Ana Cristina Mielli

**Avaliação da atividade genotóxica de lodo de esgoto
tratado do Estado de São Paulo com o teste de
micronúcleo em células germinativas de *Tradescantia*
(Trad-MN)**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Patologia

Orientadora: Dr^a Gisela de Aragão Umbuzeiro

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mielli, Ana Cristina

Avaliação da atividade genotóxica de lodo de esgoto tratado do Estado de São Paulo com o teste de micronúcleo em células germinativas de *Tradescantia* (Trad-MN) / Ana Cristina Mielli. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientadora: Gisela de Aragão Umbuzeiro.

Descritores: 1.Disposição final de lodos 2.Águas residuárias 3.*Tradescantia*
4.Testes para micronúcleos 5.Genotoxicidade 6.Fatores de risco

USP/FM/SBD-187/08

*Aos meus pais, José Luiz e Mercedes,
exemplo de dedicação e caráter.*

*Aos meus filhos, Israel e Victor,
as minhas razões de buscar algo maior.*

*“O maior bem que podemos fazer aos outros não é oferecer-lhe
a nossa riqueza, mas levá-los a descobrir a deles.”*

(Louis Lovele)

Agradecimentos

Meus agradecimentos à Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro orientadora dedicada, que aprendi admirar pela sua inteligência perspicaz, sempre disposta a esclarecer minhas dúvidas.

*“Não se pode ensinar coisa alguma a alguém
Pode-se apenas auxiliá-lo a descobrir por si só.”*

(Galileu Galilei)

Meus agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva pelo apoio e incentivo;

Às amigas Adriana Pires, Ana Lúcia Lorente, Angélica Baganha Ferreira, Margarete Mazzei Mielli pelas valorosas sugestões e contínuo encorajamento;

Ao Prof. Dr. Sigfried Knasmüller e equipe pelas sugestões e colaborações na aplicação dos ensaios.

Aos colegas do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, da secretaria da pós-graduação e da graduação da Patologia, da Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental da CETESB pela amizade, colaboração e paciência;

Aos colegas Willi Spanier, Eneida Spanier, Jôse Mara de Brito, Marcus da Matta, Ms Paula Bertacini, à Dr^a. Carmem Saldiva André, Dr^a. Beatriz Manguiera Saraiva Romanholo, Marcelo Henrique Zevianni, Luiz Fidelis Filho, Cleide Macedo e ao casal Hélio e Cristiane pelo carinho e amizade porque sem vocês algumas das etapas desta pesquisa poderiam não ter existido.

“Não deixe que a saudade sufoque que a rotina acomode que o medo impeça de tentar, desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando.....”

(Luís Fernando Veríssimo)

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *Internacional Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e documentação. Guia de apresentação de dissertação, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Velhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Lodo de Esgoto e sua disposição final	2
1.2 Teste de genotoxicidade.....	5
1.2.1 Teste do Micronúcleo com <i>Tradescantia</i> (Trad-MN)	6
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3. MÉTODOS	13
3.1 Estudo comparativo com hastes florais de <i>Tradescantia pallida</i> e <i>Tradescantia</i> clone 4430.....	14
3.1.1 Exposição de hastes florais de <i>Tradescantia pallida</i> e de <i>Tradescantia</i> clone 4430 à solução de Trióxido de Arsênio (As ₂ O ₃).....	15
3.1.2 Exposição de hastes florais de <i>T. pallida</i> e do clone 4430 à solução de Hoagland e a água de torneira.....	17
3.1.3 Exposição de hastes florais de <i>Tradescantia pallida</i> aos diferentes controles positivos e negativos	17
3.1.3.1 Coleta e exposição das hastes florais de <i>Tradescantia pallida</i>	17
3.1.3.1.1 Exposição de hastes florais de <i>T. pallida</i> aos controles positivos	18
3.1.3.1.2 Exposição de hastes florais de <i>T. pallida</i> aos controles negativos.....	19
3.2 Estudo da genotoxicidade de lodo de esgoto com o teste Trad-MN.....	19
3.2.1 Amostras de lodo	20
3.2.2 Amostra de solo	22
3.2.3 Procedimento para coleta do lodo.....	22

3.2.4	Exposição Aguda e Exposição crônica.....	24
3.2.4.1	Exposição Aguda - Exposição de hastes florais de <i>Tradescantia pallida</i> aos extratos aquosos de lodos	24
3.2.4.1.1	Preparo dos extratos aquosos do lodo e do solo comercial.....	24
3.2.4.1.2	Coleta das hastes florais de <i>T. pallida</i> e exposição aos extratos de lodo (solubilizado).....	24
3.2.4.2	Exposição crônica - Exposição de plantas inteiras ao lodo <i>in natura</i>	25
3.3	Preparação e leitura das Lâminas.....	27
3.4	Análise estatística.....	29
4.	RESULTADOS.....	30
4.1	Avaliação comparativa entre <i>Tradescantia pallida</i> e Clone 4430 frente ao As ₂ O ₃ , à solução nutritiva de Hoagland e à água de torneira.....	31
4.1.1	Avaliação das respostas dos controles negativos com hastes florais de <i>Tradescantia pallida</i>	33
4.1.2	Avaliação das respostas dos controles positivos com hastes florais de <i>Tradescantia pallida</i>	34
4.2	Avaliação da genotoxicidade do lodo de esgoto com o teste Trad-MN	35
4.2.1	Avaliação das respostas dos extratos aquosos de lodo com hastes florais de <i>Tradescantia pallida</i>	35
4.2.1.1	Primeira campanha de coleta (2004/2005).....	35
4.2.1.2	Segunda campanha de coleta (2006).....	38
4.2.2	Avaliação das respostas do lodo adicionado ao substrato de cultivo de plantas do gênero <i>Tradescantia</i>	39
4.2.2.1	Avaliação da exposição crônica do lodo da ETE PCJ-2 com <i>Tradescantia</i>	39
4.2.2.2	Avaliação da exposição crônica dos lodos das ETES PCJ-1, AT-1 e AT-2 com <i>Tradescantia</i>	40
5.	DISCUSSÃO	42
6.	CONCLUSÃO	53
7.	ANEXOS	55
8.	REFERÊNCIAS	98

LISTA DE SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANOVA – Análise de Variância

As₂O₃ – Trióxido de Arsênio

Clone BNL 4430 – Clone Brookhaven National Laboratory 4430

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DAEE – Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

ETE AT-1 – Estação de Tratamento de Esgoto da bacia hidrográfica do Alto Tiete 1

ETE AT-2 – Estação de Tratamento de Esgoto da bacia hidrográfica do Alto Tiete 2

ETE PCJ -1 – Estação de Tratamento de Esgoto da bacia hidrográfica Piracicaba / Capivari / Jundiaí 1

ETE PCJ -2 – Estação de Tratamento de Esgoto da bacia hidrográfica Piracicaba / Capivari / Jundiaí 2

ETE SG – Estação de Tratamento de Esgoto da bacia hidrográfica Sapucaí / Grande

LPAE – Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

MN – Micronúcleo

SBMTCA – Sociedade Brasileira de Metagênese, Teratogênese e Carcinogênese Ambientais

Trad-MN – *Tradescantia* micronúcleo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A: <i>Tradescantia pallida</i> e B: clone 4430 (gênero <i>Tradescantia</i>).....	15
Figura 2. Exposição de hastes florais de clone 4430 ao As_2O_3	16
Figura 3. Exposição das hastes florais de <i>Tradescantia pallida</i> em condições de laboratório.	18
Figura 4. Preparo das floreiras com o lodo adicionado ao substrato de cultivo	26
Figura 5. Esquema da preparação de lâminas no teste Trad-MN a partir da escolha de um botão floral.	28
Figura 6. Contagem de Micronúcleos	28
Figura 7. Comparação da frequência de micronúcleos obtidas neste estudo com dados da literatura apresentados na tabela 17 do anexo 1.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais características sócio-econômicas das regiões onde estão inseridas as ETEs amostradas	21
Tabela 2 – Principais características dos processos de tratamento das ETEs amostradas	22
Tabela 3 – Datas das coletas e ETEs amostradas (primeira e segunda campanhas).....	23
Tabelas 4 - Médias e desvios padrão (Dp) da frequência de micronúcleos (%) para o clone 4430 e para a <i>Tradescantia pallida</i> após a exposição à solução de Hoagland e a água de torneira.....	31
Tabela 5 - Médias, desvios padrão (Dp) e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtidas nas diferentes concentrações de As ₂ O ₃ testadas, utilizando hastes florais de <i>T. pallida</i> e do Clone 4430	32
Tabelas 6 - Médias , desvios padrão (Dp) e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtidos para <i>Tradescantia pallida</i> expostas por 8 horas a diferentes tipos de água.....	33
Tabela 7 - Médias, desvios padrão e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtidos em tétrades jovens de <i>Tradescantia pallida</i> expostas durante oito horas a diferentes substâncias mutagênicas	34
Tabela 8 – Médias, desvios padrão (Dp) e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtidos para amostra de extrato aquoso de solo comercial com hastes florais de <i>T. pallida</i>	35
Tabela 9 - Média, desvio padrão (Dp) e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtida na amostra de extrato aquoso de lodo da ETE PCJ-2.....	36

Tabela 10 - Médias, desvios padrão (Dp) e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtidas para as amostras de extratos aquosos de lodo das ETEs AT-1 e SG	37
Tabela 11 - Média, desvio padrão (Dp) e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtida para a amostra de extrato aquoso de lodo da ETE PCJ-1 ..	37
Tabela 12 - Média, desvio padrão (Dp) e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtido para a amostra de extrato aquoso de lodo da ETE AT-2...	37
Tabela 13 - Médias, desvios padrão (Dp) e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtidos para as amostras de extratos aquosos de lodo coletadas na segunda campanha (2006)	38
Tabela 14 - Médias e desvios padrão (Dp) da frequência de micronúcleos (%) para a <i>T. pallida</i> e o clone 4430 após exposição de três meses no lodo da ETE PCJ-2 incorporados ao substrato	39
Tabela 15 - Médias e desvios padrão (Dp) da frequência de micronúcleos (%) dos lodos das ETEs PCJ-1, AT-1 e AT-2 e controles negativo e positivo obtidos em tétrades jovens de células germinativas de <i>T. pallida</i> e do clone 4430.....	41
Tabela 16 – Avaliação dos dados qualitativos da exposição crônica e aguda das amostras de lodo de esgoto da primeira e segunda para o teste de micronúcleo com <i>Tradescantia pallida</i>	51
Tabela 17. Médias e desvios padrão de estudos com <i>Tradescantia pallida</i> e clone 4430.....	56

Resumo

Mielli AC. *Avaliação da atividade genotóxica de lodo de esgoto tratado do Estado de São Paulo com o teste de micronúcleo em células germinativas de Tradescantia (Trad-MN)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 107p.

O lodo de esgoto gerado em estações de tratamento de esgoto pode conter substâncias tóxicas ainda não regulamentadas nas legislações nacionais e internacionais. Dentre elas as genotóxicas tem recebido especial atenção. Este trabalho teve como objetivos avaliar a genotoxicidade de amostras de lodo de esgoto tratado de diferentes Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) do Estado de São Paulo com o teste de micronúcleo em *Tradescantia* e ampliar os conhecimentos sobre o potencial de utilização da *Tradescantia pallida* em substituição ao clone 4430. Todas as ETEs estudadas apresentaram pelo menos uma amostra positiva para o teste de micronúcleo em *Tradescantia* sendo necessários mais estudos para elucidar quais os compostos são responsáveis pelo efeito observado. Os resultados sugerem que a *Tradescantia pallida* pode substituir o clone 4430 no teste de micronúcleo, porém esse ensaio tem aplicabilidade limitada em programas de monitoramento.

Descritores: 1.Lodo 2.Esgoto 3.*Tradescantia* 4.Teste de micronúcleos 5.Genotoxicidade

Summary

Mielli AC. *Assessment of the genotoxic activity of treated sludge from São Paulo sewage treatment plants with the micronuclei assay in germ cells of Tradescantia (Trad-MN)* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. 107p.

The sludge produced in sewage treatment plants can contain toxic substances which are not yet regulated by national and international legislation. Among these, the genotoxic substances are of great concern. The present paper aimed at evaluating the genotoxicity of treated sludge samples collected in different Sewage Treatment Plants (STP) located in the State of São Paul, Brazil. The micronucleus assay in *Tradescantia* was the test chosen for this evaluation. Another objective of the study was to verify if *Tradescantia pallida* could replace the clone 4430 in the Trad-MN assay. All the STPs studied have presented at least one positive sample for the micronucleus assay in the *Tradescantia*. Further studies are required in order to determine which compounds are responsible for the observed effect. The results obtained suggest that *T. pallida* can replace clone 4430 in the micronucleus assay, however, this assay presents limited applicability in monitoring programs.

Descriptors: 1.Sludge 2.Sewage 3.*Tradescantia* 4.Micronuclei assay 5.Genotoxicity

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lodo de Esgoto e sua disposição final

Com o crescimento e o desenvolvimento do saneamento básico no Brasil, a produção de lodo gerado nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) também cresceu, principalmente no Estado de São Paulo, onde se concentra a maior parte da população urbana do país. Embora o resíduo final represente de 1% a 2% do volume do esgoto tratado, o seu gerenciamento é bastante complexo e de alto custo, sendo mal executado, pode comprometer os benefícios ambientais e sanitários esperados destes sistemas (Andreoli et al., 2003).

Genericamente, o tratamento de esgoto consiste em um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos que resultam na remoção de sólidos sedimentáveis e da matéria orgânica das águas residuais (sanitárias e industriais). No final do processo de tratamento do esgoto temos: a água tratada para voltar aos mananciais e um resíduo sólido (o lodo) em quantidade e composição variável devido às características distintas do efluente e dos processos de tratamento adotado. Grande parte dos metais pesados e dos organismos patogênicos presentes no esgoto concentra-se no lodo (Fernandes et al., 2003).

Desde os anos 70 sabe-se que o tratamento de lodo municipal gera quantidades significativas de resíduos sólidos para a disposição final. O potencial de risco desses resíduos requer que suas características sejam cuidadosamente determinadas para desenvolver critérios de manejo ambientalmente corretos (Harrington Jr., 1978).

Esse resíduo vem sendo destinado em aterros sanitários. Mais recentemente algumas ETEs tem perspectiva de utilizá-lo como insumo agrícola (fertilizante e/ou condicionador de solo) de forma a contribuir para o desenvolvimento das regiões onde se localizam, não apenas na ótica da qualidade ambiental, mas na geração de riquezas (Vanzo et al., 2001). Entretanto, nem todo lodo pode ser utilizado para esse fim, sendo necessária uma rigorosa análise de seus componentes a fim de garantir a sua eficácia e sua salubridade, pois alguns componentes das águas residuais, ao passarem pelo sistema de tratamento, concentram-se em proporções variáveis no lodo. Vários componentes orgânicos e minerais conferem características fertilizantes ao lodo, da mesma forma outros componentes, podendo até conferir periculosidade ao resíduo (Silva et al., 2003).

O monitoramento da qualidade desse lodo torna-se ferramenta valiosa para determinar as condições de sua aplicabilidade em solo agrícola. A Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 375/2006), vigente para o Brasil, define procedimento, critérios e requisitos para a elaboração de projetos, implantação e geração de sistemas biológicos de despejos líquidos sanitários domésticos, em áreas agrícolas, visando o atendimento de exigências ambientais. Ela representa um avanço na determinação de critérios e procedimentos para o uso agrícola do lodo de esgoto, entretanto, há muito nesse campo para ser pesquisado, como pode ser observado no editorial da Nature (2008).

O subprojeto “Implantação e validação de métodos para avaliação toxicológica de lodos de esgoto doméstico” realizado dentro do projeto Avaliação e Aperfeiçoamento de Metodologias Analíticas da CETESB visavam verificar a aplicabilidade de testes de toxicidade e genotoxicidade para caracterização de lodos de ETE.

Esses testes de toxicidade e genotoxicidade poderiam reduzir as incertezas sobre a qualidade do lodo de esgoto podendo ser uma complementação para selecionar aqueles apropriados para aplicação em solo agrícola (Araújo e Monteiro 2005). Os ensaios de toxicidade ao contrário das análises químicas, permitem detectar os efeitos combinados dos vários compostos presentes em uma amostra, incluindo efeitos sinérgicos e antagônicos, levando a uma caracterização mais abrangente das amostras a serem analisadas (Helma et al., 1996).

Neste subprojeto foram realizados somente ensaios de toxicidade e genotoxicidade para definir o melhor método de exposição dos organismos ao lodo e verificar as respostas obtidas frente às amostras testadas. Através destes resultados esperavam-se definir protocolos a serem empregados no projeto de Caracterização de Lodos de ETE que inclui caracterização química e microbiológica além da toxicológica, coordenado pelo Setor de Resíduos Sólidos da CETESB, com financiamento do Fundo de Recursos Hídricos (FEHIDRO).

Desta forma, este estudo fez parte do subprojeto anteriormente citado e foi realizado em conjunto com a Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental da CETESB e com o Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da USP, onde foram realizados testes de genotoxicidade com plantas do gênero *Tradescantia* em algumas amostras de lodo de esgoto de ETEs do Estado de São Paulo.

1.2 Teste de genotoxicidade

Durante as últimas três décadas têm aumentado o interesse da comunidade científica e das agências reguladoras em relação à detecção, conhecimento e controle de agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e a sustentabilidade dos ecossistemas. A determinação e identificação de substâncias genotóxicas presentes no meio ambiente é um passo fundamental para o prognóstico dos efeitos complexos em humanos (Souza et al., 2007).

Dentre esses compostos, os mutagênicos são de grande preocupação, pois podem, além de induzir o câncer, provocar danos em células germinativas e somáticas levando ao desenvolvimento de outras doenças como: as hereditárias, as cardiovasculares, os distúrbios reprodutivos, além de acelerar o envelhecimento (Dearfield et al. 1998). A relação entre as propriedades genotóxicas e carcinogênicas de certas substâncias em induzir alterações no genoma dos seres vivos, mostra-nos cada vez mais a necessidade de monitorar e desenvolver medidas de proteção contra a exposição a essas substâncias potencialmente genotóxicos lançados no meio ambiente (Sadowaska et al., 1994).

Segundo Moraes e colaboradores (2000) os testes de genotoxicidade e toxicidade são indispensáveis para a avaliação de reações dos organismos vivos à poluição ambiental indicando os efeitos potenciais de vários contaminantes, sejam combinados ou não, enquanto análises químicas identificam a presença e as respectivas concentrações dos diferentes poluentes.

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. A escolha do organismo depende do objetivo do estudo, da disponibilidade de organismos e quando comparados com os seres humanos dos métodos validados.

As plantas, por exemplo, apesar das suas diferenças estruturais e metabólicas, podem oferecer informações sobre o potencial mutagênico de substâncias e oferece algumas vantagens como cultivo de baixo custo e fácil manutenção comparativamente a roedores, por exemplo. Os efeitos dos contaminantes sobre as plantas podem ocorrer em diversos níveis, sendo que muitas dessas reações podem ser utilizadas como critérios de avaliação da qualidade ambiental (Sant'Anna, 2003).

Certas plantas possuem ciclo de vida curto podendo indicar os efeitos de poluentes em curto período de exposição (de horas a poucos dias). Plantas, particularmente o *Allium cepa*, a *Tradescantia* e a *Vicia faba*, têm sido utilizados para avaliação da genotoxicidade de águas e amostras atmosféricas (White, Claxton, 2004). Contudo, segundo White e Claxton (2004), os testes com plantas apresentam também algumas desvantagens, especialmente a sua reduzida amplitude de respostas dificultando algumas vezes a diferenciação de amostras muito contaminadas.

1.2.1 Teste do Micronúcleo com *Tradescantia* (Trad-MN)

O emprego do teste de micronúcleos com *Tradescantia* (Trad-MN) para avaliação de agentes mutagênicos foi primeiramente proposto após estudos com o 1,2 dibromoetano, agente pró-mutagênico (Ma et al., 1978) e posteriormente com outros agentes químicos e amostras de locais poluídos (Ma, 1981; Ma, 1984). Uma grande vantagem percebida nesses estudos foi que não era necessária a adição de atividade enzimática exógena para ativar alguns agentes pró-mutagênicos, dado que

o aparato enzimático continuava funcional nas inflorescências extraídas das plantas expostas aos tratamentos.

O teste Trad-MN é um teste citogenético baseado na verificação de quebras cromossômicas expressas em micronúcleos, que são porções de cromatina que permanecem próximas ao núcleo celular, podendo ser originados de fragmentos cromossômicos acêntricos (efeito clastogênico) ou de cromossomos inteiros (efeito aneugênico). Os micronúcleos são gerados devido a erros na replicação do DNA no momento de sua duplicação na prófase I da meiose, a quebra é causada após exposição das inflorescências jovens aos agentes mutagênicos. A frequência de micronúcleo tem sido utilizada para avaliar o grau de dano genotóxico aos quais as células germinativas (células-mãe dos grãos-de-pólen) desta planta são expostas, indicando a atividade mutagênica da substância em exposição (Ma, 1981; Rodrigues et al., 1997).

Ma e colaboradores (1978) padronizaram o ensaio de mutagenicidade com micronúcleo em tétrades do clone BNL 4430, um híbrido estéril do gênero *Tradescantia* (*Tradescantia hirsutiflora* X *Tradescantia subcaulis*).

O teste do micronúcleo com o clone 4430 vem sendo utilizado mundialmente como um teste de genotoxicidade em diversos estudos para avaliar o potencial genotóxico de agentes químicos (Ma et al., 1992,1994; Helma et al., 1996, Steinkellner et al., 1998), extratos de resíduos sólidos (Cabrera e Rodriguez, 1999), amostras atmosféricas (Batalha et al., 1999, Guimarães et al., 2000; Klumpp et al., 2004; Machado, 2008), solos contaminados (Rodrigues et al., 1997; Knasmuller et al., 1998, Cotelle et al., 1999; Majer et al., 2002) e radiação (Suyama et al., 2002).

A mutagenicidade do lodo de esgoto da cidade de Chicago (EUA) foi avaliada utilizando dois ensaios de genotoxicidade com plantas (pólen ceroso de *Zea mays* e Trad-MN) e com o teste bacteriano denominado ensaio *Salmonella*/microsoma (teste de Ames). Os resultados demonstraram que somente o lodo a 100% ou diluições de 50% foi capaz de aumentar a frequência de MN na *Tradescantia* e, as que também induziram respostas mutagênicas nos outros ensaios realizados, concluem que o lodo de esgoto produzido pela estação de tratamento municipal de Chicago contém compostos capazes de induzir diferentes tipos de respostas mutagênicas em todas as espécies envolvidas (Hopke et al., 1982).

Grover e Satwinderjeet (1999) analisaram o efeito de amostras de lodo de esgoto sobre células meristemáticas de *Allium cepa* avaliando micronúcleos e outras alterações cromossômicas durante a anáfase, sugerindo que tais protocolos possam ser realizados de forma simples como indicador de citogenotoxicidade.

Diferentes estudos com solos contaminados têm utilizado para análise de genotoxicidade o teste de micronúcleo com *Tradescantia*, pois dos ensaios realizados com plantas este demonstrou ser o mais sensível (Ma et al., 1992; Steinkellner et al., 1998; Monarca et al., 1999; Grover, Satwinderjeet, 1999). Estudos realizados com extratos aquosos de amostras de solo oriundos de áreas contaminadas têm relacionado o efeito genotóxico à presença de alguns metais (Steinkellner et al., 1998, Chenon et al., 2003, Crebelli et al., 2005) e compostos orgânicos mutagênicos (Sandhu et al., 2001, Silva et al., 2003).

A genotoxicidade de lixiviados proveniente de aterros sanitários na cidade de Queretaro, no México, foi avaliada por três ensaios: micronúcleo com *Tradescantia* (Trad-MN), mutação em pêlo estaminal de *Tradescantia* (Trad-SHM) e aberrações

cromossômicas em *Allium cepa* (raiz de cebola). O ensaio Trad-MN foi o mais sensível entre eles e as amostras coletadas durante a seca apresentaram maior frequência de MN que aquelas coletadas durante a estação chuvosa. Este estudo concluiu que existe a presença de substâncias no lixiviado capazes de induzir genotoxicidade na planta e, também, possibilitou verificar o grau de sensibilidade entre os três bioensaios (Cabrera, Rodriguez 1998).

Cabrera, Rodriguez (1998), Steinkellner (1998), Majer (2002) e seus colaboradores, observaram que ensaios expondo plantas com raiz diretamente em solos contaminados são tão sensíveis na detecção de danos no DNA, provocados por metais, como os ensaios utilizando hastes florais das plantas expostas aos extratos aquosos.

Nos estudos apresentados acima a planta utilizada tem sido o clone 4430 (gênero *Tradescantia*) cujo teste já foi padronizado e validado (Ma et al., 1978; Ma 1984), entretanto, o uso do clone apresenta algumas dificuldades quanto ao seu crescimento e florescimento em países tropicais devido sua maior sensibilidade ao clima (altas temperaturas, umidade do ar elevada e chuvas) e aos insetos e parasitas, quando deixadas por períodos prolongados em ambiente aberto, limitando seu uso em biomonitoramento a médio e/ou em longo prazo (Suyama et al., 2002; Sant'Anna, 2003). O clone 4430 poderia ser cultivado por hidropônia, porém o seu custo seria mais elevado (Shima et al., 1997).

No Brasil, alguns grupos têm utilizado a espécie *Tradescantia pallida* c.v. purpúrea no monitoramento dos efeitos adversos causados pela poluição atmosférica. Esta planta, originária do México e de Honduras, é utilizada como planta ornamental em jardins e rodovias, tendo fácil propagação e exibindo uma resistência natural as

intempéries da natureza (Sumita, 2003; Sant'Anna, 2003). A *T. pallida* foi utilizada para detectar efeitos genotóxicos causados pela poluição atmosférica *in situ* (Batalha et al., 1999, Guimarães et al., 2000, Carreras et al., 2006), como também em testes em laboratório (Carvalho-Oliveira et al., 2005). Suyama e colaboradores (2002) demonstraram que a *T. pallida* e o clone 4430 apresentam sensibilidade genotóxicas semelhante aos efeitos causados por raios-X. Sumita (2003) pesquisou o acúmulo de alguns metais nas folhas de *T. pallida* obtendo resultados semelhantes àqueles observados por Alves e colaboradores (2001) com o clone 4430.

Entretanto, cabe ressaltar, que ainda são necessários estudos comparativos mais detalhados para poder utilizar espécie *T. pallida* em substituição ao clone 4430 já padronizado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a atividade genotóxica de amostras de lodos de esgoto tratado de diferentes Estações de Tratamento de Esgoto do Estado de São Paulo com o teste de micronúcleos em células germinativas de *Tradescantia* (Trad-MN).

2.2 Objetivos Específicos

- Ampliar os conhecimentos sobre o potencial de utilização da *Tradescantia pallida* para avaliação de mutágenos ambientais, realizando por meio do teste de micronúcleo, testes comparativos entre a *Tradescantia pallida* e o clone 4430 para verificar a potencialidade da *T. pallida* em substituir o clone 4430;
- Avaliar a genotoxicidade de extratos aquosos de amostras de lodo de esgoto tratado de diferentes Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) do Estado de São Paulo com o teste Trad-MN, utilizando hastes florais de *Tradescantia pallida*;
- Avaliar a genotoxicidade de amostras de lodo de esgoto tratado de diferentes Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) do Estado de São Paulo com o teste Trad-MN, com *Tradescantia pallida* e clone 4430 expostas ao lodo incorporado ao substrato de cultivo.

3. MÉTODOS

3.1 Estudo comparativo com hastes florais de *Tradescantia pallida* e *Tradescantia* clone 4430

O objetivo desta primeira parte do estudo foi realizar testes em paralelo com a *T. pallida* e o clone 4430 comparando as respostas obtidas e assim verificar a potencialidade da *T. pallida* em substituir o clone. Para essa avaliação foram realizados dois experimentos:

- a) utilizando a solução de trióxido de arsênio (As_2O_3), substância reconhecida como genotóxica e utilizada por alguns autores como controle positivo (Ma et al., 1992; Gill, Sandhu, 1992; Knasmuller et al., 1999);
- b) utilizando a solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) e água de torneira, soluções usualmente empregadas como controles negativos e que devido à ausência de análise da eficiência destas como melhores controles negativo, serão realizados testes comparativos.

Adicionalmente, foram avaliadas diferentes substâncias e condições, utilizando apenas hastes florais de *Tradescantia pallida*, para ampliar o conhecimento sobre o teste com essa planta.

3.1.1 Exposição de hastes florais de *Tradescantia pallida* e de *Tradescantia* clone 4430 à solução de Trióxido de Arsênio (As_2O_3)

Neste ensaio, inflorescências com botões jovens (sem flor aberta) das plantas *Tradescantia pallida* e o clone 4430 (Figura 1), foram coletados de floreiras cultivadas no jardim de área rural, distante de rodovias e indústrias, na Cidade de Caucaia do Alto situada a 50 Km do centro da cidade de São Paulo.

Figura 1. A: *Tradescantia pallida* e B: clone 4430 (gênero *Tradescantia*).

Foram preparadas três soluções diferentes de trióxido de arsênio (As_2O_3 - Sigma) nas concentrações 1,0 mM; 2,5 mM e 5,0 mM de acordo com Knasmüller e colaboradores (2003). O teste foi realizado com inflorescências jovens do clone 4430 e da *T. pallida* e o protocolo executado nesse experimento foi estabelecido por Ma e colaboradores (1981) para o clone 4430.

As hastes florais (5-10 hastes) foram colocadas em béqueres com solução nutritiva de Hoagland (diluída 1:3) por 24 horas para adaptação antes da exposição ao As_2O_3 (Figura 2). A *Tradescantia pallida* e o clone 4430 foram separados em grupos e expostas por 6 horas as diferentes concentrações de As_2O_3 e como controle negativo foi utilizado a solução nutritiva de Hoagland diluída 1:3; após exposição, as hastes florais foram colocadas em uma nova solução nutritiva por um período de recuperação de 24 horas. Essa recuperação é necessária para que as células mães dos grãos de pólen atinjam a fase de tétrade (meiose) momento em que os micronúcleos passam ser visualizados caso ocorram. Em seguida, as inflorescências foram fixadas por 24 horas em solução de ácido acético e etanol (1:3) e conservadas em álcool 70% para posterior preparação e análise das lâminas.

Figura 2. A: Cortes de hastes florais para exposição apresentando inflorescências jovens do clone 4430; B: modelo experimental com hastes florais de clone 4430. (FONTE: CD-ROM Workshop on plant bioassays promovido pela SBMCTA)

3.1.2 Exposição de hastes florais de *T. pallida* e do clone 4430 à solução de Hoagland e a água de torneira

A coleta da água de torneira foi obtida do laboratório de poluição atmosférica experimental (LPAE) da Faculdade de Medicina da USP, e a solução de Hoagland foi preparada, no laboratório (LPAE), a partir de macro e micro nutrientes seguindo o protocolo de Hoagland e Arnon (1950). As duas soluções foram acondicionadas em frascos de polietileno e mantidas a temperatura ambiente até o momento do ensaio. A coleta das plantas, local de exposição, tempo de exposição foram os mesmos realizados para o ensaio com o trióxido de arsênio (item 3.1.1).

3.1.3 Exposição de hastes florais de *Tradescantia pallida* aos diferentes controles positivos e negativos

3.1.3.1 Coleta e exposição das hastes florais de *Tradescantia pallida*

Hastes florais de *Tradescantia pallida* no jardim da Cia. De Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB, próxima a rodovias de tráfego intenso, localizada no bairro de Pinheiros da cidade de São Paulo.

As hastes florais (10-20 hastes por grupo experimental) foram levadas ao laboratório da Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambientais da CETESB e foram colocadas em béqueres com solução nutritiva de Hoagland diluída 1:3 por 24 horas para adaptação. Este ensaio foi utilizado tal como discutido no item 3.1.1, porém com uma alteração recomendada pelo grupo do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE), onde são colocadas mangueiras com ar

comprimido ou bombinhas de ar para aquário para aerar as soluções durante o ensaio com as hastes florais da planta (Figura 3).

Figura 3. Exposição das hastes florais de *Tradescantia pallida* em condições de laboratório (Foto cedida gentilmente pela Ms. Débora-Jã) Lobo) – LPAE).

3.1.3.1.1 Exposição de hastes florais de *T. pallida* aos controles positivos

Para este ensaio foram utilizadas substâncias reconhecidas como genotóxicas: o formaldeído (Merck) preparado nas concentrações de 0,1 e 0,2%, o Etil metano sulfonato (EMS - Sigma) nas concentrações de 0,8 mM e 8,0 mM e Trióxido de Arsênio (As_2O_3 - Sigma) a 5,0 mM.

Após o período de adaptação, as hastes florais de *Tradescantia pallida* foram separadas por grupo e expostas por 8 horas às diferentes soluções (Santos, 2004). Após essa exposição, as hastes florais foram colocadas em nova solução nutritiva por

um período de recuperação de 24 horas. Em seguida, as inflorescências foram fixadas por 24 horas em solução de ácido acético e etanol (1:3) e conservadas em álcool 70% para posterior preparação e análise das lâminas.

3.1.3.1.2 Exposição de hastes florais de *T. pallida* aos controles negativos

Como controles negativos foram utilizados: água de torneira, água destilada, água ultra pura (ou Mili-Q), água mineral e solução nutritiva de Hoagland (diluída 1:3). Após período de adaptação de 24 h em solução de Hoagland (diluída 1:3) as hastes florais de *T. pallida* foram expostas por 8 horas aos controles negativos a serem testados. Em seguida, as inflorescências foram fixadas por 24 horas em solução ácido acético e etanol (1:3) e conservadas em álcool 70% para posterior preparação e análise das lâminas.

3.2 Estudo da genotoxicidade de lodo de esgoto com o teste Trad-MN

Neste estudo, dois tipos de exposição foram realizados para avaliar o potencial genotóxico do lodo. O primeiro, expôs hastes florais de *Tradescantia pallida* às amostras de extrato aquoso do lodo, e, um segundo ensaio expôs mudas de *T. pallida* e do clone 4430 a mistura de lodo adicionado ao substrato de cultivo, também foi analisada uma amostra de solo comercial.

3.2.1 Amostras de lodo

Em cada ETE foram coletados 8 kg de amostra de lodo composto por 5 sub-amostras, essas coletas foram realizadas de forma a representar o lodo gerado pelas ETEs. As amostras de cada uma das 5 Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) selecionadas possuem características representativas dos diferentes processos de tratamento utilizados no Estado de São Paulo e estão localizadas em 3 bacias hidrográficas do Estado de São Paulo, o que também contribui para diferenças entre os lodos gerado por cada ETE.

De acordo com o Departamento de Águas e Energia Elétrica – DAEE do Estado de São Paulo (2004), a bacia hidrográfica do Piracicaba, Capivari e Jundiaí (PCJ) têm uma população de 4,9 milhões de pessoas na qual as principais fontes de trabalhos e riqueza nessa região são: a produção agrícola (cana-de-açúcar e laranja), as indústrias de papel e celulose e as usinas de açúcar e álcool; a bacia hidrográfica do Alto Tiete (AT) tem uma população de 19,2 milhões de habitantes que vivem das produções hortifruti diversificados e indústrias (eletrônica, química, mecânica e têxtil); e a estação localizada na bacia de Sapucaia Grande (SG) cujas atividades principais são a produção agrícola (soja, cana-de-açúcar, milho e café) e de indústrias (siderúrgica e petroquímica), nesta estação o esgoto doméstico é coletado e tratado separadamente do esgoto industrial sendo este utilizado para fins agrícolas (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais características sócio-econômicas das regiões onde estão inseridas as ETEs amostradas

UGRHI	População em 2007		Principais atividades industriais
	urbana	Rural	
Piracicaba/ Capivari/ Jundiaí (PCJ)	4.702.830	209.426	Papel e celulose, usinas de açúcar e álcool, têxtil, Produção de laranjas
Alto Tietê (AT)	18.679.061	542.413	Eletroeletrônicos, química, metalurgia, mecânica, agroindústria, têxtil, frutas e vegetais
Sapucaí/Grande (SG)	652.688	32.752	Vegetais, Siderurgia e petroquímica

FONTE: DAEE – Depto. de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo. Plano de Recursos Hídricos 2004-2007. Resumo III. São Paulo DAEE 2006. UGRHI – Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

A ETE denominada PCJ-1 trata efluentes urbanos e resíduos de indústrias têxteis; a ETE denominada PCJ-2 recebe efluentes urbanos e de indústrias (alimentos, bebidas e madeira); a estação denominada AT-1 recebe principalmente esgotos urbanos da região metropolitana de São Paulo; a estação denominada AT-2 trata efluentes urbanos e recebe grande quantidade de efluentes de indústrias químicas, sendo a que tem maior contribuição de efluentes industriais das 5 estações e a ETE denominada SG que trata esgoto predominante doméstico. A tabela 2 apresenta resumidamente o tipo de tratamento e a quantidade de efluente tratado em cada estação como também o total de lodo gerado por cada uma delas.

Tabela 2 – Principais características dos processos de tratamento das ETEs amostradas

ETE ^a	Processo de tratamento		Q ^b Atual (L/s)	Lodo gerado (ton/dia)	Adiciona ao processo		
	Fase líquida	Fase sólida			CaCO ₃	FeCl ₃	Polímero
PCJ-2	Lagoas Aeradas de Mistura Completa seguidas de Lagoas de Sedimentação.	Centrífuga e secagem (90dias)	900	28	-	-	sim
AT-1	Lodo ativado convencional	Digestor, filtro prensa	7000	300	-	sim	sim
SG	Lodo ativado convencional	Digestor, Filtro esteira	480	100	-	sim	sim
PCJ-1	Filtro biológico	Digestor, centrífuga secagem	110	7	-	-	sim
AT-2	Lodo ativado convencional	Digestor, filtro prensa	750	37	sim	sim	-

^a As ETEs estão representadas por letras que referem-se as bacias hidrográficas onde a mesma está localizada

^b Q = vazão de afluente

FONTE: Pesquisa de campo realizada pela equipe do Setor EAMM da CETESB em janeiro de 2007

3.2.2 Amostra de solo

Para efeito comparativo foi analisada uma amostra de solo comercial utilizada normalmente para cultivo de plantas (marca PlantMax).

3.2.3 Procedimento para coleta do lodo

Os lodos finais (após a digestão e/ou secagem) foram coletados com auxílio de uma pá limpa e acondicionados em sacos plásticos atóxicos. O transporte foi realizado sob temperatura ambiente e o armazenamento em câmara fria. As amostras de lodo foram processadas de acordo com a necessidade de cada ensaio (“*in natura*” ou extrato aquoso), não excedendo o período de 14 dias de armazenamento. A coleta

das amostras de lodo foram realizadas nas mesmas ETEs em duas campanhas 2004/2005 e 2006 e nomeadas conforme a origem da bacia hidrográfica na qual as ETEs estão inseridas (Tabela 3).

Tabela 3 – Datas das coletas e ETEs amostradas (primeira e segunda campanhas).

ETE/local	Campanha	mês/ano
AT-1	I	nov/04
	II	mar/06
AT-2	I	mar/05
	II	mar/06
PCJ-1	I	fev/05
	II	mar/06
PCJ-2	I	ago/04
	II	mar/06
	III ^a	jan/06
SG	I	nov/04
	II	mar/06

a - amostra extra realizada somente para exposição crônica

3.2.4 Exposição Aguda e Exposição crônica

3.2.4.1 Exposição Aguda - Exposição de hastes florais de *Tradescantia pallida* aos extratos aquosos de lodos

3.2.4.1.1 Preparo dos extratos aquosos do lodo e do solo comercial

O preparo dos extratos aquosos dos lodos e do solo foi realizado de acordo com procedimento proposto por Matthews e Hastings (1987). Foram pesadas 100 g de lodo “*in natura*” ou solo e adicionado 400 mL de água ultrapura (Mili-Q) em recipiente de polietileno, cada amostra processada foi colocado em agitador mecânico (por tombamento) a 45 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada por 30 minutos a 3500 rpm e armazenada em geladeira (no máximo por sete dias) para posterior análise.

3.2.4.1.2 Coleta das hastes florais de *T. pallida* e exposição aos extratos de lodo (solubilizado)

Hastes florais de *Tradescantia pallida* foram coletadas no jardim da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB, próxima à rodovia de tráfego intenso, no bairro de Pinheiros em São Paulo. Após a coleta as hastes florais (10-20 foram levadas ao laboratório, onde foram acondicionadas em béqueres com solução nutritiva de Hoagland (diluída 1:3) e mantidas por 24 horas para adaptação. As hastes florais foram então expostas aos extratos aquosos de lodo a serem testados em dose única (100% do solubilizado) por um período de exposição de 8 horas. Após um período de recuperação de 24 h em uma nova solução de Hoagland (1:3), as inflorescências foram então fixadas em solução de ácido acético e etanol (1:3) por 24 horas (Figura 3).

3.2.4.2 Exposição crônica - Exposição de plantas inteiras ao lodo *in natura*

Para este ensaio, plantas com raiz (mudas de 15 a 20 cm de comprimento) foram expostas a diferentes concentrações da mistura de substrato (solo comercial) e lodo em floreiras separadas, essas mudas foram obtidas de floreiras cultivadas na cidade de Caucaia (3.1.1.1). Utiliza-se como substrato de cultivo para essas plantas uma mistura de: 2 partes de terra compostado plantmax (marca Eucatex), 1 parte de terra vegetal especial para hortaliças (marca Agradog), 1 parte de vermiculita expandida (marca Terra Mater) e $\frac{1}{4}$ da parte húmus de minhoca (MaxTerra). Aproximadamente 4 kg desta mistura foram adicionados às floreiras de cultivo (43x20x20 cm) identificadas com etiquetas por concentração de lodo (10%, 25% e 50%), nome da ETE amostrada e data de início da exposição (Figura 4). Antes das mudas do clone e da *T. pallida* serem transferidas para as floreiras, foi retirada de cada uma a porção de substrato de cultivo que seria substituída por lodo “*in natura*” (resultando nas concentrações de lodo desejadas de 10%, 25% e 50%). As floreiras foram mantidas em estruturas de madeira em área aberta (jardim) na cidade de Caucaia, nesta cidade a poluição atmosférica é considerada baixa e o local escolhido está distante de rodovias (3.1.1.1).

As floreiras foram mantidas no jardim até o início das primeiras inflorescências quando foi realizada a coleta, resultando em, aproximadamente, três meses de exposição. Essas exposições foram realizadas em dois períodos: o primeiro em fevereiro de 2006 com amostras de lodo da ETE PCJ-2 e o segundo realizado em junho de 2006 com as amostras das ETES PCJ-1, AT-1, AT-2, não foi possível para esses experimentos realizar coletas na ETE SG.

Como controle negativo foi usado o próprio substrato de cultivo sem adição do lodo e como controle positivo foi preparada uma solução aquosa com compostos mutagênicos conhecidos (0,1mg de acenafteno, 0,1 mg de antraceno, 1 mg de 4-óxido nitroquilina, 1 mg de amino antraceno, 1 mg de fenantraceno e 1 mg de fluoranteno dissolvidos em 5 ml de metanol e diluídos em 8 L de água Mili- Q) que foi acrescentada a 16 kg de substrato.

Após o período de exposição, foi colhido de 5-10 hastes florais com inflorescências jovens em botão, por grupo experimental, este tempo foi escolhido em função do aparecimento de inflorescências jovens necessárias para o ensaio. As inflorescências foram então fixadas em solução de ácido acético e etanol por 24 horas e conservadas em álcool 70% para posterior análise.

Figura 4. A: Materiais utilizados para preparação das floreiras; B: Mistura de lodo e substrato de cultivo; C: Floreiras com mudas de *T. pallida* identificadas por ETE e concentração de lodo; D: Exposição das plantas em área aberta na cidade de Caucaia.

3.3 Preparação e leitura das Lâminas

Após a fixação das inflorescências por um período mínimo de 24 horas em ácido acético e etanol (1:3) ou após a conservação em álcool 70°, as lâminas foram analisadas quanto à presença de micronúcleos. As inflorescências com botões jovens no estágio de tétrades foram dessecadas e as anteras maceradas sobre lâmina de vidro, juntamente com uma gota de carnoy (Batalha et al., 1999) conforme o esquema representado na figura 5. Apenas as preparações contendo tétrades jovens foram consideradas. Foram quantificados os micronúcleos de 300 tétrades por lâmina em microscopia óptica com aumento de 400x. Para cada grupo foram avaliadas no mínimo 1500 tétrades sendo 5-10 lâminas por grupo (Rodrigues et al., 1998) (Figura 6). A contagem de micronúcleos foi realizada em lâminas codificadas antes de seu preparo as quais foram decodificadas somente após a finalização das leituras de todas as amostras. Os resultados foram expressos em porcentagem (frequência de micronúcleos).

Figura 5. Esquema da preparação de lâminas no teste Trad-MN a partir da escolha de um botão floral. (FONTE: “Bioassays in Plant Cells – for improvement of ecosystem and human health” Jolanta Maluszynska e Michael Plewa. 2003.p.101)

Figura 6. A: Visualização de micrônúcleos em microscópio óptico (Olympus-CH-2) com magnificação de 100x; B: detalhe de uma tetrade com magnificação de 400x – micrônúcleo indicado pela seta (Foto cedida gentilmente pela Dr^a. Eliane Tigre – LPAE)

3.4 Análise estatística

Para verificar a presença de diferenças significativas entre os dados obtidos nos diferentes ensaios, foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida pelos post-hoc de Tukey e Bonferroni quando necessário. As análises estatísticas foram apresentadas em tabelas descritivas para cada ensaio e por campanha de coleta. O programa estatístico utilizado foi o SPSS vs 10,0 e as amostras foram consideradas significativas quando apresentaram diferenças em relação ao controle negativo com significância mínima de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação comparativa entre *Tradescantia pallida* e Clone 4430 frente ao As_2O_3 , à solução nutritiva de Hoagland e à água de torneira

Inicialmente foram realizados estudos comparativos com os controles negativos água de torneira e solução nutritiva de Hoagland, utilizando hastes florais de *T. pallida* e do clone 4430. A análise de variância obtida com as médias da frequência de micronúcleo da solução de Hoagland e da água de torneira pelo método de Tukey, não apresentou diferença estatística entre elas ($p = 0,842$), independente da planta que foi usada ($p = 0,951$). As médias da frequência de micronúcleo na *T. pallida* obtidas para ambas as condições de teste foram maiores que as obtidas no clone 4430, porém não foram estatisticamente diferentes ($p = 0,064$).

Tabelas 4 - Médias e desvios padrão (Dp) da frequência de micronúcleos (%) para o clone 4430 e para a *Tradescantia pallida* após a exposição à solução de Hoagland e a água de torneira

Solução	Clone 4430 ^a		<i>T. pallida</i> ^a	
	No de tétrades analisadas	Média $\pm$ DP (%)	No. de tétrades analisadas	Média $\pm$ DP (%)
Água de torneira	2100	5,0 $\pm$ 1,6 ^b	4200	6,0 $\pm$ 1,9 ^c
Solução de Hoagland	3300	5,0 $\pm$ 1,2 ^b	3300	6,1 $\pm$ 2,1 ^c

^a não significativo entre as plantas; ^b não significativo entre as soluções utilizando o clone 4430; ^c não significativo entre as soluções utilizando a *T. pallida*

A análise de variância para o ensaio com o As_2O_3 indicou que a frequência média de micronúcleo por concentração nas duas plantas são diferentes ($p=0,013$), pelo método de Tukey, esse resultado foi observado também para todas as doses testadas ($p=0,011$ para a dose de 1 mM e $p<0,001$ para as doses de 2,5 e 5 mM. No entanto, não houve diferença entre a resposta das duas plantas frente ao As_2O_3 ($p=0,276$), indicando um comportamento semelhante das duas espécies frente às doses crescentes de As_2O_3 utilizadas no ensaio.

Tabela 5 - Médias, desvios padrão (Dp) e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtidas nas diferentes concentrações de As_2O_3 testadas, utilizando hastes florais de *T. pallida* e do Clone 4430

Solução	Clone 4430		<i>T. pallida</i>	
	No. de tétrades analisadas	Média $\pm$ DP (%)	No. de tétrades analisadas	Média $\pm$ DP (%)
Hoagland (controle negativo)	1500	$3,3 \pm 1,09$	1500	$3,6 \pm 0,48$
As_2O_3 1 mM	1500	$4,2 \pm 1,28^*$	1500	$6,6 \pm 1,16^*$
As_2O_3 2,5 mM	1500	$5,9 \pm 0,94^*$	1500	$6,2 \pm 1,62^*$
As_2O_3 5 mM	1500	$6,9 \pm 1,07^*$	1500	$8,0 \pm 1,92^*$

* $p < 0,05$

4.1.1 Avaliação das respostas dos controles negativos com hastes florais de *Tradescantia pallida*

O teste estatístico ANOVA realizada com as médias das frequências de micronúcleos das soluções testadas como controles negativos (água ultrapura, água de torneira, água mineral, água destilada e solução nutritiva de Hoagland) indicou que essas soluções apresentam respostas diferentes ($p=0,003$). Utilizando-se a solução de Hoagland como grupo controle (teste de Tukey), observa-se que somente a água destilada apresentou valores significativamente mais elevados (Tabela 6).

Tabelas 6 - Médias, desvios padrão (Dp) e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtidos para *Tradescantia pallida* expostas por 8 horas a diferentes tipos de água

Solução	<i>T. pallida</i>	
	No. de tétrades analisadas	Média $\pm$ DP (%)
Hoagland (grupo controle)	3000	4,76 $\pm$ 1.29
Ultra pura	2400	5,59 $\pm$ 1,97 n.s
Destilada	1800	8,11 $\pm$ 2,57*
Mineral	2400	6.33 $\pm$ 2.09 n.s
torneira	2700	4,67 $\pm$ 0,98 n s

ns: não significativo; *: $p < 0,05$

4.1.2 Avaliação das respostas dos controles positivos com hastes florais de *Tradescantia pallida*

A análise de variância realizada com os dados obtidos para as substâncias mutagênicas utilizadas como controles positivos detectou diferença estatística entre eles ($p=0,008$).

Tabela 7 - Médias, desvios padrão e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtidos em tétrades jovens de *Tradescantia pallida* expostas durante oito horas a diferentes substâncias mutagênicas

Substância	<i>T. pallida</i>	
	No. de tétrades analisadas	Média $\pm$ DP (%)
Água ultra pura (controle negativo)	1500	2,74 $\pm$ 1,48
Formaldeído 0,1 %	1500	6,94 $\pm$ 2,65 ns
Formaldeído 0,2 %	2400	10,34 $\pm$ 5,40*
E M S 0,8 mM	2400	5,96 $\pm$ 2,03 ns
E M S 8,0 mM	1200	11,25 $\pm$ 5,85*
As ₂ O ₃ 5.0 mM	1500	7,87 $\pm$ 1,52 ns

ns: não significativo; * $p < 0,01$

Observa-se que nestes experimentos apenas os resultados obtidos para o formaldeído 0,2% e o E M S 8,0 mM foram capazes de induzir aumento significativo na frequência de micronúcleos quando comparadas ao controle negativo, porém o desvio padrão foi muito elevado o que deve ter influenciado no resultado estatístico obtido. As demais substâncias não foram significativas (Tabela 7).

4.2 Avaliação da genotoxicidade do lodo de esgoto com o teste Trad-MN

4.2.1 Avaliação das respostas dos extratos aquosos de lodo com hastes florais de *Tradescantia pallida*

4.2.1.1 Primeira campanha de coleta (2004/2005)

Neste estudo, primeiramente foi preparada uma amostra de extrato aquoso de solo comercial com o intuito de avaliar o seu potencial genotóxico para fins comparativos com respostas a serem obtidos com o lodo de esgoto. A análise de variância da frequência de micronúcleos com o teste de Tukey indicou que a resposta da amostra do extrato do solo comercial não foi significativa quando comparada ao grupo controle água de torneira ($p = 0,597$) e a solução de formaldeído 0,1% também não forneceu resultados positivos como esperado (Tabela 8).

Tabela 8 – Médias, desvios padrão (Dp) e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtidos para amostra de extrato aquoso de solo comercial com hastes florais de *T. pallida*

Amostra	Número de tétrades	Média $\pm$ Dp (%)	pH do extrato aquoso
Torneira (controle negativo)	2400	4,00 $\pm$ 2,70	Não se aplica
Solo comercial	3000	4,47 $\pm$ 2,84 n s	5,3
Formaldeído 0,1% (controle positivo)	1500	5,67 $\pm$ 3,35 n s	Não se aplica

ns: não significativo

Os dados obtidos para os extratos aquosos de lodo da **primeira campanha** e solo, foram tratados cada qual com seu grupo controle negativo e positivo, pois as mesmas não foram coletadas nas mesmas datas (Tabela 3). As amostras foram testadas conforme os extratos aquosos eram preparados obedecendo ao prazo de conservação das amostras de lodo coletadas, desta forma para a primeira campanha foram realizados 4 experimentos independentes.

Pelo método de Tukey, as médias da frequência de micronúcleos das amostras de lodo das estações de tratamento PCJ-1, PCJ-2, SG foram significativamente maiores quando comparadas o respectivo controle negativo, já as amostras dos lodos de AT-1 (0,080) e AT-2 ($p = 0,914$) não apresentaram diferenças significativas. As tabelas 9, 10, 11 e 12 apresentam os resultados obtidos nessas amostras. Observa-se que das 3 vezes que a solução de formaldeído 0,1% foi utilizado como controle positivo, somente uma vez a resposta foi positiva (Tabelas 9, 11 e 12).

Tabela 9 - Média, desvio padrão (Dp) e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtida na amostra de extrato aquoso de lodo da ETE PCJ-2

Amostra	Nº de tétrades analisadas	Media $\pm$ Dp	pH do extrato aquoso
Água de Torneira (controle negativo)	3000	2,26 $\pm$ 1,71	Não se aplica
PCJ-2	3000	6,00 $\pm$ 2,05**	5,4
Formaldeído 0,1% (controle positivo)	3000	4,00 $\pm$ 1,02**	Não se aplica

** $p < 0,01$

Tabela 10 - Médias, desvios padrão (Dp) e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtidas para as amostras de extratos aquosos de lodo das ETEs AT-1 e SG

Amostra	Nº de tétrades Analisadas	Média ± Dp (%)	pH do extrato aquoso
Sol. Hoagland (controle negativo)	3000	3,07 ± 1,99	6,0
AT-1	3000	5,77 ± 2,20ns	7,7
SG	3000	6,90 ± 3,57**	8,4

ns: não significativo; ** $p < 0,01$

Tabela 11 - Média, desvio padrão (Dp) e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtida para a amostra de extrato aquoso de lodo da ETE PCJ-1

Amostra	Número de tétrades	Média ± Dp (%)	pH do extrato aquoso
Água ultrapura (controle negativo)	1500	2,74 ± 1,48	Não se aplica
PCJ-1	2100	13,86 ± 4,62**	7,4
Formaldeído 0,1% (positivo)	1200	3,60 ± 7,50**	Não se aplica

** $p < 0,01$

Tabela 12 - Média, desvio padrão (Dp) e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtido para a amostra de extrato aquoso de lodo da ETE AT-2

Amostra	Número de tétrades	Media ± Dp (%)	pH do extrato aquoso
Água ultrapura (controle negativo)	1800	5,17±1,66	Não se aplica
AT-2	3000	4,90±1,04 n s	9,7
Formaldeído 0,1% (positivo)	2400	5,29±1,20 n s	Não se aplica

ns: não significativo

Para a primeira campanha as amostras de lodo de esgoto provenientes das ETEs PCJ-1, PCJ-2 e SG apresentaram resultados positivos.

4.2.1.2 Segunda campanha de coleta (2006)

A análise de variância realizada com os resultados obtidos para os extratos aquosos da **segunda campanha** apontou que não houve diferença entre as amostras quando comparadas ao controle negativo (análise múltipla de Tukey) (Tabela 13).

Tabela 13 - Médias, desvios padrão (Dp) e análise estatística da frequência de micronúcleos (%) obtidos para as amostras de extratos aquosos de lodo coletadas na segunda campanha (2006)

Amostras	Nº de tétrades analisadas	Media $\pm$ Dp (%)	pH do extrato aquoso
Sol. Hoagland (controle negativo)	1500	5,54 $\pm$ 1,74	7,0
PCJ-1	1500	6,99 $\pm$ 3,0 n s	7,6
PCJ-2	1800	7,61 $\pm$ 2,56 n s	4,7
SG	1500	3,94 $\pm$ 1,14 n s	8,2
AT-1	1800	6,73 $\pm$ 2,22 n s	7,4
AT-2	1800	5,67 $\pm$ 2,45 n s	12,6
As ₂ O ₃ 5 mM (controle positivo)	1500	8,00 $\pm$ 1,93 n s	Não se aplica

ns: não significativo

Os resultados indicaram que para a segunda campanha todas as amostras de lodo testadas apresentaram resultados negativos para o teste. O controle positivo foi substituído pelo As₂O₃ na concentração de 5 mM e o resultado também foi negativo ($p = 0,054$), porém muito próximo de 5%. Nota-se que o As₂O₃ obteve um desvio padrão bem menor que aquele obtido para o formaldeído 0,2% , e, com média na frequência de micronúcleo maior que a obtida para o formaldeído 0,1%.

4.2.2 Avaliação das respostas do lodo adicionado ao substrato de cultivo de plantas do gênero *Tradescantia*

4.2.2.1 Avaliação da exposição crônica do lodo da ETE PCJ-2 com *Tradescantia*

Neste primeiro experimento, os resultados da exposição de *T. pallida* e do clone 4430 ao lodo da estação PCJ-2 adicionado ao substrato de cultivo não apresentaram amostras significativas (Tabela 14). A análise de variância não indicou aumento significativo nas médias das frequências de micronúcleos para o clone 4430 quando comparado com o controle negativo e o mesmo ocorreu com os resultados das frequências de micronúcleos obtidos para a *T. pallida*. Pelo método de Tukey não houve diferença significativa entre as amostras testadas das duas espécies ($p=0,566$), sendo válida esta comparação para todas as concentrações ($p=0,551$). Neste experimento não foi possível obter dados para o controle positivo para ambas as plantas, pois não houve desenvolvimento das mesmas nas condições do ensaio.

Tabela 14 - Médias e desvios padrão (Dp) da frequência de micronúcleos (%) para a *T. pallida* e o clone 4430 após exposição de três meses no lodo da ETE PCJ-2 incorporados ao substrato

Amostras	Concentração (%)	Número de tétrades	Clone 4430 média±Dp (%)	Obs.	Número de tétrades	<i>T. pallida</i> . média±Dp (%)
Substrato de cultivo (controle negativo)	0	1500	5.25±1.40 ns		1500	5.42±1.10 ns
PCJ-2	10	1500	5.07±1.38 ns		3000	5.14±1.62 ns
PCJ-2	25	1500	5.09±1.10 ns		2700	4.27±1.17 ns
PCJ-2	50	1500	4.34±1.10 ns	ac	3000	4.48±1.19 ns

ns: não significativo; ac: alterações celulares

4.2.2.2 Avaliação da exposição crônica dos lodos das ETEs PCJ-1, AT-1 e AT-2 com *Tradescantia*

Neste segundo experimento, para todas as amostras testadas, das estações AT-1 e AT-2, os resultados obtidos para o clone 4430, não indicaram aumento significativo de micronúcleos em relação ao controle negativo, porém a frequência de micronúcleos aumentou em função da dose especialmente para a amostra AT-2. Já para a amostra PCJ-1 foi observada uma resposta positiva na concentração 25% ($p < 0,05$) e não foi possível obter leituras na concentração 50%, pois durante a leitura das lâminas foram observadas alterações celulares (citotoxicidade) que prejudicaram a análise das células do clone 4430 (Tabela 15).

Já com a *T. pallida* todas as amostras de lodo testadas (PCJ-1, AT-1 e AT-2), apresentaram aumento significativo nas médias das frequências de micronúcleos em pelo menos uma das concentrações quando comparadas ao controle negativo, mas em nenhuma delas, com efeito, dose-resposta (Tabela 15). Deve-se ressaltar que, em algumas das concentrações, foram observadas alterações celulares que dificultaram a leitura e a contagem das tétrades.

Neste segundo experimento, o substrato contendo o controle positivo foi diluído com novo substrato e as plantas foram expostas a essa nova concentração (50% em relação ao primeiro experimento). Neste caso, foi possível observar um resultado positivo para *T. pallida*, mas este ainda mostrou-se tóxica para o clone 4430 (Tabela 15).

Tabela 15 - Médias e desvios padrão (Dp) da frequência de micronúcleos (%) dos lodos das ETEs PCJ-1, AT-1 e AT-2 e controles negativo e positivo obtidos em tétrades jovens de células germinativas de *T. pallida* e do clone 4430

Amostra	Concentração (%)	Número de tétrades	Clone 4430 Média $\pm$ Dp (%)	Obs.	Número de tétrades	<i>T. pallida</i> Média $\pm$ Dp (%)	Obs.
Controle negativo	0	2100	4.19 $\pm$ 2.05		1500	4.07 $\pm$ 1.28	
PCJ-1	10	600	4.83 $\pm$ 1.65 n s	ac	2000	14.72 $\pm$ 3.60 **	
PCJ-1	25	1400	8.2 $\pm$ 3.49*		1121	7.28 $\pm$ 0.94 *	ac
PCJ-1	50	0	-	ac	1280	10.26 $\pm$ 2.67**	ac
AT-1	10	1500	2.60 $\pm$ 0.72 n s		2100	6.53 $\pm$ 2.10 n s	
AT-1	25	1200	2.25 $\pm$ 0.74 n s	ac	1500	13.34 $\pm$ 4.28 **	
AT-1	50	1500	4.27 $\pm$ 1.68 ns		1200	6,34 $\pm$ 0.96 ns	
AT-2	10	1750	5.30 $\pm$ 1.14 n s		1800	9.71 $\pm$ 1.48 **	ac
AT-2	25	1500	6.47 $\pm$ 1.8 5 n s	ac	1500	9.89 $\pm$ 5.78 **	ac
AT-2	50	1100	7.47 $\pm$ 3.59 *	ac	1500	12.00 $\pm$ 3.36 **	
Controle positivo	a	0	-		1500	10,76 $\pm$ 2,19 **	

a: ver texto; ns: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ac: alterações celulares

5. DISCUSSÃO

Para avaliar o potencial genotóxico de amostras de lodo de esgoto, foram realizados testes de genotoxicidade com *Tradescantia pallida* e com o clone 4430 do gênero *Tradescantia*. O teste de genotoxicidade com o clone 4430 do gênero *Tradescantia*, é utilizado mundialmente por vários grupos de pesquisadores, já, o teste de genotoxicidade com a *Tradescantia pallida*, é utilizado principalmente por pesquisadores brasileiros, sendo que, essa espécie vem fornecendo resultados satisfatórios como método de monitoramento ambiental (Batalha et al., 1999; Miyazato, 1999; Guimarães et al., 2000; Sant'Anna, 2003; Alves et al., 2003; Carvalho-Oliveira et al., 2005). Entretanto, foi encontrado na literatura somente um trabalho comparativo entre as duas espécies (Suyama et al., 2002) revelando a necessidade de mais estudos para verificação do potencial da *T. pallida* em substituição ao clone 4430 no teste Trad-MN.

Os primeiros ensaios realizados visaram comparar as respostas da frequência média de micronúcleos entre a *T. pallida* e o clone 4430 quando expostos ao trióxido de arsênio, à solução de Hoagland e à água de torneira, que são freqüentemente utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente, em bioensaios com vegetais (Cotelle et al., 1999; Knasmüller et al., 1999; Batalha et al., 1999; Carvalho-Oliveira et al., 2005).

As repostas obtidas com *T. pallida* e o Clone 4430 para a solução de Hoagland e água de torneira mostraram não haver diferença estatística entre as repostas com as duas plantas (tabela 4). Sabe-se que a água de torneira apresenta mutagenicidade devido à presença de substâncias cloradas (Sanchez et al., 1988),

porém, as respostas obtidas neste estudo permitem inferir que o teste não é sensível para detectar a mutagenicidade desses compostos nas concentrações presentes na água de torneira testada.

Ainda visando à possibilidade de substituição do clone 4430 pela *T. pallida*, os dados apresentados na tabela 5 mostram que o trióxido de arsênio apesar das médias de micronúcleos ser mais elevado para a *T. pallida*, comportaram-se de forma semelhantes em ambas as frente às doses testadas. Estes resultados somados aqueles obtidos anteriormente por Suyama et al (2002) para raios X sugerem que a *T. pallida* pode substituir o clone nos testes Trad-MN.

Após os testes comparativos entre as duas plantas, foram realizados dois novos experimentos utilizando apenas hastes florais de *T. pallida* expostas a diferentes substâncias mutagênicas (controles positivos) e tipos de água (controles negativos) que foram utilizados em estudos anteriores como controles positivos e negativos. Das substâncias ou/e concentrações testadas como controles positivos (formaldeído a 0,1%, formaldeído a 0,2%, EMS a 0,8 mM, EMS a 8,0 mM e As₂O₃ a 5 mM), pode-se afirmar que o formaldeído a 0,2% e o As₂O₃ 5 mM foram as substâncias que apresentaram maiores frequências de micronúcleos em comparação ao controle negativo (Tabela 7). Estudos realizados por Sandhu (1989), Rodrigues (1997) e Steinkellner (1998) e seus colaboradores, já haviam empregado o As₂O₃ como controle positivo utilizando o clone 4430, infelizmente, os autores não apresentam os valores numéricos obtidos para compará-los com os deste estudo.

As respostas obtidas com o teste do micronúcleo em hastes florais de *Tradescantia pallida* e diferentes tipos de água indicaram que a água destilada foi significativamente diferente do grupo (Tabela 6). Esses ensaios demonstraram a alta

variabilidade entre os controles negativos, indicando a necessidade de mais estudos para o entendimento dessas diferenças de respostas. Esses resultados confirmaram a necessidade da inclusão de controles negativo e positivo para se monitorar as condições experimentais (Klumpp et al., 2004).

A figura 7 apresenta um resumo dos dados obtidos para os diferentes controles positivos e negativos testados anteriormente tanto para o clone 4430 como para a *T. pallida*. As variações verificadas nas frequências de micronúcleos obtidas nesses estudos não apresentaram nenhum padrão de resultados, assim como os observado neste estudo. Segundo Ma (1983 *apud* Machado 2008), isso acontece devido ao fato de que o teste de micronúcleos com *Tradescantia* tem um caráter generalista de indicação de risco tóxicos.

Esses dados confirmam também, os achados de White e Claxton (2004) que indicaram o baixo poder discriminatório entre controles negativos e positivos somado a grande variedade de respostas obtidas para os controles negativos (de < 1 até 8) e dos positivos (de 5 a 11).

Figura 7. Comparação da frequência de micronúcleos obtidas neste estudo com dados da literatura apresentados na tabela 17 do anexo 1

Quando as coletas das amostras de lodos e as análises com os extratos aquosos dos mesmos foram iniciadas (primeira campanha), os testes comparativos entre o clone 4430 e a *T. pallida* não estavam concluídos, por causa disso, a primeira campanha tem uma variedade de controles positivos e negativos que foram sendo utilizados e testados paralelamente com as amostras dos extratos aquosos do lodo. Entretanto, os dados obtidos para estas amostras foram avaliados cada qual com seus controles negativos e positivos (Tabelas 8 a 12).

Na primeira campanha, foi constatado que o formaldeído 0,1% utilizado como controle positivo, não apresentou diferença significativa quando comparado

aos controles negativos dos ensaios realizados, indicando a necessidade de alteração dessa substância por outro controle positivo.

Para a avaliação da genotoxicidade das amostras de lodo de esgoto coletadas na primeira campanha, foram realizados 4 experimentos independentes devido as diferenças nas datas das coletas.

Na segunda campanha, as amostras foram testadas ao mesmo tempo, com um único controle negativo e positivo. Podem-se observar diferenças entre os resultados obtidos na primeira e na segunda campanha. Enquanto na primeira campanha 3 amostras de lodo (PCJ-1, PCJ-2 e SG) foram genotóxicas, na segunda campanha, nenhuma amostra apresentou genotoxicidade (Tabela 13). Este resultado é esperado, pois o lodo é uma amostra complexa originado do tratamento de efluentes passíveis de variações temporais.

Os potenciais hidrogeniônicos (pH) dos diferentes extratos aquosos preparados com amostras de lodo que também estão apresentados nas tabelas de 9 a 13, estão relacionados ao tipo de tratamento empregado pelas estações de tratamento de esgoto (Tabela 2). A ETE AT-2, por exemplo, adiciona calcário (CaCO_3) no final do tratamento, com a finalidade de auxiliar a retirada de água do lodo e, conseqüentemente, levando a diminuição de alguns patógenos (bactérias, vírus). Segundo Shumam (1998) o aumento do pH do solo diminui a disponibilidade dos metais por meio de reações de precipitação e pela absorção por colóides de carga variável, desta forma, o pH obtém uma grande influência na disponibilidade de elementos minerais às plantas. Hoodo e Alloway (1996), verificaram que a elevação do pH pela calagem em solos (adição de CaCO_3) reduz a disponibilidade de metais e, como conseqüência, pode levar a um decréscimo na

concentração de Cd, Cu, Ni, Pb e Zn em cenoura e espinafre. Portanto, o pH dos extratos aquosos seria uma outra variável a ser considerada na interpretação dos resultados obtidos (Tabela 15).

No caso da ETE AT-2, observou-se resultado negativo com os extratos aquosos (pH 9 a 12) e positivos quando incorporado ao solo. Se metais estivessem causando o efeito mutagênico, esse resultado seria esperado, pois a diluição do lodo no solo deve ter diminuído o pH da mistura, propiciando a sua disponibilidade. Fomin e colaboradores (1999) testaram resíduos de mineradoras em amostras acidificadas utilizando o ensaio de micronúcleo com o clone 4430 (Trad-MN), os autores observaram que as concentrações de metais foram maiores nas soluções acidificadas (pH = 4) que nas soluções originais dos extratos aquosos (pH = 8), elevando a frequência de micronúcleos nas células germinativas do clone 4430.

Nesse contexto, o pH do extrato aquoso deve ser considerado quando se pretende avaliar lodo de esgoto frente ao teste de genotoxicidade, pois para que sejam efetivamente tóxicos às plantas, os metais devem ser absorvidos na forma iônica (Taiz e Zeiger, 2004). Sugere-se que os extratos aquosos das amostras de lodo sejam testadas em diferentes pH, especialmente aqueles tratados com CaCO_3 .

É difícil porém extrapolar dados de laboratório para o campo. Os diferentes compostos presentes no lodo, ao atingirem o solo poderão interagir quimicamente com este, podendo ter seu potencial genotóxico aumentado ou reduzido. Este fato pode acontecer após destinação do resíduo sólido em aterro sanitário e/ou solo agrícola. Assim sendo, experimentos com a adição de lodo em solos podem fornecer resultados mais próximos à realidade e auxiliar na avaliação do potencial genotóxico dessas amostras.

Alguns estudos têm avaliado a mutagenicidade *in situ* de solos de áreas contaminadas (Cotelle et al., 1999; Cabrera et al., 1999; Aleem, Malik, 2003), e, em geral, o efeito observado tem sido relacionado à presença de metais (Steinkellner et al., 1998; Knasmüller et al., 1998) e compostos orgânicos complexos (Ma et al., 1992; Jiang et al., 1999; Araújo e Monteiro, Araújo, 2005).

Gill e Sandhu (1992) testaram diferentes substâncias químicas tais como o trióxido de arsênio, o dieldrin e o tetraacetato de chumbo, separados e combinadas, em diferentes proporções (1:1, 1:2 e 2:1) com o Trad-MN. Este estudo comparou resultados obtidos com extratos e hastes florais e também com plantas enraizadas expostas as amostras misturadas ao solo. As amostras misturadas ao solo apresentaram maior frequência de micronúcleos do que o teste feito com hastes florais e extratos aquosos. Os autores concluíram que o potencial genotóxico pode ser afetado pelo micro ambiente e pelo efeito sinérgico e antagônico das misturas entre as substâncias testadas.

Desse modo, o teste com mudas de *Tradescantia* expostas cronicamente a diferentes concentrações de lodo adicionado ao substrato de cultivo foi realizado para complementar a avaliação dessas amostras de tão alta complexidade e tornando-se o diferencial deste trabalho. Os experimentos foram realizados de forma a comparar as respostas das duas plantas: o clone 4430 e a *T. pallida*. O tempo de exposição teve duração entre o plantio das mudas até a época em que as primeiras florações ocorreram neste caso, três meses. Essa opção de exposição crônica teve por objetivo simular o processo de crescimento das plantas expostas ao lodo como se fossem as condições naturais no meio ambiente e não as mantidas em laboratório.

Não foram encontrados na literatura estudos similares ao realizado neste trabalho utilizando amostras de lodo de esgoto, mas apenas amostras de solos contaminados e plantas enraizadas do clone 4430 expostas por um período máximo de 72 horas (Knasmüller et al., 1998) com resultados positivos.

Nos vegetais superiores encontram-se tecidos de intensa participação nos mecanismos de nutrição celular das plantas. Eles compreendem os pêlos absorventes das raízes e os canais condutores de seiva bruta e elaborada. Os pêlos radiculares são extensões microscópicas das células da epiderme radicular, que aumentam significativamente desta área, proporcionando, assim, maior capacidade para absorção de íons e água do solo (Taiz e Zeiger, 2004). O ponto preciso de entrada dos minerais para dentro do sistema radicular tem sido um tópico de considerável interesse, pois áreas diferentes da raiz absorvem íons minerais distintos. Muitos pesquisadores consideram que os nutrientes são absorvidos somente pela região apical dos eixos radiculares ou ramificações (Bar-Yosef et al., 1972) ¹ e outros consideram que os nutrientes são absorvidos ao longo de toda superfície radicular (Nye, Toinker 1977) ², entretanto, evidências experimentais sustentam as duas possibilidades, dependendo da espécie vegetal e o nutriente sob investigação (Taiz e Zeiger, 2004).

Os resultados obtidos no teste trad-MN realizado com as amostras de lodo misturadas ao substrato de cultivo, indicaram que o lodo das estações AT-1 AT-2 e PCJ-1 apresentaram efeito genotóxico em *T. pallida* com resultados duas ou três vezes maiores que do resultado do controle negativo, diferentemente da estação PCJ-2 que foram negativos nesse experimento. A resposta entre as duas espécies também

¹ Bar-Yosef *et al*, 1972 apud Taiz e Zeiger, 2004

² Nye e Toinker 1977 apud Taiz e Zeiger, 2004

foi diferente, sendo que o lodo PCJ-1 causou citotoxicidade ao clone 4430 e não a *T. pallida*. As concentrações empregadas neste estudo foram intencionalmente maiores do que aquelas usualmente utilizadas, pois a primeira premissa que a Resolução CONAMA 357 define é que a taxa de aplicação leve em consideração o benefício agrícola com base no elemento N e P.

Quando os resultados das exposições crônicas (plantas + lodo + substrato de cultivo) e agudos (hastes florais imersas nos extratos aquosos de lodo) foram comparados, constatou-se maior incidência de micronúcleos na exposição crônica com plantas contendo o sistema radicular, sugerindo que este protocolo parece ser mais sensível para avaliação da genotoxicidade neste tipo de amostra, apesar do maior gasto de tempo para avaliação e obtenção dos resultados (tabela 16).

Tabela 16 – Avaliação dos dados qualitativos da exposição crônica e aguda das amostras de lodo de esgoto da primeira e segunda para o teste de micronúcleo com *Tradescantia pallida*

ETE		<i>Tradescantia pallida</i>	
Amostra		Lodo incorporado ao solo	Extrato aquoso
PCJ-1	1º campanha	não realizado	+
	2º campanha	+	-
PCJ-2	1º campanha	não realizado	+
	2º campanha	-	-
AT-1	1º campanha	não realizado	-
	2º campanha	+	-
AT-2	1º campanha	não realizado	-
	2º campanha	+	-
SG	1º campanha	não realizado	+
	2º campanha	não realizado	-

Os testes de genotoxicidade com plantas podem ser úteis em uma das etapas da avaliação de risco genotóxico para os seres humanos: a etapa de avaliação do perigo. Resultados positivos podem indicar a necessidade de mais testes com espécies de maior complexidade e de maior relevância para o ser humano. Devido à restrição cada vez maior do uso de animais de laboratório, os testes com bactérias, plantas e culturas celulares vêm ganhando importância, porém sua interpretação deve ser muito cautelosa e realizada conjuntamente com outros dados. Considera-se que quanto mais próximo do ser humano o organismo teste for, mais relevante se tornam os resultados obtidos para se inferir riscos à saúde humana (Brusick et al., 1992).

O teste de micronúcleo utilizando plantas do gênero *Tradescantia* pode fornecer dados sobre o potencial genotóxico de amostras de lodos de esgoto, entretanto é importante ressaltar que este teste não demonstrou ser ferramenta aplicável em programas de monitoramento. O teste tem a desvantagem de ser muito laborioso dificultando a análise de um grande número de amostras em um curto espaço de tempo, além disso, o teste é subjetivo e requer treinamento especializado para correta obtenção e interpretação dos resultados. Porém, os resultados obtidos neste trabalho serão úteis em conjunto com outros testes de toxicidade e mutagenicidade para uma avaliação mais abrangente do potencial tóxico dessas amostras complexas.

6. CONCLUSÃO

- Todas as ETEs estudadas apresentaram pelo menos uma amostra positiva, os resultados variaram em função das campanhas de coleta e do método de exposição empregado. Mais estudos são necessários para elucidar quais seriam esses compostos relacionando-os aos efeitos observados;
- Os resultados sugerem que o método expondo plantas enraizadas ao lodo de esgoto incorporado ao solo em experimento de longa duração é mais sensíveis que a exposição de hastes florais as mesmas amostras em extratos aquosos do lodo;
- As respostas obtidas nos estudos comparativos utilizando o teste de micronúcleo com *Tradescantia pallida* e clone 4430 com controles positivos e negativos demonstraram que a *Tradescantia pallida* pode substituir o clone no teste de micronúcleo;
- O teste trad-MN, apesar de sensível e útil na caracterização da mutagenicidade de amostras de lodo de esgoto não parece ser boa alternativa em programas de monitoramento devido a sua subjetividade, tempo excessivo para obtenção de respostas e pequena amplitude de resposta.

7. ANEXOS

Anexo 1: Tabela 17. Médias e desvios padrão de estudos com *Tradescantia pallida* e clone 4430.

Referências	controle negativo				controle positivo					
	torneira	Hoagland	destilada	Ultra pura	As ₂ O ₃ 5,0 mM	E M S 0,8 mM	E M S 8 mM	formaldeído 0,10%	formaldeído 0,20%	formaldeído 0,05%
Clone 4430										
Ma et al., 1998	3,20±1,55									
Yang et al., 1999	6,84±0,30									
Knasmüller et al., 1998	3,6±2,22	3,20±2,1			positivo					
Steinkellner et al., 1998	2,2±1,07				positivo					
Monarca et al., 2002			3,0±1,7 4,8±1,5							
Rodrigues et al., 1998		4,2±1,4				10,7±1,9	positivo	positivo		
Cotelle et al., 1999		5,10±1,40								
Minouflet e tal., 2005		0,8±1,0								
Klumpp et al., 2004		3,73±1,04								
Neste estudo	5,0±1,6	5,0±1,2 3,3±1,09			6,90±1,07					
<i>T. pallida</i>										
Batalha et al, 1999			2,5							4,89
Santos et al., 2004				2,45±0,52				5,8±0,8		
Carvalho-Oliveira et al., 2005			3,1±1,7					7,4±4,0		
Carvalho-Oliveira et al., 2007			3,1±1,7							6,±2,3
Neste estudo	6,0±1,9 4,67±0,98	6,1±2,1 3,6±0,48	8,11±2,57	5,59±1,97	8,0±1,1,93 7,87±1,52	5,96±2,03	11,25±5,85	5,9±2,3 6,94±2,65	9,48±5,67	

Anexo 2 : artigo proposto para submissão

**Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia*
micronucleus assay**

Mielli, Ana C¹; Matta, Marcus E M²; Nersesyan, Armen³; Saldiva, Paulo H¹ N;
Umbuzeiro, Gisela A²

¹ Laboratory of Experimental Air Pollution, Department of Pathology of the School
of Medicine, University of São Paulo, Brazil

² Environmental Toxicology, Genotoxicity and Microbiology Division - CETESB,
São Paulo, Brazil.

³ Institute of Cancer Research, University of Vienna, Austria

Running Title: Genotoxicity of treated sludge

* Corresponding author and reprint requests:

Gisela de Aragão Umbuzeiro

Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345, prédio 5 sala 21

05459-900 - São Paulo – SP – Brazil

e-mail: giselau@usp.br or giselav@cetesbnet.sp.gov.br - FAX 55 11 31333982

Abstract

Treatment of municipal wastes, especially from metropolitan regions, generates great quantities of sludge which can contain hazardous substances. These wastes are used as fertilizer in agricultural soil because of their high nutrient content, depending on the concentrations of metals and organic contaminants. Laws that regulate the use of treated sludge in agricultural soil and the criteria used are based on the analysis of selected chemicals. Acute toxicity and genotoxicity assays can complement the characterization of samples and indicate the need of complementary treatment or prevention actions to reduce the levels of contaminants in those samples before their application in the agriculture. The objective of this study was to provide information about the genotoxicity of treated sludge samples collected in four different urban sewage treatment plants in micronucleus assays (MN) with germinative tetrads of *Tradescantia pallida* and *Tradescantia* clone 4430 (TRAD-MN). Sludge samples in 10%, 25% and 50% v/v were tested in TRAD-MN experiments. In clone # 4430 two samples induced genotoxicity while in *T. pallida* three were positive, although no clear dose-response effects were observed. *T. pallida* was also used to test aqueous extracts from the same samples in experiments with plant cuttings. In this case all samples tested showed negative results. The protocol where the plants were exposed to the sludge mixed with soil during 3 months seems to be a promising tool to assess the genotoxicity of sludge although it is time-consuming.

Key words: *Tradescantia*, clone 4430, *T. pallida*; sludge genotoxicity, micronucleus

Introduction

The treatment of liquid wastes in municipal sewage treatment plants creates significant quantities of solid residues. The potential hazard caused by these wastes requires that their characteristics are determined in order to develop environmentally sound management criteria (1).

It is known that influents of sewage treatments plants contain genotoxins which can be removed during the treatment but accumulate in the sludge (2). The increase of the number of treatment plants in Brazil as well as other emerging countries in the world leads to an increase of the amount of the resultant solid waste. This material is rich in organic matter and may be used as fertilizer or soil amendment (3, 4, 5). In 2006, a regulation was issued in Brazil which defined quality criteria for the application of treated sludge in agricultural fields (6). It recommends that complementary chemical analyses as well as toxicity/genotoxicity tests are performed depending on the type of influent that is treated. Unfortunately, there are no standardized methods available in the literature to testing these samples. Several short-term assays are available and could be used to assess adverse effects of the sludge (7).

In order to collect data concerning the genotoxicity of sludge generated in treatment plants in São Paulo State, a project was started in 2004 (in press). Bacteria and plant assays were included. Among the different assays, the *Tradescantia* micronucleus (TRAD-MN) assay with pollen tetrads is the most extensively validated procedure (7, 8). This test-system has been used worldwide to evaluate the genotoxic potential of chemicals (8, 9, 10), air (11,12, 13), soil (14), water (15) and sewage sludge (3) and it is one of the assays included in the International Program

on Plant Bioassays (IPPB) (16). The tests are performed in most cases by exposing plant cuttings to aqueous extract (17, 18). Mutagenicity of sewage sludge has been examined by Hopke (3) using tests with *Tradescantia paludosa*, *Salmonella*/microsome assay and germ cells of *Zea mays*. Steinkellner et al (17) and Majer et al (18) reported that exposure of intact plants (with roots) to contaminated soils enables the detection of DNA damage caused by metal contaminations. The authors proposed that this protocol may be the most sensitive for the detection of genotoxins in soils.

The plant used most frequently in the TRAD-MN assay is a hybrid plant namely clone # 4430, which can be cultivated worldwide. *T. pallida*, which is a wild plant in different South American countries, has been used in tropical areas by several authors and promising results have been obtained in a number of studies (12, 13, 19, 20, 21, 22, 23).

The aim of this study was to evaluate the genotoxicity of sludge samples from different sewage treatment plants from São Paulo state, Brazil, with the TRAD-MN assay using a modified protocol in which the samples were incorporated into soil substrate for 3 months. The experiments were carried out with the two different *Tradescantia* plants, clone # 4430 and in parallel with *T. pallida* to compare the response of both plants and obtain information about the genotoxic potential of the sludge samples. Also aqueous extracts of the same samples were tested using the plant cutting protocol with *T. pallida*.

2- Material and Methods

2.1- Chemicals

Arsenic trioxide (As_2O_3) was obtained from Sigma (St. Louise, USA).

Carmin was obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Commercial soil for vegetables, earthworm humus, special commercial soil for plants and vermiculite were purchased from Plantmax (Eucatex, São Paulo, Brazil), Maxterra (São Paulo, Brazil), Rações Agrodog (São Paulo, Brazil) and Terra Mater (São Paulo, Brazil) respectively.

2.2 - Collection of treated sludge samples

Treated sludge samples from 4 different sewage treatment plants (STP) were tested. The plants use different processes and are located in two hydrographic basins of the São Paulo State in Brazil. According to DAEE (24), the hydrographic basin PCJ (Piracicaba, Capivari and Jundiaí) has a population of 4.9 million people and their main activities are orange and vegetable cultivation as well as paper/cellulose and sugar/alcohol production. The basin Alto Tietê (AT) has a population of 19.2 million people and their main activities are fruit and vegetable cultivation, production of electronics, chemicals, machinery and textiles.

The characteristics of the treatment plants are summarized in Table II. PCJ-1 treats mainly urban effluents and textile industrial wastewaters; PCJ-2 treats urban effluents and discharges from food/drinking manufacturing and wood processing; AT-1 receives urban effluent and industrial effluent from São Paulo region. AT-2 treats urban and industrial waters from chemical industries including dye factories.

Treated sludge samples collected of the final treatment process from each plant were transported to the field where the experiments were conducted.

2. 3 - Exposure of the plants to the sludge samples

Two different series of experiments were performed. In each experiment independent negative control was included with the soil that was used to dilute de sludge. As a positive control As_2O_3 was used with cuttings of *Tradescantia pallida* and clone # 4430.

In the first experiment, three different concentrations (10, 25 and 50%) of PCJ-2 sludge and the negative control were tested in parallel with both plant cuttings. The reference soil was prepared as follow: 47.1% of commercial soil for vegetables, 23.5% special commercial soil from plants, 23.5% vermiculite and 5.9% of earthworm humus. Concentrations of 10%, 25% and 50% of sludge were obtained by mixing the sample with the reference soil.

Flowerpots (43x20x20 cm) were filled with 4 kg of the test samples. Each pot contained 4 plants. The plants used in the experiments were cultivated in Caucaia do Alto city in non polluted area. The plants were transferred to the flowerpots with roots when they were 15 cm length.

The experiments were performed under field conditions and the analysis of the MN performed when the first inflorescences appeared (after 90 to 97 days of exposure).

The positive control experiments were performed with cuttings from both plants containing young inflorescences according to the protocol described by Ma (1992). Exposure time was 6 hours and three concentrations of As_2O_3 (1.0 mM, 2.5 mM and 5.0 mM) were tested (4, 25) and the negative control was Hoagland solution (26).

Aqueous extracts of the same sludge samples were prepared according to Mathews and Hasting (1997) (27). One part of sample and 4 parts of distilled water were mixed for 24 hours in a tumbler. After sedimentation the water phase of each sample was tested using the plant cutting protocol with *T. pallida* (8). This experiment was performed at a single dose (maximum dose) and the negative control used was distilled water.

For the field experiment and for the plant cutting protocol five to ten inflorescences were analyzed per experimental group. Inflorescences were fixed in 1:3 aceto-ethanol solutions for 24 h and stored in 70% ethanol. Slides were prepared with acetocarmine solution (25). Subsequently they were coded and 300 tetrads from each slide were scored (in total 1500-3000 tetrads per experimental group) under 400 x magnification (Olympus H-2 Japan).

2.4 - Statistical Analysis

The results of the experiments were compared by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's or Bonferroni's post-hoc tests. The significance level to consider a test as positive was $p < 0.05$.

3 – Results and Discussion

In the first experiment, the three concentrations of the PCJ-2 sludge sample tested did not cause an increase of the MN frequencies in clone 4430 and also not in *T. pallida* plants (Table II). In the second experiment, AT-1 did not induce any increase of the MN frequencies but PCJ-2 and AT-2 caused a positive response (Table II). In *T. pallida* all sludge samples tested in the second experiment (PCJ1, AT-1 and AT-2) induced a positive response at least at one concentration tested, but no clear dose-effect responses were observed.

Regarding the use of *Tradescantia* assay for sludge testing, the only report was found in the literature (3). The authors tested water extract of sludge from a municipal STP from Chicago using Trad-MCN and found positive results, but no studies were found in the literature where sludge samples were testing using long term exposure with whole plants like in this study.

Figure 1 shows the results obtained with As_2O_3 in both plants using the plant cutting protocol. With both plants positive results were obtained, and the findings showed that *T. pallida* was more sensitive to all the concentrations analyzed than clone 4430. In 2002, Suyama et al. (19) showed similar sensitivity of both plant to X-rays exposure..

Based on the results obtained we can suggest that *T. pallida* seems to be more sensitive than the clone 4430 at least for the set of samples analyzed in this study (Table II).

When the tests were performed with aqueous extracts from the same samples using plant cuttings with *T. pallida*, all results were negative (Table III). Therefore the long term exposure in the field study seems to be more efficient than the

exposure of plant cuttings in the laboratory. This could be because entire plants are exposed for a much longer period (3 months) in contrast with the plant cuttings assays where just part of the plant is exposed for much less time (6 to 8 hours). Another possibility is that biotic and/or abiotic transformation occurred in the field, generating mutagenic compounds. Chemical analysis is needed in order to learn which compounds could be responsible for the observed effects. Analysis of several metals and organics are now in progress in other samples of the same STPs.

The advantage of using whole plants in the field is the possibility to simulate a real situation. Fomin et al. (28) showed that testing soil aqueous extracts using plant cuttings, the absorption of the genotoxic metals was highly depended on the pH of the solution and this effect would be minimized when samples are incorporated in the soil. This protocol is much more time consuming and requires more effort considering that the experiments are performed in the field and not in the laboratory. Nevertheless this field exposure protocol seems to be a promising tool to assess the genotoxicity of sludge or soils but more studies are needed to verify its efficiency.

4 - Acknowledgments

The authors thank Carlos Alberto Coimbra for technical assistance and Carmem Diva Saldiva André for helping with the statistical analysis. We thank Ana Lucia Lorente and Siegfried Knasmüller (Institute of Cancer Research, Medical University of Vienna, Austria) for continuous encouragement and valuable suggestions. This article does not necessarily reflect the views of CETESB and no official endorsement should be inferred.

5 – References

- (1) W. M. Harrington Jr. Hazardous Solid Waste from Domestic Wastewater Treatment Plants, Environ. Health Persp. 27 (Dec1978) 231-237.
- (2) B. Jolibois, B M. Guebert. Efficacy of two wastewater treatment plants in removing genotoxins. Arq. Environ. Contam. Tox. 48 (2005) 289-295.
- (3) P. K. Hopker, M. J. Plewa, J. B. Johnston, D. Weaver, S. G. Wood, R. A. Larson, T. Hinesly. Multitechnique screening of Chicago municipal sewage sludge for mutagenic activity, Environ. Sci. and Tech. 16 (1982) 140-147.
- (4) G. S. Rodrigues, T.H. Ma, D. Pimentel, L. N. Weintein. *Tradescantia* bioassay monitoring systems for environmental mutagenesis: a review, Crit. Rev. Plant Sci. 16 (1998) 325-359.
- (5) J. E. Vanzo, L.S.Macedo, M. T. Tsutya. ETE de Franca: uma estação que além de tratar os esgotos, produz insumos agrícolas, Ass. Bras. Engenharia Sanitária e Ambiental (2001) 1-14.
- (6) Brasil. Resolução CONAMA nº 375/2006 – “Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus derivados”. Data da legislação: 29/08/2006 – Publicação DOU: 30/08/2006.

-
- (7) P. A. White, L. D. Claxton. Mutagens in contaminated soil: a review, *Mutation Res.* 569 (2004) 227-345.
- (8) T.H. Ma. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube aberration test for *in situ* monitoring and mutagen screening, *Environ. Health Persp.* 37 (1992) 85-90.
- (9) B. S. Gill, S. S. Sandhu. Application of the *Tradescantia* micronucleus assay for the genetic evaluation of chemical mixtures in soil and aqueous media, *Mutation Res.* 270 (1992) 65-69.
- (10) H. Steinkellner, K. Munsik, C. Helma, S. Ecker, T.H. Ma, M. Kundi, S. Knasmüller. Genotoxic effects of Heavy Metals: comparative investigation with plant bioassays, *Environ. Molec. Mutagenesis* 31(1998) 183-191.
- (11) S. Monarca, D. Feretti. Monitoring of mutagens in urban air samples, *Mutation Res.* 426(2) (1997) 189-192.
- (12) J. R. F. Batalha, E. T. Guimarães, D. J. A. Lobo, A. J. F. C. Lichtenfels, T. Deur, H. A. Carvalho, E. S. Alves, M. Domingos, G. S. Rodrigues, P. H. N. Saldiva. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. *Mutation Res.* 426(2) (1999) 229-232.
- (13) E. T. Guimarães, M. Domingos, E. S. Alves, N. Caldini, P.H.N. Saldiva. Detection of the genotoxic potential of air pollution in the city of São Paulo (Brazil)
-

with *Tradescantia pallida* using *Tradescantia* micronucleus assay (Trad-MN), Environ. Exp. 44 (2000) 1-8.

(14) S. Cotellet, J. F. Masfaraud. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* micronucleus and the *Tradescantia* micronucleus assays, Mutation Res. 426 (1999) 167-171.

(15) R. Crebelli, L. Conti, S. Monarca, D. Feretti, I. Zerbini, C. Zani, E. Veschetti, D. Cutilli, M. Ottaviani. Toxicity of the disinfection by products resulting from peracetic acid or hypochlorite disinfected sewage wastewater, Water Res. 39 (2005) 1105-1113.

(16) S. S. Sandhu. Utility of genetic indicators for monitoring ecological condition. Mutation Res. 483 suppl. 1E-5 (2001) 12.

(17) H. Steinkellner, K. Munsik, C. Helma, C. S. Ecker, TH Ma, S. Knasmüller. Genotoxic effects of Heavy Metals: comparative investigation with plant bioassays, Environ. Molec. Mutagenesis 31(1998) 183-191.

(18) B. J. Majer, D. Tscherko, A. Paschke, R. Wennrich, M. Kundi, E. Kandeler, S. Knasmüller. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and microbial enzyme activities: a comparative investigation, Mutation Res. 515 (2002) 111-124.

- (19) F. Suyama, E. T. Guimarães, D. J. A. Lobo, P.H.N. Saldiva. Pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effects of x-rays, *Braz. Journal Med. Biol. Res.* 35 (2002) 127-129.
- (20) R. Carvalho-Oliveira, R.M.K. Pozo, D.J.A. Lobo, A.J.F. Lichtenfels, P.H.N. Saldiva. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil, *Environ. Res.* 98 (2005) 1-7.
- (21) E. S. Alves, P. M. Giusti, M. Domingos, E. T. Guimarães, D. J. Lobo, P. H. N. Saldiva. Estudo anatômico foliar do Clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição aérea urbana, *Rev. Brasil. Bot.* 4 (2001) 567-576.
- (22) H. A. Carreras, M. L. Pignata, P.H.N. Saldiva. In situ monitoring of urban air in Córdoba, Argentina using the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MN) bioassay, *Atmospheric Environ.* 40 (2006) 7824-7830.
- (23) E. S. Alves, S. R. Souza, A. N. V. Pedroso, M. Domingos. Potencial of the Trad-MN assay applied with inflorescences of *Tradescantia pallida* 'purpurea' for evaluating air contamination by naphthalene. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (2007), doi:10.1016/j.ecoenv.2007.09.006.
- (24) DAEE - Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo. Plano Estadual de Recursos Hídricos 2004-2007 – Resumo III. São Paulo. <http://www.daee.sp.gov.br/acervoepesquisa/perh20042007>.

-
- (25) S. Knasmüller, M. Uhl, E. Gottmann, C. Hölzl, B. Majer, J. Bernhard. The *Tradescantia* micronucleus bioassay, in: J. Maluszynska, M. Plewa (eds.), Bioassays in Plant Cells: For improvement of ecosystem and human health. Katovic, Wydawnictwo Uniwersytetu Slaskiego, 2003.
- (26) D. R. Hoagland, D. I. Arnon. The water-culture method for growing plants without soil, Univ. Calif. Agric. Exp. Stn., Berkeley, CA, 347 (1950) 1-39.
- (27) J. E. Mathews, L. Hastings. Evaluation of Toxicity Test Procedure for Screening Treatability Potencial of Waste in Soil, Toxicity Assessment: An International Quarterly 2 (1987) 265-281.
- (28) A. Fomin, A. Paschke, U. Arndt. Assessment of genotoxicity of mine-dump material using the *Tradescantia* stamen hair (trad-SHM) and the *Tradescantia* micronucleus (trad-MN) bioassays, Mutation Res. 426(2) (1999) 171-181.

Table I – Characteristics of the sewage treatment plants where sludge samples were collected

STP ^a	Treatment Process		Q ^b (L/s)	Sludge generated (ton/day)	Chemicals used during treatment		
	Liquid phase	Solid phase			CaCO ₃	FeCl ₃	Polyacrylimide polymer
PCJ-1	Biological filter	Digestion, centrifugation and drying bed	110	7	no	no	yes
PCJ-2	Aerated Lagoons followed by sedimentary lagoons	Centrifugation and drying bed	900	28	no	no	yes
AT-1	Conventional activated sludge	Digestion, filter press filtration	7000	300	no	yes	yes
AT-2	Conventional activated sludge	Digestion filter press filtration	750	37	yes	yes	no

^a sewage treatment plant^b Flow rate

Figure I – (a and b) Flowerpots prepared with the mixture of different concentrations of sludge in soil substrate; (c and d) Initial exposure of the small plants to the samples and plants after one month of exposure

Figure II - Frequency of micronucleus in a dose response experiment for the positive control (As_2O_3 - Arsenic Trioxide) using clone 4430 e *Tradescantia pallida* after 6h of exposure

N: number of slides analyzed with 300 tetrads minimum each one

Table II – Mean of the frequencies of micronuclei, standard deviation and number of tetrads analyzed for *T. pallida* and clone 4430 exposed to different concentrations of the sludge samples analyzed

Samples	Concentration of sludge (%)	Number of tetrads analyzed	Clone 4430 MN (%)	Number of tetrads analyzed	<i>T. pallida</i> MN (%)
1 st Experiment					
Negative control	0	1,500	5.25±1.40	1,500	5.42±1.14
PCJ-2	10	1,500	5.07±1.38	3,000	5.14±1.62
	25	1,500	5.09±1.10	2,700	4.27±1.17
	50	1,500 ^a	4.34±1.10	3,000	4.48±1.19
2 nd Experiment					
Negative Control	0	2,100	4.19±2.05	1,500	4.07±1.28
PCJ-1	10	600 ^a	4.83±1.65	2,000	14.72 ±3.60 **
	25	1,400	8.2±3.49*	1,121 ^a	7.28 ±0.94
	50	No tetrads	-	1,280 ^a	10.26 ±2.67 **
AT-1	10	1,500	2.60 ±0.72	2,100	6.53 ± 2.10
	25	1,200 ^a	2.25 ±0.74	1,500	13.34 ± 4.28 **
	50	1,500	4.27 ± 1.68	1,200	6,34 ± 0.96
AT-2	10	1,750	5.30 ±1.14	1,800 ^a	9.71 ±1.48 **
	25	1,500 ^a	6.47±1.85	1,500 ^a	9.89±5.78 **
	50	1,100 ^a	7.47±3.59 *	1,500	12.00±3.36 **

* p < 0.05; ** p < 0.01

^a – cellular alteration no identifiable

Table III – Results of the *T. pallida* micronucleus (MN) assay using the plant cutting protocol and aqueous extracts of the sludge samples

Sewage Treatment Plant (STP)	Number of tetrads analyzed	MN frequency (%)
Negative control ^a		5.5±1.7
PCJ-1		6.9±3.0 ns
PCJ-2	1,500	7.6±2.6 ns
AT-1		6.9±2.2 ns
AT-2		5.7±2.5 ns

ns: not statistically significant

^a – Hoagland solution

Anexo 3: Dados brutos obtidos durante a leitura das lâminas no teste Trad-MNTabela A₁ – Extrato aquoso de solo comercial (plantmax)

Nº Lâminas	Nº de MN por Tétrade					N/300	%
	0	1	2	3	4		
1	287	6	6	0	1	22/300	7,34
2	297	3	0	0	0	3/300	1
3	296	3	1	0	0	5/300	1,67
4	294	6	0	0	0	6/300	2
5	291	8	1	0	0	10/300	3,34
6	289	8	2	1	0	15/300	5
7	283	8	6	3	0	29/300	9,67
8	291	8	1	0	0	10/300	3,34
9	289	10	1	0	0	12/300	4
10	286	9	3	1	1	22/300	7,34

Tabela A₂ - Água de Torneira (Controle Negativo)

Nº Lâminas	Nº de MN por Tétrade						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	288	8	3	1	0	0	17/300	5,67
2	277	6	2	3	1	0	23/300	7,67
3	295	4	1	0	0	0	6/300	2
4	290	6	1	2	0	1	19/300	6,34
5	300	0	0	0	0	0	0/300	0
6	293	5	2	0	0	0	9/300	3
7	292	4	2	2	0	0	14/300	4,67
8	292	4	2	0	0	0	8/300	2,67

Tabela A₃ - Formaldeído 0,1% (Controle Positivo)

Nº Lâminas	Nº de MN por Tétrade						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	283	8	4	2	2	0	30/300	10
2	296	1	2	0	1	0	9/300	3
3	288	5	5	1	1	0	22/300	7,34
4	288	9	2	1	0	0	16/300	6,34
5	298	0	1	1	0	0	5/300	1,7

Resultados do teste com extrato aquoso da primeira amostra de lodo da ETE PCJ-2 (outubro/2004).

Tabela A₄ – Água de torneira (Controle Negativo)

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrade						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	300	0	0	0	0	0	3/300	1
2	299	0	1	0	0	0	2/300	0,67
3	299	1	0	0	0	0	1/300	0,33
4	291	5	2	0	0	0	9/300	3
5	288	6	3	0	0	0	12/300	4
6	300	0	0	0	0	0	0/300	0
7	293	0	2	1	0	0	7/300	1,67
8	289	2	3	1	0	0	11/300	3,67
9	287	2	4	1	0	0	13/300	4,34
10	288	2	5	0	0	0	12/300	4

N de laminas	Nº de MN por Tétrade						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	284	5	4	1	0	0	16/300	5,34
2	289	8	3	0	0	0	14/300	4,67
3	292	2	1	0	1	0	8/300	2,67
4	293	7	0	0	0	0	7/300	2,34
5	292	5	3	0	0	0	11/300	3,67
6	293	5	0	1	1	0	12/300	4
7	292	4	4	0	0	0	12/300	4
8	285	2	5	1	0	0	15/300	5
9	294	4	21	0	0	0	8/300	2,67
10	290	8	2	0	0	0	12/300	4

Tabela A₆ – Amostra 94361 – ETE de PCJ-2

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrade						N/300	%
	0	1	2	3	4			
1	285	2	5	1	0		15/300	5
2	287	5	2	0	1		13/300	4,34
3	289	5	3	0	0		11/300	3,67
4	282	10	2	0	1		18/300	6
5	286	6	4	0	0		14/300	4,67
6	275	10	3	3	0		25/300	8,34
7	272	12	5	3	0		28/300	9,33
8	279	9	3	2	0		21/300	7
9	276	2	6	2	1		24/300	8
10	289	9	1	0	0		11/300	3,67

Resultado obtidos dos testes realizados com extrato aquoso das ETEs AT-1 e SG (Novembro de 2004). Obs. Não houve controle positivo.

Tabela A₇ – Solução de Hoagland - controle negativo

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrade						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	295	1	0	0	1	0	5/300	1,67
2	282	7	4	1	1	0	18/300	6
3	292	4	2	0	0	0	8/300	2,67
4	283	3	4	2	0	0	17/300	5,67
5	283	6	4	1	0	0	17/300	5,67
6	295	3	1	0	0	0	5/300	1,67
7	297	1	1	0	0	0	3/300	1
8	296	2	1	0	0	0	4/300	1,33
9	290	2	1	2	0	0	10/300	3,33
10	295	3	1	0	0	0	5/300	1,67

Tabela A₈ – Amostra 1306 – ETE de AT-1

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrade					N/300	%
	0	1	2	3	4		
1	271	15	5	0	1	29/300	9,67
2	291	3	3	0	0	9/300	3
3	279	10	4	1	0	21/300	7
4	287	5	4	0	0	13/300	4,34
5	280	10	2	2	0	20/300	6,67
6	280	4	3	2	1	20/300	6,67
7	284	5	4	1	0	16/300	5,34
8	281	7	6	0	0	19/300	6,34
9	280	8	6	0	0	20/300	6,67
10	294	1	1	1	0	6/300	2

Tabela A₉ - Amostra 1307 - ETE de SG

Nº Lâminas	Nº de MN por Tétrade					N/300	%
	0	1	2	3	4		
1	292	8	0	0	0	8/300	2,67
2	287	5	4	0	0	13/300	4,34
3	295	3	1	0	0	5/300	1,67
4	276	10	5	0	1	24/300	8
5	288	3	3	1	0	12/300	4
6	274	8	5	0	2	26/300	8,67
7	264	13	4	5	0	36/300	12
8	270	8	2	2	3	30/300	10
9	279	9	6	0	0	21/300	7
10	268	10	5	4	0	32/300	10,7

Resultados de testes em extratos aquosos, realizados em Fevereiro de 2005.

Tabela A₁₀ - Controle Negativo - Água Ultra Pura

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	295	1	2	0	0	0	5	1,67
2	294	1	1	1	0	0	6	2
3	293	1	3	0	0	0	7	2,34
4	284	6	5	0	0	0	16	5,34
5	293	5	1	0	0	0	7	2,34

Tabela A₁₁ - Amostra 91869 – solo comercial + metanol

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	291	4	1	1	0	0	9	3
2	264	13	7	3	0	0	36	12
3	283	11	0	2	0	0	17	5,67
4	289	2	3	1	0	0	11	3,67
5	273	13	4	2	0	0	27	9
6	277	13	5	0	0	0	23	7,67
7	247	20	13	1	0	1	53	17,67

Tabela A₁₂ – Amostra 92649 – comercial+Metanol+HPA

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	288	10	1	0	0	0	12	4
2	266	11	7	3	0	0	34	11,34
3	272	9	4	2	0	1	28	9,34
4	288	0	3	2	0	0	12	4
5	274	18	4	0	0	0	26	8,67
6	261	17	3	4	1	0	39	13
7	275	19	3	0	0	0	25	8,34

Tabela A₁₃ - Controle positivo – formol 0,1%

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	279	13	6	2	0	0	31	10,34
2	278	16	2	4	0	0	32	10,67
3	283	10	2	1	0	0	17	5,67
4	290	4	3	0	0	0	10	3,34

Tabela A₁₄ - Amostra 10393 – Solo de Ribeirão do Campo

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	270	13	5	1	1	0	30	10
2	228	27	15	5	0	0	72	24
3	246	27	9	3	0	0	54	18
4	236	25	10	5	1	1	64	21,34
5	238	19	12	5	1	0	62	21
6	244	21	11	4	0	0	56	19

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	235	20	7	6	2	1	65	21,67
2	240	18	15	4	0	0	60	20
3	278	10	2	1	0	1	22	7,34
4	269	20	4	1	0	0	31	10,34
5	247	21	7	6	0	0	53	17,67
6	272	17	4	3	0	0	28	9,34
7	281	14	1	1	0	0	19	6,34

Tabela A₁₆ - Amostra 10468 – ETE de PCJ-1

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	246	27	4	5	1	0	54	18
2	223	20	15	4	0	1	67	22,34
3	266	19	6	1	0	0	34	11,34
4	259	14	10	0	1	0	41	13,67
5	267	11	7	3	0	0	33	11
6	269	13	6	2	0	0	31	10,34
7	269	11	5	2	1	0	31	10,34

Tabela A₁₇ - Amostra 10393 - Solo de Ribeirão do Campo (repetição)

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	262	20	6	2	0	0	38	12,67
2	266	24	5	0	0	0	34	11,34
3	280	6	7	0	0	0	20	6,67
4	267	18	6	3	0	0	33	11
5	274	14	3	2	0	0	26	8,64
6	252	20	11	3	0	0	48	16
7	253	17	8	0	1	2	47	15,67
8	277	17	3	0	0	0	23	7,67
9	271	5	3	2	2	0	29	9,67

Tabela A₁₈ – Amostra 10394 – Solo de Boracéia (repetição)

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	269	11	5	3	1	0	31	10,34
2	256	21	6	2	0	1	44	14,67
3	283	10	2	1	0	0	17	5,67
4	271	16	5	1	0	0	29	9,67
5	252	22	8	2	1	0	48	16
6	242	15	9	3	4	0	58	19,34
7	244	25	6	5	1	0	56	18,67

Tabela A₁₈ - Amostra 10468 – ETE de PCJ-1 (repetição)

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	252	19	7	2	1	1	48	16
2	245	20	12	0	3	0	55	18,34
3	239	24	9	5	1	0	61	20,34
4	257	19	6	4	0	0	43	14,34
5	247	25	5	3	1	1	53	17,67
6	244	15	8	5	0	2	56	18,67
7	248	14	15	1	0	1	52	17,34

Resultados dos testes realizados com substâncias mutagênicas e fontes diferentes de água (abril de 2005)

Tabela A₁₉ - Controle Negativo - Água Ultra Pura

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	283	7	5	0	0	0	17	5,67
2	287	6	2	1	0	0	13	4,34
3	281	8	4	1	1	0	19	6,34
4	278	13	3	1	0	0	22	7,34
5	295	3	1	0	0	0	5	1,67
6	281	12	2	1	0	0	19	6,34
7	276	11	2	0	1	1	24	8
8	287	13	1	0	0	0	15	5

Tabela A₂₀ - Controle Negativo - Água Destilada

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	280	12	4	0	0	0	20	6,67
2	265	17	6	2	0	0	35	11,67
3	285	8	2	1	0	0	15	5
4	280	14	3	0	0	0	20	6,67
5	268	17	5	0	0	0	32	10,68
6	276	10	4	2	0	0	24	8

Tabela A₂₁ - Água Mineral (Minalba)

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	276	14	2	2	0	0	24	8
2	284	10	3	0	0	0	16	5,34
3	286	5	3	1	0	0	14	4,67
4	276	11	4	0	1	0	24	8
5	278	6	5	2	0	0	22	7,34
6	284	7	5	0	1	0	16	5,34
7	273	12	3	3	0	0	27	9
8	281	7	3	2	0	0	19	6,34

Tabela A₂₂ - Controle Negativo - Água de Torneira

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1		7	2	0	0	0	11/300	3,67
2		2	3	1	1	0	15/300	5,00
3		6	2	1	0	0	11/300	3,67
4		2	4	0	0	1	18/300	6,00
5		11	1	0	0	0	15/300	5,00
6		11	7	1	0	0	18/300	6,00
7		5	1	1	0	0	13/300	4,34
8		8	1	1	0	0	15/300	5,00
9		4	1	0	1	0	10/300	3,34

Tabela A₂₃ - Controle Negativo - solução de Hoagland

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	285	6	3	1	0	0	15/300	5
2	292	6	1	0	0	0	8/300	2,67
3	287	3	5	0	0	0	13/300	4,34
4	283	7	5	0	0	0	17/300	5,67
5	289	7	2	0	0	0	11/300	3,67
6	283	2	7	1	0	0	19/300	6,34
7	283	9	4	0	0	0	17/300	5,67

Tabela A₂₄ – Etil Metano Sulfonato (E M S) 0,8 mM

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	274	7	7	1	0	0	26	8,7
2	287	9	2	0	0	0	13	4,34
3	285	10	0	0	0	1	15	5
4	287	8	1	1	0	0	13	4,34
5	276	7	7	1	0	0	24	8
6	275	6	5	3	0	0	25	8,34
7	289	9	1	0	0	0	11	3,67
8	284	13	0	1	0	0	16	5,34

Tabela A₂₅ - Controle positivo – formaldeído 0,1%

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	279	11	5	0	0	0	21	7
2	277	6	4	1	1	0	23	7,67
3	290	2	2	0	4	0	10	3,34
4	282	5	3	1	1	0	18	6
5	268	9	7	3	0	0	32	10,67

Tabela A₂₆ – E til Metano Sulfonato (E M S) 8,0mM

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	91	2	2	1	0	0	9/100	9
2	92	2	3	0	0	0	8/100	8
3	80	5	6	1	0	0	20/100	20
4	91	4	2	0	0	0	8/100	8

Tabela A₂₇ - Controle Positivo - Formaldeído 0,2%

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	260	9	10	1	2	0	40	13,34
2	291	9	0	0	0	0	9	3
3	292	4	2	0	0	0	8	2,67
4	288	2	2	2	0	0	12	4
5	286	10	2	0	0	0	14	4,67
6	223	6	9	10	2	3	77	25,67
7	256	7	7	3	1	2	44	14,67
8	259	19	7	1	0	1	41	13,67
9	253	22	7	1	2	0	47	15,67
10	259	15	5	2	0	2	41	13,67

Tabela A₂₈ - Controle Positivo – Trióxido de Arsênio

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	268	9	6	1	0	1	29/300	9,67
2	276	6	3	0	3	1	24/300	8,00
3	273	11	4	1	0	1	27/300	9,00
4	282	9	4	1	0	0	19/300	6,34
5	281	10	3	1	0	0	19/300	6,34

Resultados de testes realizados com amostra de lodo AT-2 (abril de 2005).

Tabela A₂₇ - Controle Negativo - Água Ultra Pura

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	291	4	1	1	0	0	9	3
2	289	3	4	0	0	0	11	3,67
3	279	6	2	1	0	1	21	7
4	279	14	2	1	0	0	21	7
5	285	10	1	1	0	0	15	5
6	284	11	1	1	0	0	16	5,34

Tabela A₂₈ - Controle Positivo - Formaldeído 0,1%

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	284	3	5	1	0	0	16	5,34
2	289	7	2	0	0	0	11	3,67
3	282	5	5	1	0	0	18	6
4	286	3	3	0	0	1	14	4,67
5	280	9	4	1	0	0	20	6,67
6	283	11	3	0	0	0	17	5,67
7	289	2	3	1	0	0	11	3,67
8	280	8	3	2	0	0	20	6,67

Tabela A₂₈ – Amostra 12400- ETE de AT-2

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	286	10	2	0	0	0	14	4,67
2	287	7	3	0	0	0	13	4,34
3	280	9	4	1	0	0	20	6,67
4	289	7	2	0	0	0	11	3,67
5	284	7	2	0	0	1	16	5,34
6	289	7	2	0	0	0	11	3,67
7	284	7	3	1	0	0	16	5,34
8	288	12	0	0	0	0	12	4
9	281	10	3	1	0	0	19	6,34
10	285	8	2	1	0	0	15	5

Resultados da comparação entre água de torneira e solução de hoagland com o clone 4430 e *T. pallida*.

Tabela A₃₀ – três dias em água de torneira – clone 4430

N de inflorescência	N de micronúcleos por tétrades					N/300	%
	0	1	2	3	4		
1	288	2	3	0	1	12/300	4,00
2	292	2	3	0	0	8/300	2,67
3	285	10	1	1	0	15/300	5,00
4	289	4	2	1	0	11/300	3,67
5	281	9	2	2	0	19/300	6,34
6	279	5	2	4	0	21/300	7
7	282	5	5	1	0	18/300	6

Tabela A₃₁ – três dias em água de torneira – *T. pallida*

N de inflorescência	N de micronúcleos por tétrades					N/300	%
	0	1	2	3	4		
1		10	3	0	0	16/300	5,33
2		8	5	0	0	18/300	6
3		2	0	1	2	13/300	4,33
4		13	1	0	0	15/300	5
5		7	4	1	0	18/300	6
6		3	5	1	0	17/300	5,67
7		5	6	3	0	26/300	8,67
8		10	4	0	0	18/300	6
9		8	7	1	0	25/300	8,34
10		3	3	0	0	9/300	3
11		8	1	1	0	13/300	4,34
12		10	5	0	1	24/300	8
13		8	2	0	0	12/300	4
14		9	6	2	0	27/300	9

Tabela A₃₂ - 3dias com solução de Hoagland - clone 4430

N de inflorescência	N de micronúcleos por tétrades					N/300	%
	0	1	2	3	4		
1	288	5	2	1	0	12/300	4
2	291	5	2	0	0	9/300	3
3	289	6	1	1	0	11/300	3,67
4	283	10	2	1	0	17/300	5,67
5	281	5	5	0	1	19/300	6,34
6	288	4	3	2	0	12/300	4
7	281	5	4	2	0	19/300	6,34
8	281	8	5	1	0	19/300	6,34
9	291	5	2	2	0	15/300	5
10	283	10	2	1	0	17/300	5,67
11	284	7	3	1	0	16/300	5,34

Tabela A₃₃ - 3dias com solução de Hoagland - *T. pallida*

N de inflorescência	N de micronúcleos por tétrades					N/300	%
	0	1	2	3	4		
1	285	6	3	1	0	15/300	5
2	292	6	1	0	0	8/300	2,67
3	287	3	5	0	0	13/300	4,34
4	276	8	5	2	0	24/300	8
5	275	9	7	1	0	25/300	8,33
6	283	7	5	0	0	17/300	5,67
7	274	11	6	1	0	26/300	8.67
8	289	7	2	0	0	11/300	3.67
9	283	2	7	1	0	19/300	6.34
10	283	9	4	0	0	17/300	5.67
11	273	9	4	2	1	27/300	9.0

Resultados dos testes realizados em Abril de 2006, com hastes florais de *Tradescantia pallida* coletadas na **CETESB**. O ensaio foi realizado em câmara fechada com Temperatura e Umidade Relativa controladas. ($t=25\pm 2$ °C e UR=81%).

Tabela A₃₄ - Controle Negativo – Solução de Hoagland

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1		8	1	0	0	0	10/300	3,34
2		7	1	1	0	0	12/300	4,00
3		9	3	2	0	0	21/300	7,00
4		10	4	1	0	0	21/300	7,00
5		6	4	0	0	1	19/300	6,3

Tabela A₃₅ - Controle Positivo – Trióxido de Arsênio 5mM

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	268	8	8	1	0	1	32/300	10,67
2	276	6	3	0	3	1	24/300	8,00
3	273	11	4	1	0	1	27/300	9,00
4	282	9	3	1	0	0	18/300	6,00
5	281	10	3	1	0	0	19/300	6,34

Tabela A₃₆ - Amostra 8338 – ETE de PCJ-2

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	271	11	4	2	1	0	29/300	9,67
2	287	9	2	0	0	0	13/300	4,34
3	283	7	5	0	0	0	17/300	5,67
4	270	10	5	2	1	0	30/300	10,00
5	270	11	5	3	0	0	30/300	10,00
6	282	8	2	2	0	0	18/300	6,00

Tabela A₃₇ - Amostra 8339 – ETE de PCJ-1

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	286	7	1	0	1	0	14/300	4,67
2	274	8	5	1	0	1	26/300	8,67
3	285	10	1	1	0	0	15/300	5
4	266	9	7	2	0	1	34/300	11,34
5	285	11	2	0	0	0	15/300	5

Tabela A₃₈ - Amostra 8340 – ETE de AT-1

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrade						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	287	13	0	0	0	0	13/300	4,34
2	277	7	8	0	0	0	23/300	7,67
3	281	9	5	0	0	0	19/300	6,34
4	268	10	8	2	0	0	32/300	10,67
5	282	6	6	0	0	0	18/300	6
6	284	8	4	0	0	0	16/300	5,34

Tabela A₃₉ - Amostra 8342 – ETE de SG

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrade						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	289	8	0	1	0	0	11/300	3,67
2	292	3	1	1	0	0	8/300	2,67
3	287	9	2	0	0	0	13/300	4,34
4	283	3	3	1	0	0	17/300	5,67
5	290	4	3	0	0	0	10/300	3,34

Tabela A₄₀ - Amostra 8341 - ETE de AT-2

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrade						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	277	9	2	2	1	0	23/300	7,67
2	271	6	9	0	0	1	29/300	9,67
3	288	8	2	0	0	0	12/300	4
4	285	8	2	1	0	0	15/300	5
5	289	6	1	1	0	0	11/300	3,67
6	288	3	3	1	0	0	12/300	4

Tabela A₄₁ - Controle Negativo - Água Destilada (repetição)

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrade						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	274	10	5	3	0	0	26	8,67
2	286	5	3	1	0	0	14	4,67
3	266	12	6	2	1	0	34	11,34
4	291	4	1	1	0	0	9	3
5	281	11	1	2	0	0	19	6,34
6	287	9	2	0	0	0	13	4,34

Resultados dos testes realizados em 2006: lodo + solo + plantas de Clone 4430 e *T. pallida*.
Período de cultivo: fevereiro a maio de 2006.

Tabela A₄₇ - Controle negativo do solo – *T. pallida*

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	286	9	1	1	0	0	14/300	4,7
2	283	7	3	1	0	0	17/300	5,7
3	288	7	2	0	0	0	12/300	4,00
4	283	7	3	1	0	0	17/300	5,7
5	279	13	4	0	0	0	21/300	7,00

Tabela A₄₉ - Controle negativo do solo – Clone 4430

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	279	7	7	0	0	0	21/300	7,00
2	282	5	5	1	0	0	18/300	6,00
3	289	4	2	1	0	0	11/300	3,67
4	283	10	2	1	0	0	17/300	5,67
5	288	8	2	0		0	12/300	4,00

Tabela A₅₀ - ETE de PCJ-2 – solo + 10% de lodo + Clone 4430

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	289	6	1	1	0	0	11/300	3,67
2	278	3	2	2	1	1	22/300	7,34
3	286	6	2	0	1	0	14/300	4,67
4	287	2	4	1	0	0	13/300	4,34
5	284	7	3	1	0	0	16/300	5,34

Tabela A₅₁ - ETE de PCJ-2 – solo + 10% de lodo + *T. pallida*

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	286	9	1	1	0	0	14/300	4,67
2	286	10	2	0	0	0	14/300	4,67
3	275	6	1	5	0	0	25/300	8,34
4	282	10	4	0	0	0	18/300	6
5	291	5	2	0	0	0	9/300	3
6	289	3	1	2	0	0	11/300	3,67
7	285	5	5	0	0	0	15/300	5
8	279	5	4	2	2	0	21/300	7
9	284	12	2	0	0	0	16/300	5,34
10	289	5	3	0	0	0	11/300	3,67

Tabela A₅₂ - ETE de PCJ-2 – solo + 25% de lodo + Clone 4430

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	280	6	4	2	0	0	20/300	6,67
2	287	2	2	1	1	0	13/300	4,34
3	287	5	2	0	1	0	13/300	4,34
4	285	2	5	1	0	0	15/300	5,00

Tabela A₅₃ - ETE de PCJ-2 – solo + 25% de lodo + *T. pallida*

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	289	9	1	0	0	0	11/300	3,67
2	284	6	2	2	0	0	16/300	5,34
3	288	4	4	0	0	0	12/300	4
4	292	2	3	0	0	0	8/300	2,67
5	284	7	3	1	0	0	16/300	5,34
6	282	9	3	1	0	0	18/300	6
7	292	5	0	1	0	0	8/300	2,67
8	293	3	2	0	0	0	7/300	2,34
9	286	4	5	0	0	0	14/300	4,67

Tabela A₅₄ - ETE de PCJ-2 – solo + 50% de lodo + Clone 4430

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	290	6	2	0	0		10/300	3,34
2	290	4	3	0	0	0	10/300	3,34
3	290	6	4	0	0	0	10/300	3,34
4	287	9	2	0	0	0	13/300	4,34
5	282	5	5	1	0	0	18/300	6,00

Tabela A₅₅ - ETE de PCJ-2 – solo + 50% de lodo + *T. pallida*

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	284	14	2	0	0	0	16/300	5,34
2	278	13	3	1	0	0	22/300	7,34
3	288	5	2	1	0	0	12/300	4
4	281	5	4	2	0	0	19/300	6,34
5	285	5	5	0	0	0	15/300	5
6	284	6	5	0	0	0	16/300	5,34
7	286	3	4	1	0	0	14/300	4,67
8	290	6	2	0	0	0	10/300	3,34
9	287	7	3	0	0	0	13/300	4,34
10	286	6	4	0	0		14/300	4,67

Tabela A₅₆ – Amostra ETE de AT-1 – solo + 10% de lodo + Clone 4430

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	295	3	1	0	0	0	5/300	1,67
2	293	5	1	0	0	0	7/300	2,34
3	292	2	2	0	0	0	8/300	2,67
4	289	3	2	0	1	0	11/300	3,67
5	292	6	1	0	0	0	8/300	2,67

Obs. Dificuldade em encontrar inflorescências com tétrades jovens.

Tabela A₅₇ - ETE de AT-1 – solo + 10% de lodo + *T. pallida*

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	292	4	2	0	0	0	8/300	2,67
2	279	9	6	0	0	0	21/300	7,00
3	278	11	4	1	0	0	22/300	7,34
4	280	8	6	0	0	0	20/300	6,67
5	280	8	4	0	0	0	20/300	6,67
6	283	7	5	0	0	0	17/300	5,67
7	271	15	7	0	0	0	29/300	9,67

Obs. Algumas células com o núcleo alterado, volume maior que o normal.

Tabela A₅₈ - ETE de AT-1 – solo + 25% de lodo + Clone 4430

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	296	4	0	0	0	0	4/300	1,34
2	294	4	1	0	0	0	6/300	2
3	292	6	1	0	0	0	8/300	2,67
4	291	1	1	2	0	0	9/300	3

Tabela A₅₉ - ETE de AT-1 – solo + 25% de lodo + *T. pallida*

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	259	11	12	2	0	0	41/300	13,67
2	263	14	7	3	0	0	37/300	12,34
3	251	14	13	3	0	0	49/300	16,34
4	247	17	14	1	0	1	53/300	17,67
5	280	14	3	0	0	0	20/300	6,67

Tabela A₆₀ - ETE de AT-1 – solo + 50% de lodo + Clone 4430

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	286	5	3	1	0	0	14/300	4,67
2	287	7	3	0	0	0	13/300	4,34
3	288	4	1	2	0	0	12/300	4
4	280	5	5	0	1	0	20/300	6,67
5	295	5	0	0	0	0	5/300	1,67

Obs. Dificuldade em encontrar inflorescências com tétrades jovens, algumas apresentaram o núcleo alterado, com o volume nuclear expandido.

Tabela A₆₁ - ETE de AT-1 – solo + 50% de lodo + *T. pallida*

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	280	9	4	1	0	0	20/300	6,67
2	278	7	6	1	0	0	22/300	7,34
3	285	9	3	0	0	0	15/300	5
4	281	7	6	0	0	0	19/300	6,34

Tabela A₆₂ - ETE de AT-2 – solo + 10% de lodo + clone 4430

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	283	5	3	2	0	0	17/300	5,67
2	283	7	5	0	0	0	17/300	5,67
3	285	8	2	1	0	0	15/300	5
4	290	2	2	0	1	0	10/300	3,34
5	284	4	3	2	0	0	16/300	5,34

Tabela A₆₃ - ETE de AT-2– 10% de lodo - *T. pallida*

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	274	12	7	0	0	0	26/300	8,67
2	276	13	4	1	0	0	24/300	8
3	265	11	12	1	0	0	35/300	11,67
4	273	15	6	0	0	0	27/300	9
5	271	15	7	0	0	0	29/300	9,67
6	266	11	10	1	0	0	34/300	11,34

Obs. Algumas tétrades apresentaram material nuclear com volume alterado.

Tabela A₆₄ - ETE de AT-2 – 25% de lodo – . Clone 4430

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	275	9	5	2	0	0	25/300	8,34
2	279	8	5	2	0	0	21/300	7
3	277	10	3	0	0	0	23/300	7,67
4	281	10	2	1	0	0	19/300	5,67
5	289	7	2	0	0	0	11/300	3,67

Obs. Algumas tétrades com o núcleo alterado, grande e expandido.

Tabela A₆₅ - ETE de AT-2 - 25% de lodo – *T. pallida*

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	192	7	0	0	0	0	8/200	4
2	190	8	1	0	0	0	10/200	5
3	255	19	11	0	1	0	45/300	15
4	190	6	4	0	0	0	10/200	5
5	251	21	11	2	0	0	49/300	16,34
6	84	8	4	2	0	0	16/100	16
7	91	5	2	0	0	0	9/100	9

Obs. Apesar das tétrades encontrarem-se na fase jovem , os núcleos de algumas encontravam-se com o volume do material nuclear alterado material.

Tabela A₆₆ - ETE de AT-2 - solo + 50% de lodo + Clone 4430

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	94	4	1	0	0	0	6/100	6
2	87	7	3	0	0	0	13/100	13
3	288	6	3	0	0	0	12/300	4
4	273	11	2	0	3	0	27/300	9
5	284	6	2	2	0	0	16/300	5,34

Obs. Algumas tétrades como volume do material nuclear alterado.

Tabela A₆₇ - ETE de AT-2 – solo + 50% de lodo + *T. pallida*

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	247	10	12	2	2	1	53/300	17,67
2	264	7	13	1	0	0	36/300	12
3	260	17	2	2	0	1	32/300	10,67
4	267	11	11	0	0	0	33/300	11
5	274	16	3	0	1	0	26/300	8,67

Tabela A₆₈ - ETE de PCJ-1- solo + 10 %de lodo + clone 4430

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	282	2	3	2	1	0	18/300	6
2	289	3	2	0	1	0	11/300	3,67

Obs. Alterações celulares que inviabilizaram a leitura das Tétrades.

Tabela A₆₉ - ETE de PCJ-1 – solo + 10 % de lodo + *T. pallida*

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	236	16	12	4	3	0	64/300	21,34
2	259	19	8	2	0	0	41/300	13,67
3	269	9	11	0	0	0	31/300	10,34
4	251	17	10	4	0	0	49/300	16,34
5	260	20	10	0	0	0	40/300	13,34
6	252	17	6	5	1	0	48/300	16
7	276	6	9	0	0	0	24/200	12

Tabela A₇₀ - ETE de PCJ-1 – solo + 25 % de lodo + clone 4430

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	275	4	1	2	3	0	25/300	8,34
2	281	1	4	2	1	0	19/300	6,34
3	186	3	2	1	1	0	14/200	7
4	258	10	8	4	1	0	42/300	14
5	284	4	3	2	0	0	16/300	5,34

Tabela A₇₁ - ETE de PCJ-1 – solo + 25 % de lodo + *T. pallida*

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	241	12	5	0	0	0	22/263	7,34
2	141	5	2	0	0	0	9/150	6
3	278	10	6	0	0	0	22/300	7,34
4	193	7	4	0	0	0	15/208	7,21
5	183	7	5	0	0	0	17/200	8,5

Obs. Alterações celulares que inviabilizaram a leitura de micronúcleos.

Tabela A₇₂ - ETE de PCJ-1 – solo + 50% de lodo + clone 4430

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	209	11	4	0	0	0	21/230	9,13
2	85	3	3	1	0	0	15/100	15
3	78	8	1	3	1	1	28/106	26,4

Obs. Alterações celulares que inviabilizaram a leitura de micronúcleos.

Tabela A₇₃ - ETE de PCJ-1 – solo + 50% de lodo + *T. pallida*

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	255	15	12	2	0	0	45/300	15
2	209	11	10	0	0	0	21/230	9,13
3	88	3	3	1	0	0	12/100	15
4	224	10	6	2	0	0	26/250	10,4
5	264	10	8	2	1	0	36/300	12
6	85	3	3	1	0	0	15/100	15

Obs. Alterações celulares que inviabilizaram a leitura de micronúcleos.

Resultado do controle positivo após três meses (primeira diluição).

Tabela A₇₅ - Controle positivo do solo (MIX de HPAs) – *T. pallida*

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1		16	6	5	0	0	43/300	14,34
2		18	8	0	0	0	34/300	11,34
3		9	8	1	1	0	32/300	10,67
4		8	7	1	1	0	29/300	9,67
5		6	3	1	2	0	23/300	7,67
6		10	3	2	0	0	32/300	10,67

Tabela A₇₆ - controle negativo (substrato) - *T. pallida*

Nº de Lâminas	Nº de MN por Tétrades						N/300	%
	0	1	2	3	4	5		
1	282	7	4	1	0	0	18	6,00
2	290	1	2	0	1	0	10	3,34
3	296	2	1	0	0	0	4	1,34
4	290	5	1	1	0	0	10	3,34
5	288	3	3	0	0	0	12	4,00
6	289	2	2	1	1	0	11	3,67
7	287	9	5	0	1	0	23	7,67

8. REFERÊNCIAS

Adreoli C V, Sperling M V, Fernandes F. Lodo de Esgotos: tratamento e disposição final. Companhia de Saneamento do Paraná. 2001,484p.

Alves E S, Souza S R, Pedroso A N V, Domingos M. Potencial of the Trad-MN assay applied with inflorescences of *Tradescantia pallida* ‘purpurea’ for evaluating air contamination by naphthalene. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2007, doi: 10.1016/j. eco env..2007.09.006.

Alves E S, Giusti P M, Domingos M, Saldiva P H N, Guimaraes E T, Lobo D J. Estudo anatômico foliar do Clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. Rev. Brasil. Bot., 2001, v4 (suplemento), p. 567-576.

Araújo A S F, Monteiro R T R. Plant Bioassays to Assess Toxicity of Textile Sludge Compost. Sci. Agric. Piracicaba, Brazil, 2005, v.62, n.3, p. 286-290.

Bar-Yosef B, Kafkafi U, Bresler E. Uptake of phosphorus by plants growing under field conditions. Theoretical model and experimental determination of its parameters. Soil Sci, 1972, v36, p. 783-800.

Batalha E T, Guimaraes E T, Lobo D J, Lichtenfels J F C, Deur T, Carvalho H A, Alves E, Domingos M, Rodrigues G S, Saldiva P H N. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1999, v. 426, n.2, 229-32.

Brasil. CETESB – Companhia Tecnológica de Saneamento ambiental. Aplicação de Lodos de Sistemas de Tratamento Biológicos em Áreas Agrícolas – Critérios para Projeto e Operação. Norma Técnica P 4.230. São Paulo, Br, 1999. v. 33.

Brasil. Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo. Plano Estadual de Recursos Hídricos 2004-2007 – Resumo III. São Paulo: DAEE, 2006. Disponível em <http://www.daee.sp.gov.br/acervoepesquisa/perh20042007.htm> acessado em fevereiro de 2007.

Brasil. Resolução CONAMA Nº 375/2006, "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" - Data da legislação: 29/08/2006 - Publicação DOU: 30/08/2006.

Cabrera G L, Rodriguez D M G. Genotoxicity of the extracts from the compost of the organic and the total municipal garbage using three plant bioassays. Mutation Research, 1999, v.426, p. 201-06.

Carreras H A, Pignata M L, Saldiva P H N. In situ monitoring of urban air in Córdoba, Argentina using the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MN) bioassay. Atmospheric Environmental, 2006, Vol. 40. pg 7824-30.

Carvalho-Oliveira R, Pozo R M K, Lobo D J .A, Lichtenfels A J F, and Saldiva P H N. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil. Environmental Research, 2005, vol. 98. pg 1-7.

Chenon P, Gauthier L, Loubieres P, Severac A, Deltoux M. Evaluation of the xenotoxic and teratogenic potential of a municipal sludge and sludge-amended soil using the amphibian: *Xenopus laevis* and the tobacco: *Nicotiana tabacum* L. var. xanthi Dulieu. The Science of the Total Environment, 2003, v. 301, p. 139-50.

Cotelle S, Masfaraud JF. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. Mutation research, 1999, v 426: 167-71.

Crebelli R, Conti L, Monarca S, Feretti D, Zerbini I, Zani C, Veschetti E, Cutilli D, Ottaviani M. Toxicity of the disinfection by-products resulting from peracetic acid- or hypochlorite-disinfected sewage wastewater. *Water Research*, 2005, v. 39, p. 1105-13.

Dearfield K L, Cimino MC, Mccarroll N E. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Res*, 1998, v 410, 237-43.

Fernandes F, Silva S M C P, Soccol V T, Morita D M. Principais contaminantes do solo. *In: lodo de esgotos: tratamento e disposição final*. Companhia de Saneamento do Paraná. 2001, Cap. 3, p 69-119.

Fomim A, Paschke A, Arndt U. Assessment of genotoxicity of mine-dump material using the *Tradescantia*-stamen hair (trad-SHM) and the *Tradescantia*-micronucleus (trad-MN) bioassays. *Mutation Research*, 1999, v.426, p. 171-81.

Gill B S, Sandhu S S. Application of the *Tradescantia* micronucleus assay for the genetic evaluation of chemical mixtures in soil and aqueous media. *Mutation Research*, 1992, v 270, p. 65-9.

Guimaraes ET, Domingos M, Alves ES, Cladini N, Saldiva P H N. Detection of the Genotoxic potential of air pollution in the city of São Paulo (Brazil) with *Tradescantia pallida* using Tradescantia micronucleus assay (Trad-MN). *Environ. Exp. Botany*, 2000, v. 44, p 1-8.

Grover IS, Satwinderjeet K. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutation Research*. 1999, v. 426, p. 183-188.

Harrington Jr W M. Hazardous Solid Waste from Domestic Wastewater Treatment Plants *Environ. Health Persp.* Dec 1978, v27, p. 231-37.

Helma C, Mersch-Sundermann V, Houk V S, Keil C, Knasmuller S. Comparative evaluation of four bacterial assays for the detection of genotoxic effects in the dissolved water phases of aqueous matrices. *Environ. Sci. Technol.* 1996, v. 30, 897-907.

Hoagland D R, Arnon D I. The water-culture method for growing plants without soil. Univ. Calif. Agric. Exp. Stn., Berkeley, CA, 1950, Circular No. 347: 1-39.

Hooda PS, Alloway BJ. The effect of liming on heavy metal concentrations in heat, carrots and spinach grown on previously sludge applied soils. *Journal of Agricultural Science*, 1996, v. 127, p. 289-94.

Hopke P K, Plewa M J, Johnston J B, Weaver D, Wood S G, Larson R A, Hinesly T. Multitechnique screening of Chicago municipal sewage sludge for mutagenic activity. *Environ. Sci. and Tech.* 1982, v. 16, p. 140-147.

Jolibois B, B M. Guebert B M, Efficacy of two wastewater treatment plants in removing genotoxins. *Arq. Environ. Contam. Tox.* 2005, v. 48, p. 289-95.

Klumpp A, Ansel W, Fomim A, Schnirring S, Pickl C. Influence of climatic conditions on the mutations in pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and implications for the Trad-MN bioassay protocol. *Hereditas*, 2004, 141: 142-148.

Knasmuller S. Genotoxic effects of Heavy Metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 1998, 31:183-191.

Majer B J, Tscherko D, Paschke A, Wennrick R, Kundi M, Kandeler E, Knasmuller S. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and microbial enzyme activities: a comparative investigation. *Mutation Research*, 2002, v 515: 111-24.

Machado A C F E. Avaliação da viabilidade de utilização da *T. pallida* cv Purpúrea no biomonitoramento de fontes estacionárias de contaminação atmosférica (tese). São Paulo. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo. 2008.

Ma TH. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. *Mutation Research*, 1999, v. 426: 103-06.

Ma TH, Cabrera GL, Chen R, Gill BS, Sandhu S S, Salamone MF. *Tradescantia* Micronucleus Bioassay . *Mutation Research*, 1994, v. 310, p. 221- 30.

Ma TH. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. *Environmental Health Perspective*, 1992, v. 37, 85-90.

Ma T H, Harris M M, Anderson VA, Ahmed I, Mohammad D K, Bare JL, Lin G. *Tradescantia* micronucleus (trad-MN) tests on 140 health-related agents. *Mutat. Res.* 1984, Nov-Dec; 138(2-3): 157-67.

Ma TH. *Tradescantia* Micronucleus Bioassay and Pollen Tube chromatid Aberration Test for un Situ Monitoring and Mutagen Screening. *Environmental Health*, 1981, v. 37, p.85-9.

Ma TH, Sparrow A H, Nauman A F. Effect of 1,2-dibromoethane (DBE) on meiotic chromosomes of *Tradescantia*. *Mutation Research*, 1978, v. 58, p. 251-58.

Mathews JE, Hastings L, Evaluation of Toxicity Test Procedure for Screening Treatability Potencial of Waste in Soil. *Toxicity Assessment: An International Quarterly*, 1997, v. 2, p. 265-81.

Monarca S, Feretti D. Monitoring of mutagens in urban air samples. *Mutation Research/Fund. and Molec. Mech. of mut.*, 1999, v. 426(2), p. 189-92.

Moraes DSL, Jordão B.Q, Oliveira M D., Eilers V. Investigação da atividade mutagênica de efluente municipal pelo teste de *Allium*. Resumos do 48º Congresso Nacional de Genética – CDROM. 2002.

Nature. Raking through sludge exposes a stink. Jeff Tollefson. v453/15. May 2008. p. 262-3.

Nye P H, Tinker P B. Solute Movement in the Soil-Root System. University of California Press, Berkeley. In Fisiologia Vegetal. Lincoln Taiz e Eduardo Zeiger. 3ª Ed., Ed. Arimed, 2004.

Pick C, Fomim A, Pascheke A. Use of *Tradescantia*-bioassays to detect the genotoxicity of pH-unmodified environmental samples. Mutation Research/ Fund. and Molec. Mech. of mut.. 1997, v. 379, p 158.

Plewa M, Maluszynska J. Bioassays in plant cells - for improvement of ecosystem and human health. A course manual. Austria; 2003.

Rank J, Nielsen, MH. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. Mutation Research. 1998, v. 418, p. 113-9.

Rodrigues GS, Ma TH, Pimentel D, Weintein LN. *Tradescantia* bioassay monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. Critical Review in Plant Sciences, 1997, v. 16, p. 325-59.

Sanchez P S, Sato M I Z, Paschoal C M R B, Alves M N, Fulan E V, Martim M T. Toxicity assessment of industrial effluents from São Paulo State, Brazil, using short term microbial assays. Toxicity Assessment, 1988, 3, 55-80.

Sandhu S S. Utility of genetic indicators for monitoring ecological condition. Mutation Research, 2001, 483, suppl. 1E-5, p. 12.

Sant'Anna E T G. Poluição atmosférica urbana na cidade de São Paulo e mutagênese: avaliação de risco utilizando-se bioindicadores vegetais do gênero *Tradescantia* (tese) . São Paulo. Faculdade de Medicina , Universidade de São Paulo. 2003.

Santos I T Q P. Avaliação da atividade clastogênico do resíduo catalítico industrial, por meio do bioensaio de micronúcleos com *Tradescantia pallida* c.v. purpurea (tese). São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2004.

Shima N, Xiao LZ, Sakuramoto F, Ichikawas A S. Young inflorescence bearing shoots with roots of *Tradescantia* clone BNL 4430 cultivated in nutrient solution circulating systems: an alternative to potted plants and cutting for mutagenicity tests. *Mutation Research*, 1997, v. 395, p. 199-208.

Silva J, Fonseca M B. Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana. *In*: Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP (org.). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance. 2003, p. 70-84.

Souza VHE, Soares CHL, Cantagalli LB, Vicentin, VEP. Utilização de testes citogenéticos para avaliação de mutagênese ambiental. Consulta 28/01/2008. [www.google.com.br /PDF](http://www.google.com.br/PDF).

Srivastava R, Kumar D, Gupta SK. Bioremediation of municipal sludge by vermithechnology and toxicity assessment by *Allium cepa*. *Bioresource Technology*. 2005, v. 96, p. 1867-71.

Steinkellner H, Munsik K, Helma C, Ecker CS, Ma TH, Kundi M, Knasmuller S. Genotoxic effects of Heavy Metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 1998, v. 31, p. 183-91.

Sumita, N.M. *Tradescantia pallida* c.v. *Purpurea* Boom na caracterização da poluição atmosférica com acúmulo de elementos traços (tese). São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 2003.

Suyama F, Guimarães ET, Lobo DJA, Saldiva PHN. Pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallida* v. *purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effects of x-rays. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2002, v. 35, p.127-29.

Taiz L, Zeiger E. Fisiologia Vegetal. 3ª edição. Porto Alegre: Arimed; 2004.

White P A, Claxton L D. Mutagens in contaminated soil: a review. Mutat. Res. 2004, v. 569, p. 227-345.

Vanzo JE, Macedo L.S, Tsutya MT. ETE de Franca: uma estação que além de tratar os esgotos, produz insumos agrícolas. ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2001, p. 1-14.

9. Bibliografia Consultada

Neter J, Kutner M H, Natchtsheim C J, Wasseman W. 1996. Applied Linear Statistical Models. Chicago, 1996, 4 ed.

Rodrigues G S. Bioensaios de toxicidade genética com plantas superiores *Tradescantia* (MN e SHM), milho e soja. EMBRAPA Meio Ambiente. Jaguariúna, 1999, .30 p.

Rodrigues GE, Campos J M S. Análise de Mutagenicidade em lodo de esgoto. Consulta em 26/11/2006. www.sbmcta.org.br/workshop-plant/Download-br/S01.pdf.

Saldiva PNH, Bohn G.M. Animal indicator of adverse effects associated with air pollution. **Ecos. Health.**, 1998, v. 4, p.230-35.