo nº. 572).

Animais e ambiente de experimentação

Foram utilizados 116 ratos Wistar machos e fêmeas com aproximadamente quatro semanas de idade, adquiridos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da UNICAMP (CEMIB, Campinas, SP). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP, Botucatu (FMBBo), em gaiolas de polipropileno translúcido com grade de arame cromado, forradas com maravalha branca de pinho autoclavada. Os animais permaneceram por duas semanas em aclimatação, durante as quais foram avaliados clinicamente e pesados. Ao final deste período foram distribuídos aleatoriamente em grupos experimentais. A troca e a higienização das caixas foram realizadas três vezes por semana e as condições ambientais foram controladas: temperatura (22 ± 2 °C), umidade relativa (55 ± 10 %), ciclo de luz (12 horas claro/escuro) e exaustão contínua do ar. Os animais foram alimentados com ração comercial Nuvilab CR-1 (NUVITAL, PR) e água filtrada *ad libitum*.

Preparo da ração

O LETE foi fornecido pela Companhia e Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB/SP) em lotes sucessivos de 5 Kg, obtidos

durante 60 dias de uma mesma ETE do estado de São Paulo, que recebe esgoto predominantemente doméstico. As amostras foram mantidas sob refrigeração a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ enquanto não foram processadas. A seguir, os lotes foram homogeneizados, secos a temperatura ambiente, pulverizados e adicionados nas concentrações finais de 5.000, 10.000 e 50.000 ppm à ração comercial em pó (Nuvilab-CR1, Nuvital-PR). Após homogeneização e umidificação em misturador industrial (CAF-modelo M60), as misturas foram *peletizadas* em máquina industrial (Prensa Peletizadora Chavantes - PR), e os *pellets* resultantes foram secos por ventilação durante 24h. Todos estes procedimentos foram realizados no Dietário Experimental da FMBBo sob temperatura ambiente . As rações com diferentes concentrações de LETE foram embaladas em sacos plásticos próprios, identificados e mantidos em *freezer* ($-8\text{ }^{\circ}\text{C}$) por período máximo de 30 dias.

Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em quatro grupos experimentais, conforme o delineamento experimental (Figura 1). A partir do primeiro dia do experimento os animais receberam ração basal (grupo G4) ou acrescida com 5.000, 10.000 e 50.000 ppm de LETE (grupos G1, G2 e G3 respectivamente). Após 28 dias de tratamento 40 animais foram sacrificados (20 machos e 20 fêmeas), e o restante (80 animais), após 90 dias. A avaliação clínica e pesagem dos animais foram realizadas duas vezes por semana.

Coleta de urina fresca

Durante a última semana de cada experimento, entre 07h00 e 09h00 da manhã, a urina fresca miccional foi coletada por massagem lombar. Todas as amostras foram acondicionadas individualmente em microtubos plásticos e encaminhadas para o laboratório de análises clínicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (FMVZ, UNESP) para determinação de uréia e creatinina.

Coleta de sangue

Ao final de cada período experimental, imediatamente após anestesia dos animais com pentobarbital sódico 4% (45 mg/Kg de peso corpóreo, i.p.), foi feita a abertura das cavidades abdominal e torácica procedendo-se a coleta de sangue por punção cardíaca. A seguir foi realizada a eutanásia dos animais por secção dos vasos da base do coração. As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos de plástico com EDTA para realização do hemograma completo e em tubos sem anticoagulante para a dosagem de enzimas séricas (AST = aspartato aminotransferase; ALT = alanina aminotransferase). Para esses exames foram utilizados *kits* comerciais (SERA-PAK®, Bayer, França) e leitura fotométrica (COBAS, MIRA S., Roche, Alemanha). Na interpretação dos resultados foram considerados valores normais segundo Harkness e Wagner (1995).

Coleta e processamento de órgãos

Em ambos os experimentos, após abertura das cavidades e exame *in situ*, foram coletados cérebro, fígado, rins, adrenais, baço, timo, pâncreas, coração, pulmão, medula óssea, tubo digestivo, cólon, tireóide, traquéia, bexiga, testículos, útero e ovário. Destes, foram pesados fígado, rins, adrenais, baço e testículos. Todos os órgãos foram avaliados macroscopicamente e, a seguir, imersos em formalina 10% tamponada por 48 horas, para fixação. Após o processamento histológico, cortes de 3 a 4 micras de espessura foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação microscópica.

Análise histopatológica e processamento imunoistoquímico

A análise histológica dos órgãos coletados foi realizada baseando-se no atlas do Standardized System of Nomenclature and Diagnostic Criteria (SSNDC) que estão disponíveis na *internet*. (<http://www.toxpath.org/ssndc.asp>).

A detecção imunoistoquímica da expressão da enzima glutathione S-transferase forma placentária, (GST-P⁺) nos cortes histológicos do fígado dos grupos de 50.000ppm e nos controles negativo seguiu as seguintes etapas principais: bloqueio da peroxidase endógena (H₂O₂ a 3%, Merck, Alemanha), bloqueio de ligações inespecíficas (leite desnatado a 1%, Nestle, Brasil), incubação com o anticorpo primário policlonal anti-GST-P (Medical & Biological Laboratories Co., Tóquio, Japão, diluição 1:1000); incubação por uma hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho (Vector Laboratories Inc., Dinamarca) e incubação por 45 minutos a temperatura ambiente com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories Inc., Dinamarca). Os sítios de marcação foram detectados por

incubação com solução de 3,3'-diaminobenzidina a 0,038% (Sigma, EUA) e peróxido de hidrogênio a 0,025% (Merck, Alemanha) dissolvidos em PBS por cerca de 5 minutos à temperatura ambiente. A contra-coloração dos cortes foi realizada com hematoxilina de Harris por cerca de 1 a 2 minutos.

Os hepatócitos isolados e minifocos expressando GST-P⁺ foram quantificados utilizando-se o fotomicroscópio Nikon (Microphot-FXA) acoplado a microcomputador, por meio do programa KS-300 (Kontron Elektronik, Alemanha). Os parâmetros registrados foram número de hepatócitos e minifocos GST-P⁺ por cm² e por animal.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Jandel Sigma Stat® versão 2.0. Os dados de peso corpóreo, pesos absolutos e relativos dos órgãos e consumo de ração e de água foram avaliados pela Análise de Variância. A análise dos resultados bioquímicos e hematológicos foi feita pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras independentes (Norman & Streiner, 1994). A diferença estatística foi considerada existente quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Peso corpóreo, consumo de ração e água e peso de órgãos

Após 28 e 90 dias, não foram observados sinais clínicos expressivos ou mortalidade em quaisquer grupos estudados, assim como não ocorreram alterações no ganho de peso. As Tabelas 1 e 2 apresentam os valores médios de peso corpóreo inicial, final e ganho de peso dos animais durante o período experimental. Durante o experimento todos os grupos apresentaram ganho progressivo de peso (Figuras 1 e 2).

As Tabelas 3 e 4 apresentam os valores do consumo médio estimado de água (ml/rato/dia) e ração (g/rato/dia), assim como os de ingestão estimada de LETE, calculada a partir de sua concentração nominal na ração.

Com relação aos pesos absolutos e relativos dos órgãos, não foram observadas alterações associadas aos tratamentos com as diferentes concentrações de LETE.

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Embora não tenham sido observadas alterações dose-resposta dos parâmetros biológicos quanto aos tratamentos com o LETE, após 90 dias, foi observado aumento dos níveis de AST nas fêmeas de todos os grupos tratados com o LETE. As alterações hematológicas registradas em ambos os sexos nos dois períodos foram inconsistentes e também não apresentaram relação dose-resposta (Tabelas 9).

Análise histológica e imunoistoquímica

Não foram observadas alterações histológicas relevantes que pudessem ser associadas à exposição ao LETE. O tratamento de 50.000ppm não alterou o desenvolvimento dos hepatócitos isolados e minifocos GST-P⁺ (Tabela 10).

DISCUSSÃO

Diante do exposto, é conclusão do presente trabalho que o LETE não exerce toxicidade sistêmica nas concentrações testadas (5.000, 10.000 e 50.000 ppm) em ratos Wistar de ambos os gêneros expostos pela ração a esta mistura complexa por até 90 dias. De fato, o ganho de peso corpóreo (Figura 1) e a ingestão de ração e água (Tabelas 1 e 2) ocorreram sem diferenças significativas entre os grupos. O exame necroscópico e a análise histológica dos órgãos também não revelaram alterações em quaisquer dos grupos expostos. Como os achados histológicos estão entre os parâmetros mais importantes para caracterização de toxicidade, pois são base para detecção dos órgãos-alvo e da toxicidade sistêmica da substância-teste (Lanning, 2001), a ausência de alterações histológicas neste estudo, associados à falta de alteração significativa da maioria dos outros parâmetros, sugere que o LETE é relativamente inócuo quando fornecido em doses relativamente altas por até 90 dias.

Com relação à análise bioquímica, os resultados mais sugestivos foram dos níveis da enzima AST, que se mostraram significativamente aumentados nos três grupos de fêmeas tratadas com LETE durante 90 dias, quando seus níveis foram comparados aos dos controles negativos. Este aumento também foi observado nos machos neste período, porém, sem significância estatística. Embora a interpretação dos achados experimentais deva ser subordinados aos resultados de sua análise estatística, devem ser tomados alguns cuidados quando a observação biológica e as diferenças estatísticas não são absolutamente coincidentes.

As aminotransferases, incluindo a AST (aspartato aminotransferase) e a ALT (alanina aminotransferase), são indicadoras de danos nos hepatócitos, pois estão presentes em seu citosol e na ocorrência de alterações de permeabilidade da membrana plasmática extravasam para o meio extracelular (Lanning, 2001). Embora alguns autores ressaltem a menor especificidade da AST (pois pode se apresentar aumentada em caso de outras doenças ou lesão muscular), esta enzima também é utilizada como indicador de lesão hepática (Harkness e Wagner, 1995; Lanning, 2001).

O aumento dos níveis de AST foi significativo apenas ao final de 90 dias. Estes dados, ainda que sem correlação morfológica (do fígado ou dos demais órgãos examinados), sugerem que o estudo subcrônico foi eficiente para detectar mudanças bioquímicas que refletem alterações celulares incipientes, que talvez pudessem ser confirmadas em estudo crônico (52 semanas ou mais).

Os estudos padrão de avaliação de toxicidade em animais de experimentação são feitos com substâncias isoladas, geralmente com níveis de pureza bem definidos. Diferentemente, a avaliação do risco toxicológico de biossólidos baseia-se nos dados toxicológicos de alguns de seus componentes individuais, como o alquilbenzeno linear sulfonado (LAS), um surfactante amplamente utilizado em detergentes e produtos de limpeza em geral, o chumbo e outros metais, que neste contexto são utilizados como marcadores da exposição ao LETE (Schowanek e cols., 2004; 2007).

Embora sem caracterizar qualquer marcador químico nas amostras estudadas, o Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde (TOXICAM) também enfocou os potenciais toxicogenético e cancerígeno do LETE por diferentes ensaios, além do ensaio de 90 dias apresentado neste estudo. Estes ensaios indicaram ausência de potencial mutagênico e genotóxico do LETE independente do tempo de exposição e das concentrações testadas (Solano e cols., 2008; Silva e cols., 2008). Assim, no conjunto, os estudos desenvolvidos no TOXICAM sugerem que o LETE produzido na estação de tratamento teste não oferece toxicidade sistêmica, nem genotoxicidade. Estão em conclusão em nosso laboratório estudos sobre o potencial cancerígeno do LETE, desenvolvidos em ensaios alternativos que usam como sistema alvo o fígado e o cólon de ratos Wistar.

Apesar de existirem normas regulamentadoras para uso do LETE, a aceitação pública pode ser um fator regulador muito restritivo para sua ampla utilização (Dunn, 2000). A percepção social dos riscos na maioria das vezes não se baseia em critérios científicos e nem está associada ao grau do risco ao ambiente e à saúde pública (USEPA, 1999; 2000). Investimentos em programas adequados de comunicação do risco podem evitar a rejeição pública e a aversão dos produtores rurais, trabalhadores e consumidores ao uso agrícola do LETE, viabilizando seu uso e produção em escala comercial.

REFERÊNCIAS

- Berton, R.S., Camargo, O.A., Valadares, J.M.A.S, 1989. Absorção de nutrientes pelo milho em resposta à adição de lodo de esgoto a cinco solos paulistas. *Rev Bras Ciênc Solo*. 13,187-192.
- Bettiol, W., Camargo, O.A, 2000. Impacto Ambiental do Uso Agrícola do Lodo de Esgoto. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna. 312p.
- CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental, 1999. Aplicação de Lodo de Sistemas de Tratamento Biológicos em Áreas Agrícolas – Critérios para Projeto e Operação. (Manual Técnico – P4230). 32p.
- CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental, 1999. Critérios Específicos para Aplicação do Lodo de Esgoto no Estado de São Paulo. 13p.
- CONAMA Resolução n. 375, 11 de julho de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências, *Diário Oficial da União*, Brasília, 29 agosto de 2006. Disponível on line: <www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res3750>.
- Da Ros, C.O., Aita, C., Ceretta, C.A., Fries, M.R., 1993. Lodo de esgoto: efeito imediato no milho e residual na associação aveia-ervilhaça. *Rev Bras Ciênc Solo* 17, 257-261.
- USEPA - Environmental Protection Agency., 1999. Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. Washington.
- Gonçalves, R.F., Nascimento, C.G., Ferrari, G.F., Muller, P.S.G., 1997. Lodo de lagoas de estabilização em operação no Espírito Santo: formação e características. In: XIX congresso brasileiro de engenharia sanitária e ambiental, Foz do Iguaçu, 427-437.
- Harknees, J.E., Wagner, J. E., 1994. *The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents*. 4th ed. Washington: Lea and Febiger.
- Lanning, L.L., 2001. Toxicological pathology assessment. In: JACOBSON-KRAM, D.; KELLER, K.A. (Ed.), *Toxicology Testing Handbook*. Marcel Dekker, New York, pp. 315-343.
- Moore M.A., Tsuda H., Tamano S., Hagiwara A., Imaida K., Shirai T., Ito N. 1999. Marriage of a medium-term liver model to surrogate markers - a practical approach for risk and benefit assessment. *Toxicol Pathol*. 27: 237-42.

- Monosson E. 2004. Chemical mixtures: considering the evolution of toxicology and chemical assessment. *Environ Health Perspect* 113:383-390.
- Norman, G.R., Streiner, D.L., 1994. *Biostatistics: the Bare Essentials*. Mosby Book, St. Louis.
- OECD - Organization for Economic Co-operation and Development, 1995. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. (OECD Guideline for Testing the Chemicals, 407). OECD, Paris.
- OECD - Organization for Economic Co-operation and Development, 1998. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents. (OECD Guideline for Testing the Chemicals, 408). OECD Paris.
- Satoh K, Kitahara A, Soma Y, Inaba Y, Hatayama I, Sato K. 1985. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 82: 3964-3968.
- Silva, F.C., Boaretto, A.E., Berton, R.S., Zotelli, H.B., Peixe, C.A., Bernardes, H.M., 2001. Efeito do lodo de esgoto na fertilidade de um Argissolo Vermelho-Amarelo cultivado com cana-de-açúcar. *Pesqui Agropec Bras*. 36, 831-840.
- Schowanek D, Carr R, David H, Douben P, Hall J, Kirchmann H, Pátria L, Sequi P, Smith S, Webb S. 2004. A risk-based methodology for deriving quality standards for organic contaminants in sewage sludge for use in agriculture – conceptual framework. *Reg Toxicol Pharmacol* 40: 227-251.
- Schowanek D, David H, Francaviglia R, Hall J, Kirchmann H, Krogh PH, Schraepen N, Smith S, Wildemann T. 2007. Probabilistic risk assessment for linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in sewage sludge used on agricultural soil. *Reg Toxicol Pharmacol* 49: 245-259.
- Silva, P.R.P. 2008. Potencial cancerígeno do LETE em ensaios alternativos de média duração. Processo FAPESP 06/50295-3).
- Solano, M.L.M., Luvizutto, J.F., Silva, P.R.P., Alves de LIMA, P.L., de Camargo, J.L.V., 2007. Comet assay genotoxicity evaluation of sewer-treated sludge in rats submitted to a 13-week study. In: XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, Búzios. *Rev Bras de Toxicol*. 20, 189.
- Solano, M.L.M., Luvizutto, J.F., Silva, P.R.P., Alves de LIMA, P.L., de Camargo, J. L. V., 2007. Rat femoral bone marrow micronuclei development after a 13-week exposure to biosolid (LETE). In: XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, Búzios. *Rev Bras de Toxicol*. 20, 164.
- Tollefsson J. Raking through sludge exposes a stink. *Nature*. 2008,453/15:262-263.

TABELAS

Tabela 1 - Peso corpóreo inicial e final e ganho de peso corpóreo dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final de 28 dias¹.

| Grupo/Tratamento ² | Número efetivo de ratos | Peso Corpóreo (g) | | | |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------|------------|----------------------------|------------|
| | | Inicial | Final | Ganho de Peso ³ | |
| Fêmeas | | | | | |
| G1 | 5.000 ppm | 05 | 167,2±12,6 | 241,2±17,1 | 74,0±8,8 |
| G2 | 10.000 ppm | 05 | 155,6±9,6 | 225,6±5,3 | 70,0±8,7 |
| G3 | 50.000 ppm | 05 | 162,8±6,7 | 233,0±9,1 | 70,2±2,9 |
| G4 | controle | 05 | 168,2±4,0 | 228,2±7,8 | 60,0±8,5 |
| Machos | | | | | |
| G1 | 5.000 ppm | 05 | 150,0±9,4 | 333,6±14,0 | 183,6±12,8 |
| G2 | 10.000 ppm | 05 | 151,4±10,0 | 338,2±36,4 | 186,8±30,1 |
| G3 | 50.000 ppm | 05 | 156,8±9,1 | 336,2±28,2 | 179,4±26,1 |
| G4 | controle | 05 | 151,6±10,2 | 360,0±14,9 | 208,4±15,6 |

¹Valores apresentados na forma de média ± SD; ² Ração basal acrescida de 5.000, 10.000 e 50.000 ppm de LETE. ³ Ganho de peso = peso corpóreo final – peso corpóreo inicial.

Tabela 2 - Peso corpóreo inicial e final e ganho de peso corpóreo dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final de 90 dias¹.

| Grupo/Tratamento ² | | Número efetivo de ratos | Peso Corpóreo (g) | | |
|-------------------------------|------------|-------------------------|-------------------|------------|----------------------------|
| | | | Inicial | Final | Ganho de Peso ³ |
| Fêmeas | | | | | |
| G1 | 5.000 ppm | 10 | 154,0±10,0 | 261,2±20,4 | 107,1±18,6 |
| G2 | 10.000 ppm | 10 | 165,0±8,0 | 274,2±19,5 | 109,1±17,0 |
| G3 | 50.000 ppm | 10 | 156,0±6,0 | 261,3±22,7 | 105,0±20,2 |
| G4 | Controle | 08 | 167,0±13,0 | 267,1±17,2 | 99,45±10,4 |
| Machos | | | | | |
| G1 | 5.000 ppm | 10 | 161,2±14,1 | 455,2±41,5 | 294±35,9 |
| G2 | 10.000 ppm | 10 | 153,3±13,0 | 442,6±28,1 | 289,3±24,1 |
| G3 | 50.000 ppm | 10 | 155,1±10,5 | 448,7±23,9 | 293,6±23,3 |
| G4 | Controle | 08 | 150,6±16,9 | 440,9±31,3 | 290,3±26,4 |

¹Valores apresentados na forma de média ± SD; ² Ração basal acrescida de 5.000, 10.000 e 50.000 ppm de LETE; ³Ganho de peso = peso corpóreo final – peso corpóreo inicial.

Tabela 3 - Consumo médio estimado de ração e água e ingestão estimada de lodo pelos animais dos diferentes grupos experimentais durante o estudo de 28 dias¹.

| Grupo/Tratamento ² | Número efetivo de ratos | Consumo de Água | Consumo de Ração | Consumo de Lodo | | |
|-------------------------------|-------------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------|----------|
| | | ml/rato/dia | g/rato/dia | g/rato/dia | g/kg/dia | |
| Fêmeas | | | | | | |
| G1 | 5.000 ppm | 05 | 26,6±2,0 | 17,0±0,9 | 0,1±0,002 | 0,4±0,04 |
| G2 | 10.000 ppm | 05 | 27,0±1,4 | 17,4±0,6 | 0,2±0,001 | 0,9±0,08 |
| G3 | 50.000 ppm | 05 | 30,6±3,6 | 17,7±0,7 | 0,9±0,02 | 4,4±0,3 |
| G4 | Controle | 05 | 27,7±4,0 | 17,4±0,6 | - | - |
| Machos | | | | | | |
| G1 | 5.000 ppm | 05 | 34,3±1,4 | 24,9±2,1 | 0,1±0,01 | 0,5±0,07 |
| G2 | 10.000 ppm | 05 | 35,0±1,6 | 24,6±1,4 | 0,3±0,01 | 1,0±0,16 |
| G3 | 50.000 ppm | 05 | 34,8±2,0 | 25,4±2,3 | 1,3±0,11 | 5,2±0,73 |
| G4 | Controle | 05 | 35,1±1,5 | 25,7±1,7 | - | - |

¹Valores apresentados na forma de média ± SD; ² Ração basal acrescida de 5.000, 10.000 e 50.000 ppm de LETE.

Tabela 4 - Consumo médio estimado de ração e água e ingestão estimada de lodo pelos animais dos diferentes grupos experimentais durante o estudo de 90 dias¹.

| Grupo/Tratamento ₂ | | Número efetivo de ratos | Consumo de Água | Consumo de Ração | Consumo de Lodo | |
|----------------------------------|--------------|-------------------------|-----------------|------------------|-----------------|----------|
| | | | ml/rato/dia | g/rato/dia | g/rato/dia | g/kg/dia |
| Fêmeas | | | | | | |
| G1 | 5.000 ppm | 10 | 27,5±1,6 | 18,1±2,8 | 0,1±0,0 | 0,4±0,1 |
| G2 | 10.000 ppm | 10 | 27,4±1,5 | 18,8±1,5 | 0,2±0,0 | 0,8±0,1 |
| G3 | 50.000 ppm | 10 | 30,1±3,5 | 16,4±1,1 | 0,8±0,1 | 3,6±0,7 |
| G4 | Controle ppm | 08 | 28,0±1,8 | 17,9±0,6 | - | - |
| Machos | | | | | | |
| G1 | 5.000 ppm | 10 | 34,3±1,4 | 25,9±1,6 | 0,1±0,01 | 0,4±0,06 |
| G2 | 10.000 ppm | 10 | 35,0±1,6 | 25,1±2,2 | 0,3±0,01 | 0,8±0,08 |
| G3 | 50.000 ppm | 10 | 34,8±2,0 | 26,5±2,2 | 1,3±0,06 | 4,0±0,68 |
| G4 | Controle ppm | 08 | 35,1±1,5 | 25,4±1,4 | - | - |

¹Valores apresentados na forma de média ± SD; ² Ração basal acrescida de 5.000, 10.000 e 50.000 ppm de lodo.

Tabela 5 - Pesos relativos¹ dos órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final de 28 dias.

| Grupo/ Tratamento ² | Número efetivo de ratos | Peso Relativo (%) | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------|----------------|-----------------|----------|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|----------|
| | | Fígado | Rim Direito | Rim Esquerdo | Baço | Adrenal Direita | Adrenal Esquerda | Testículo Direito | Testículo Esquerdo | |
| Fêmeas | | | | | | | | | | |
| G1 | 5.000 ppm | 05 | 4,3±0,4 | 0,4±0,05 | 0,4±0,05 | 0,3±0,05 | 0,03±0,006 | 0,02±0,005 | - | - |
| G2 | 10.000 ppm | 05 | 4,1±0,4 | 0,4±0,04 | 0,4±0,04 | 0,3±0,03 | 0,03±0,008 | 0,03±0,007 | - | - |
| G3 | 50.000 ppm | 05 | 4,0±0,5 | 0,4±0,06 | 0,4±0,06 | 0,4±0,06 | 0,02±0,004 | 0,02±0,006 | - | - |
| G4 | Controle | 05 | 3,8±0,4 | 0,4±0,04 | 0,3±0,04 | 0,3±0,03 | 0,02±0,002 | 0,02±0,004 | - | - |
| Machos | | | | | | | | | | |
| G1 | 5.000 ppm | 05 | 4,2±0,3 | 0,4±0,01 | 0,3±0,01 | 0,3±0,01 | 0,01±0,004 | 0,01±0,002 | 0,8±0,09 | 0,8±0,08 |
| G2 | 10.000 ppm | 05 | 4,3±0,9 | 0,4±0,06 | 0,3±0,04 | 0,3±0,04 | 0,01±0,002 | 0,01±0,004 | 0,7±0,16 | 0,8±0,13 |
| G3 | 50.000 ppm | 05 | 4,4±0,6 | 0,4±0,05 | 0,4±0,05 | 0,3±0,04 | 0,01±0,003 | 0,01±0,002 | 0,8±0,08 | 0,8±0,04 |
| G4 | Controle | 05 | 4,2±0,5 | 0,3±0,04 | 0,3±0,02 | 0,3±0,05 | 0,01±0,003 | 0,01±0,001 | 0,8±0,02 | 0,8±0,02 |

¹Peso relativo do órgão = (peso absoluto do órgão / peso corpóreo final) x 100; valores apresentados na forma de media ±SD;² Ração basal acrescida de 5.000, 10.000 e 50.000 ppm de iodo.

Tabela 6 - Peso relativo¹ dos órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final de 90 dias.

| Grupo/ Tratamento ² | Número efetivo de ratos | Peso Relativo (%) | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------|----------------|-----------------|----------|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|----------|
| | | Fígado | Rim Direito | Rim Esquerdo | Baço | Adrenal Direita | Adrenal Esquerda | Testículo Direito | Testículo Esquerdo | |
| Fêmeas | | | | | | | | | | |
| G1 | 5.000 ppm | 10 | 3,8±0,6 | 0,3±0,03 | 0,3±0,04 | 0,3±0,03 | 0,02±0,003 | 0,02±0,004 | - | - |
| G2 | 10.000 ppm | 10 | 3,6±0,3 | 0,3±0,02 | 0,3±0,02 | 0,3±0,04 | 0,02±0,006 | 0,03±0,006 | - | - |
| G3 | 50.000 ppm | 10 | 3,8±0,3 | 0,3±0,02 | 0,3±0,01 | 0,3±0,02 | 0,02±0,004 | 0,02±0,005 | - | - |
| G4 | Controle | 08 | 3,6±0,3 | 0,3±0,01 | 0,3±0,03 | 0,3±0,03 | 0,02±0,004 | 0,02±0,004 | - | - |
| Machos | | | | | | | | | | |
| G1 | 5.000 ppm | 10 | 3,4±0,3 | 0,3±0,02 | 0,3±0,03 | 0,2±0,03 | 0,01±0,003 | 0,01±0,002 | 0,7±0,1 | 0,8±0,1 |
| G2 | 10.000 ppm | 10 | 3,5±0,3 | 0,3±0,03 | 0,3±0,02 | 0,2±0,02 | 0,01±0,002 | 0,01±0,002 | 0,7±0,1 | 0,8±0,1 |
| G3 | 50.000 ppm | 10 | 3,3±0,2 | 0,3±0,02 | 0,3±0,01 | 0,2±0,07 | 0,01±0,002 | 0,01±0,002 | 0,8±0,1 | 0,80±0,1 |
| G4 | Controle | 08 | 3,3±0,2 | 0,3±0,02 | 0,3±0,02 | 0,2±0,02 | 0,01±0,003 | 0,01±0,003 | 0,8±0,1 | 0,8±0,1 |

¹Peso relativo do órgão = (peso absoluto do órgão / peso corpóreo final) x 100; valores apresentados na forma de média ± SD; ² Ração basal acrescida de 5.000, 10.000 e 50.000 ppm de lodo.

Tabela 7 - Bioquímica sérica dos animais dos diferentes grupos ao final de 28 dias.

| Grupo/ Tratamento ² | Número efetivo de amostras | Uréia (mg/dL) | Creatinina (mg/ dL) | AST (UI/L) | ALT (UI/L) |
|-----------------------------------|----------------------------------|------------------|------------------------|------------|------------|
| Fêmeas | | | | | |
| G1 5.000 ppm | 05 | 64,1±5,8 | 0,7±0,1 | 172,2±55,6 | 21,5±3,2 |
| G2 10.000 ppm | 04 | 59,0±7,3 | 0,6±0,1 | 117,2±15,7 | 18,9±5,4* |
| G3 50.000 ppm | 05 | 67,4±18,2 | 0,7±0,2 | 138,6±22,4 | 24,3±5,7 |
| G4 Controle | 05 | 61,9±6,9 | 0,7±0,2 | 167,4±39,1 | 30,2±6,8 |
| Machos | | | | | |
| G1 5.000 ppm | 05 | 55,7±7,9 | 0,6±0,0 | 144,4±21,3 | 25,2±4,1 |
| G2 10.000 ppm | 05 | 60,7±3,8 | 0,5±0,0 | 175,2±87,3 | 28,1±5,4 |
| G3 50.000 ppm | 05 | 50,9±4,1 | 0,6±0,1 | 127,0±37,4 | 26,4±2,7 |
| G4 Controle | 05 | 56,0±3,2 | 0,6±0,1 | 121,2±32,5 | 26,0±3,3 |

¹Valores apresentados na forma de média ±SD; ²Ração basal acrescida de 5.000, 10.000 e 50.000 ppm de Iodo; *p=0,032 – (Tukey Test).

Tabela 8 – Bioquímica sérica dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final de 90 dias¹.

| Grupo/ Tratamento ² | Número efetivo de amostras | Uréia (mg/dL) | Creatinina (mg/ dL) | AST (UI/L) | ALT (UI/L) |
|-----------------------------------|----------------------------------|------------------|------------------------|-------------|------------|
| Fêmeas | | | | | |
| G1 5.000 ppm | 10 | 60,3± 4,7 | 0,7± 1,0 | 144,7±26,0* | 40,8±15,2 |
| G2 10.000 ppm | 10 | 57,8± 7,4 | 0,7± 0,1 | 136,3±17,1* | 34,0± 9,9 |
| G3 50.000 ppm | 10 | 64,1±5,5 | 0,7±0,1 | 135,7±16,0* | 33,0±4,1 |
| G4 Controle | 08 | 64,6± 8,0 | 0,7± 0,1 | 115,3±11,0 | 38,3± 6,8 |
| Machos | | | | | |
| G1 5.000 ppm | 10 | 71,4±6,8 | 0,6±0,1 | 137,5±20,3 | 37,6±9,2 |
| G2 10.000 ppm | 10 | 68,7±3,4 | 0,6±0,1 | 127,2±15,0 | 37,1±6,0 |
| G3 50.000 ppm | 10 | 75,4±5,3 | 0,6±0,1 | 135,1±24,4 | 31,2±4,6 |
| G4 Controle | 08 | 73,0±4,4 | 0,6±0,0 | 117,6±16,7 | 34,1±3,8 |

¹Valores apresentados na forma de média ± SD; ² Ração basal acrescida de 5.000, 10.000 e 50.000 ppm de lodo

* Diferença estatística em relação ao controle p<0,05 - (Tukey Test)

Tabela 9 - Exame hematológico dos diferentes grupos ao final de 90 dias¹.

| Grupo/ Tratamento ² | Número efetivo de amostras | Hemoglobina (g/dl) | Hematócrito (%) | Volume corpuscular médio(fL) | Concentração de hemoglobina corpuscular média (%) | Plaquetas (g/dL) | Neutrófilos Segmentados (%) | Linfóitos (%) | Eosinófilos (%) | Monócitos (%) | Hemácias (mm ³) | Leucócitos (mm ³) | |
|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------|--------------------|------------------------------------|--|---------------------|-----------------------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------|
| Fêmeas | | | | | | | | | | | | | |
| G1 | 5.000 ppm | 10 | 11,6±0,4 | 39,1±1,8 | 61,5±4,2 | 28,8±1,65 | 6,4±0,5 | 26,8±9,9 | 70,2±11,8 | 2,8±1,7 | 1,6±2,6 | 6375215 | 2052 |
| G2 | 10.000 ppm | 10 | 11,9±0,5 | 40,2±1,8 | 70,2±4,6 | 29,7±2,0 | 6,2±0,2 | 19,6±7,2 | 73,4±6,7 | 2,6±2,7 | 4,0±2,8 | 5746365* | 1401,6 |
| G3 | 50.000 ppm | 10 | 12,5±0,4 | 42,3±1,6 | 65,7±3,1 | 29,5±0,5 | 6,3±0,3 | 21,8±7,7 | 74,6±6,8 | 1,4±1,7 | 2,2±2,2 | 6443500 | 1681,1 |
| G4 | Controle | 08 | 11,4±4,2 | 37,1±13,4 | 59,2±21,2 | 27,4±10,4 | 5,8±2,1 | 21,5±12,8 | 66,1±25,2 | 1,3±2,6 | 2,0±1,7 | 5597111,62 | 1469,1 |
| Machos | | | | | | | | | | | | | |
| G1 | 5.000 ppm | 10 | 13,6±0,6* | 44,10±2,2 | 70,4±1,3 | 31,0±0,8 | 6,1±0,3 | 20,0±5,3 | 75,0±5,8 | 2,0±2,5 | 3,0±2,5 | 6269000 | 1996,8 |
| G2 | 10.000 ppm | 10 | 13,6±0,4* | 43,0±1,3 | 71,0±2,0 | 31,5±0,4* | 5,9±0,3* | 24,4±7,0 | 69,6±7,0* | 2,4±2,1 | 3,4±1,9 | 6057000 | 2605,9 |
| G3 | 50.000 ppm | 10 | 12,6±0,4 | 42,6±1,7 | 67,2±4,3 | 29,5±1,2 | 6,2±0,2 | 22,0±5,6 | 75,2±5,8 | 1,6±2,3 | 1,2±1,4 | 6359000 | 1964,4 |
| G4 | Controle | 08 | 12,5±0,2 | 42,8±0,7 | 70,8±2,0 | 29,3±0,6 | 6,2±0,2 | 17,5±6,3 | 77,9±6,0 | 2,5±2,1 | 2,1±3,1 | 6042500 | 2343,0 |

¹Valores apresentados na forma de média ± SD; ² Ração basal acrescida de 5.000, 10.000 e 50.000 ppm de lodo; * diferença estatística em relação ao controle p<0,05

Tabela 10 – Hepatócitos GST-P+ nos grupos tratados com 50.000 ppm ao final de 90 dias¹.

| Grupo/ Tratamento ² | | Número efetivo de ratos | Número de hepatócitos GST-P+/cm ² |
|--------------------------------|------------|-------------------------|--|
| Fêmeas | | | |
| G3 | 50.000 ppm | 10 | 18,55±8,40 |
| G4 | Controle | 08 | 18,44±10,21 |
| Machos | | | |
| G3 | 50.000 ppm | 10 | 18,38±3,14 |
| G4 | Controle | 08 | 21,29±11,29 |

¹Valores apresentados na forma de média ± SD; ² Ração basal acrescida de 0 e 50.000ppm de lodo;

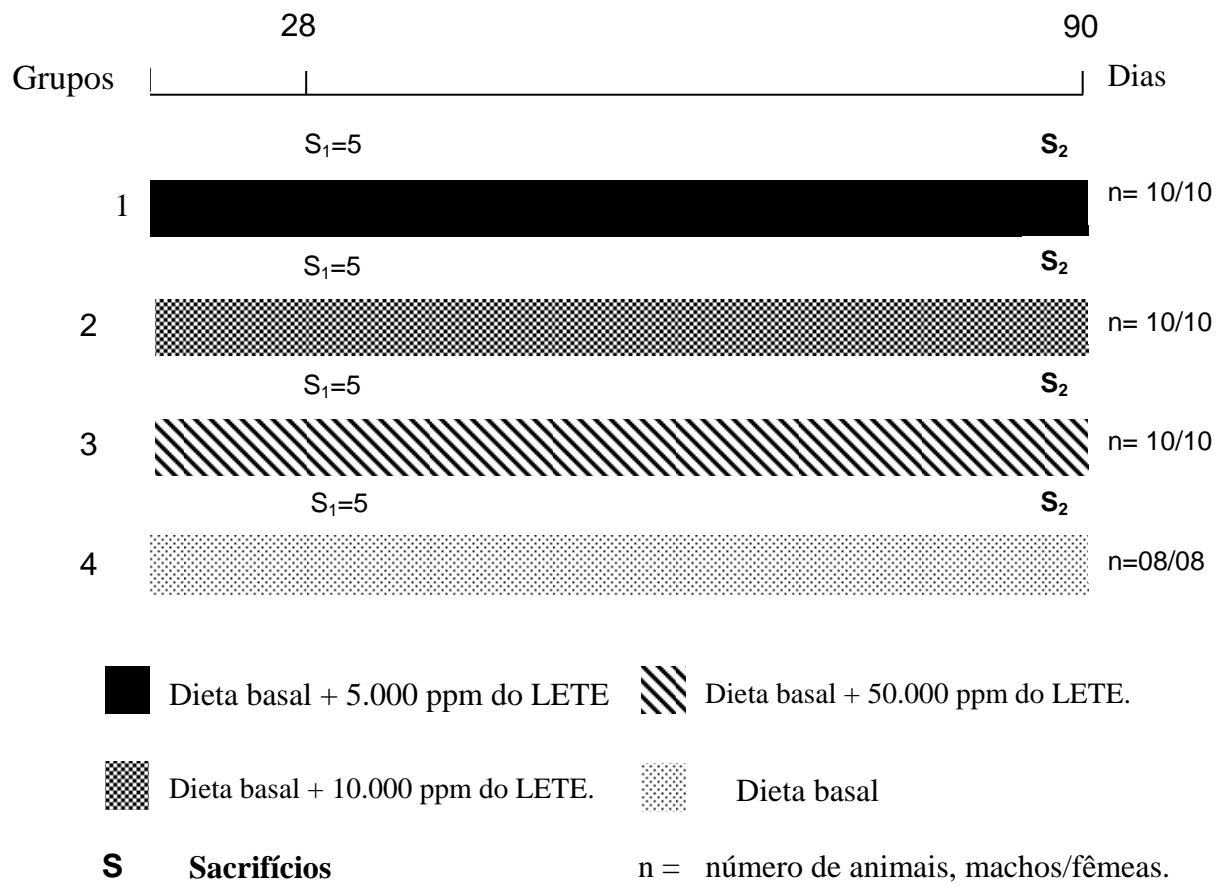


Figura 3 – Delineamento Experimental

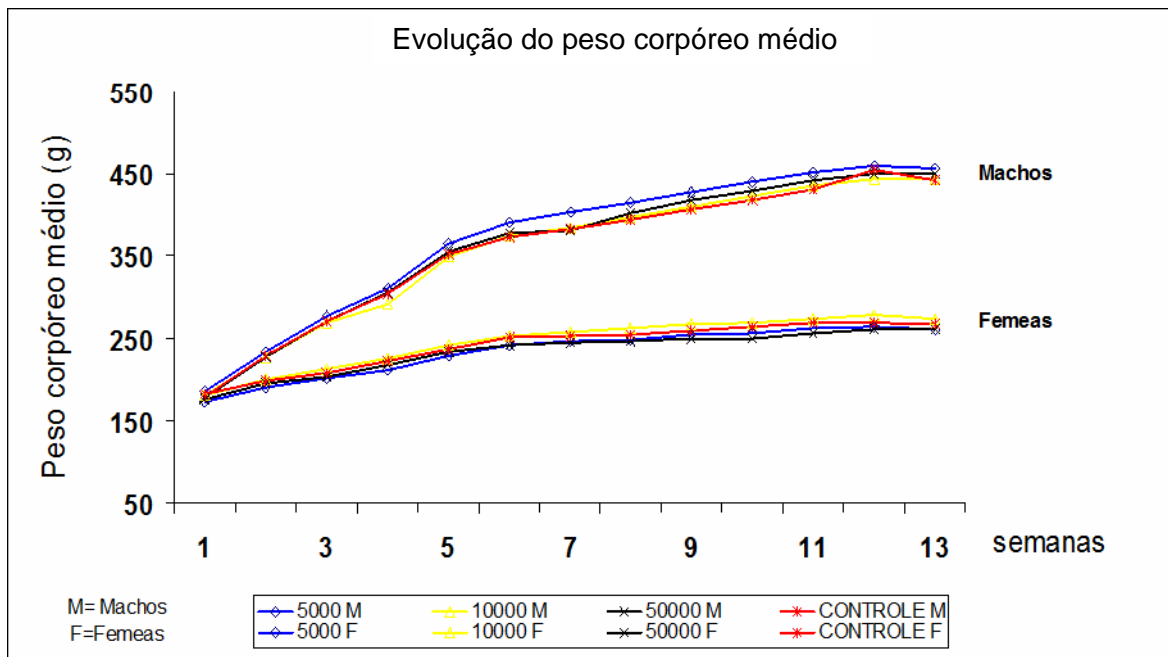


Figura 1 – Evolução de peso corpóreo médio dos grupos ao longo de 90 dias.