PAULA REGINA PEREIRA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E CANCERÍGENO DO
LODO DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO (LETE) EM
SISTEMAS EXPERIMENTAIS *IN VIVO***

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

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

**São Paulo
2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Paula Regina Pereira

Avaliação do potencial genotóxico e cancerígeno do lodo de estação de tratamento de esgoto (LETE) em sistemas experimentais *in vivo* / Paula Regina Pereira Silva. -- São Paulo, 2009.

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

Área de concentração: Patologia.

Orientador: João Lauro Viana de Camargo.

Co-orientador: Paulo Hilário Nascimento Saldiva.

Descritores: 1.Águas residuárias 2.Ratos Wistar 3.Camundongos
4.Dietilnitrosamina 5.1,2 Dimetilhidrazina 6.Metilnitrosouréia 7.Testes de
mutagenicidade 8.Testes de carcinogenicidade

USP/FM/SBD-141/09

Dedicatórias

Agradeço a Deus pela oportunidade de trilhar vários caminhos até a conclusão deste trabalho, mais principalmente pela proteção e a direção diante de tantos desafios.

“Entrega o teu caminho ao Senhor, confia Nele, e o mais Ele fará.” Salmo 37:5

Aos meus pais José e Tereza que, ao dedicarem seu tempo para educar-me, ensinaram-me a verdadeira essência da vida, o amor próprio e ao meu próximo.

“Que Deus te faça ver que no sorriso de uma criança mora toda a esperança que tanto precisas pra viver.” (Desconhecido)

Às minhas irmãs Darilene, Ray, Raquel e meu irmão José Filho (Zezinho), os cunhados Paulo e Ivan e minha cunhada Célia que, de forma direta ou indireta, apoiaram-me para a realização deste trabalho e pelo carinho nos momentos difíceis.

“O temor do Senhor é o fundamento de toda verdadeira sabedoria.” (Ellen G. White)

Às minhas sobrinhas Alexia, Vitória, Nicolly, Emely e o sobrinho Vitor que me proporcionaram tantos momentos felizes.

“O sorriso de uma criança é um calmante sem efeitos secundários.”

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo pela sua motivação nos momentos de dificuldades e pela dedicação ao ensinar não apenas conhecimentos científicos, mas também a sua preocupação com o desenvolvimento humano.

“O carinho edifica alicerces da casa, a fim de que, mais tarde, as provas necessárias da vida possam chegar.” (Desconhecido)

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva que apesar das minhas limitações acreditou no meu potencial e me concedeu uma oportunidade única de descobrir que temos que lutar pelos nossos ideais.

“O coração do homem traça o seu caminho, mas o Senhor lhe dirige os passos.”
Provérbios 16:9

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Barbisan pela sua disposição e dedicação ao ensinar tantas coisas fundamentais para pesquisa.

“Trate a sabedoria como a sua irmã, e o entendimento, como o seu melhor amigo.” Provérbios 7:4 (BLH)

Ao grupo do lodo e todos que colaboraram nos sacrifícios dos animais pela dedicação durante todo o desenvolvimento dos projetos realizados e pela disposição de deixar o aconchego de suas camas chegando tão cedo no biotério.

“Passamos a amar não quando encontramos uma pessoa perfeita, mas quando aprendemos a ver perfeitamente uma pessoa imperfeita.” (Desconhecido)

À Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro e sua equipe pelo empenho para a realização deste projeto e pelas sugestões concedidas.

“Nunca será tarde para buscar um mundo melhor e novo, se no empenho pusermos coragem e esperança.” (Alfred Tennyson)

Aos amigos (as) que torceram pelo sucesso desse trabalho, que nos momentos mais difíceis me motivaram a continuar a minha jornada.

“Palavras agradáveis são como favo de mel: doces para a alma e medicina para o corpo.” Provérbios 16:24

Ao grupo União Adventista de Universitários (UAU) e à pastoral do Hospital Universitário-UNESP. Pela iniciativa de envolver as pessoas no bem estar do próximo e promoção do amor, fraternidade e construção de novas amizades.

“Em maior ou menor grau, a todos são confiados os talentos de seu Senhor. A capacidade espiritual, mental e física, a influência, posição, posses, afeições, simpatias, são todos preciosos talentos a serem usados na causa do Mestre, para a salvação de pessoas pelas quais Cristo morreu.” (Ellen G. White).

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira (**Iza**) - Bióloga do Depto. Patologia - UNESP - FMBo

À Profa. Dra. Maria Lúcia Dagli (**Malú**) - Chefe do Depto. de Patologia FMVZUSP/SP

Ao Dr. Heidge Fukumasu - Pós-Doutorando do Depto. de Ciência Básica - Faculdade de Ciência Animal e Engenharia dos Alimentos - USP/Pirassununga

À Profa. Dra. Katarina Takarashi - Chefe do Laboratório de Genética - USP/RP

À Dra. Raquel Santos - Pós-Doutoranda do Depto. de Genética e Nutrição - USP/RP

À Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha - Professora Assistente do Depto. de Patologia - FMVZ-UNESP/Botucatu

À Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues - Professora assistente do Depto. de Patologia-FMBo

Aos colegas do Laboratório de Poluição Atmosférica pelo apoio durante todo o período de desenvolvimento deste trabalho - FMUSP/SP

Às secretárias Liduvina, Márcia e Dalva do Depto. Patologia da FMUSP/SP, pela dedicação e atenção em todos os momentos que eu precisei.

Aos colegas do Laboratório Toxicam e do Depto. Patologia, FMBo que de uma forma direta ou indireta me apoiaram para a realização deste trabalho.

À secretária maravilhosa Cristina Dórico do Depto. Patologia da FMUNESP/Botucatu pelo carinho e pelos conselhos concedidos a mim durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Toxicam e Biotério Mara, Paulo e Paulo César pelas orientações e disposição de ajudar em todos os momentos - FMBo

À Dra. Liane Ziliotto pela paciência ao ensinar-me a ler focos de criptas abertantes

Ao estatístico Hélio Rubens Nunes - Grupo de Apoio à Pesquisa - GAP, FMBo

“O segredo do sucesso é fazer as coisas simples da vida com alegria e de um modo extraordinário.” (Desconhecido)

Este estudo recebeu o apoio financeiro das instituições:

FAPESP Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 06/50295-3 e 07/54427-4), Brasil.

FFM Fundação Faculdade de Medicina, São Paulo, Brasil.

TOXICAM Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana - Universidade Estadual Paulista - FMUNESP, Brasil.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. DMH.....	11
1.2. DEN.....	14
1.3. Hepatectomia Parcial (HP).....	15
1.4. Focos de Hepatócitos Alterados (FHA).....	16
2. OBJETIVOS.....	17
3. MÉTODOS.....	18
3.1. Animais e Ambiente de Experimentação	18
3.2. Identificação dos Animais	19
3.3. Preparo das Controles Positivos.....	19
3.4. Locais de Amostragem do Lodo	20
3.5. Preparo das Rações Experimentais Adicionadas com o LETE.....	23
3.6. Carcinogênese Química.....	25
3.7. Ensaio dos Focos de Criptas Aberrantes (FCA).....	26
3.7.1. Protocolo.....	26
3.8. Ensaio de Focos de Hepatócitos Alterados (FHA).....	29
3.8.1. Protocolo.....	29

3.9. Ensaio de Genotoxicidade e Mutagenicidade.....	33
3.9.1. Protocolo - Cometa.....	33
3.9.2. Protocolo - Micronúcleo.....	37
3.10. Análise Estatística.....	38
4. RESULTADOS.....	39
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÃO.....	58
7. ANEXOS.....	59
7.1. Determinações químicas de substâncias inorgânicas e outros parâmetros de caracterização do lodo de esgoto da ETE PCJ-1 e limites máximos segundo Resolução CONAMA 375 de 2006.....	59
7.2. Descrição da ETE Barueri 2008.....	60
8. REFERÊNCIAS.....	73
APÊNDICE	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ração misturada com o lodo, em forma de pó	24
Figura 2. Processamento da ração misturada com o lodo, para confecção de “pellets”	24
Figura 3. Ração peletizada após o processamento.....	25
Figura 4. Delineamento do ensaio dos focos de criptas aberrantes (FCA) em ratos Wistar.....	28
Figura 4A. Foco de cripta aberrante corada pelo azul de metileno (FCA) no cólon de ratos Wistar.	28
Figura 5. Delineamento do ensaio dos focos de hepatócitos alterados (FHA) em ratos Wistar.....	31
Figura 5A. Região periportal e ductos biliares imunocorados para GST-P. Controle positivo interno	32
Figura 5B. Foco de hepatócito alterado (FHA) expressando a enzima GST-P positiva	32
Figura 6. Classificação morfológica de cometa segundo a intensidade das lesões.....	36
Figura 7. Esquema da formação do micronúcleo.....	38
Figura 8. Peso corpóreo dos animais ao longo das 10 semanas - Estudos de focos de criptas aberrantes (FCA)	41
Figura 9. Peso corpóreo dos animais ao longo das 8 semanas - Estudos de focos de hepatócitos alterados (FHA).....	44

LISTA DE SIGLAS

CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
DEN	N-Dietilnitrosamina
DMH	1,2-Dimetilhidrazina
EPA	Environmental Protection Agency
ETE PCJ-1	Estação de Tratamento de Esgoto da Bacia Hidrográfica Piracicaba / Capivari / Jundiaí
FCA	Foco de Cripta Aberrante
FHA	Foco de Hepatócito Alterado
GST-P	Glutathione S-Transferase Positivo
IARC	International Agency for Research on Cancer
LETE	Lodo de Estação de Tratamento de Esgoto
MN	Micronúcleo
NAS	North-American Academy Science
TOXICAM	Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana
HP	Hepatectomia Parcial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características do processo de tratamento de esgoto das ETEs amostradas.....	22
Tabela 2. Peso corpóreo inicial e final, ganho de peso, consumo de ração e LETE nos diferentes grupos experimentais expostos ao LETE durante 10 semanas.....	40
Tabela 2.1. Efeito do LETE nos focos de criptas aberrantes (FCA) multiplicidade de criptas (Criptas/FCA) no cólon médio e distal.....	42
Tabela 3. Peso corpóreo inicial e final, ganho de peso, consumo de ração e LETE nos diferentes grupos experimentais expostos ao LETE durante 8 semanas.....	43
Tabela 3.1. Número e área de focos de hepatócitos alterados preneoplásico GST-P-positivo no fígado de ratos machos Wistar não iniciados e iniciados até o fim do experimento.....	45
Tabela 4. Medidas totais das lesões do DNA em linfócitos de sangue periférico de ratos expostos com 10.000 e 50.000ppm de LETE por 8 semanas - Ensaio de focos de criptas aberrantes (FCA).....	46
Tabela 5. Medidas totais das lesões do cometa em linfócitos de sangue periférico de ratos com 10.000 e 50.000ppm de LETE por 6 semanas - Ensaio de focos de hepatócitos alterados (FHA).....	47

Tabela 6. Frequência de micronúcleos (PCEs) em medula de ratos com 10.000 e 50.000ppm de LETE por 8 semanas - Ensaio de focos de criptas aberrantes (FCA).....	48
---	-----------

Tabela 7. Frequência de micronúcleos (PCEs) em medula de ratos com 10.000 e 50.000ppm de LETE por 6 semanas - Ensaio de hepatócitos alterados (FHA).....	49
---	-----------

Silva PRP. *Avaliação do potencial genotóxico e cancerígeno do lodo de estação de tratamento de esgoto (LETE) em sistemas experimentais in vivo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 84p.

A rápida oxidação da matéria orgânica dos solos tropicais é mais uma evidência da grande vantagem do uso de biossólidos como condicionadores, capazes de melhorar as características físicas, químicas e biológicas do solo com grandes reflexos na produtividade agrícola. Portanto, o presente projeto objetivou averiguar o potencial genotóxico e cancerígeno dos lotes do Lodo de Estação de Tratamento de Esgoto (LETE) gerado em uma ETE pré-definida na região da bacia hidrográfica Piracicaba, Capivari e Jundiá (PCJ1). Estes dados poderão fornecer subsídios para a avaliação do risco das populações humanas e o meio ambiente expostas ao LETE. Foram utilizados 140 ratos Wistar machos com 8 semanas de idade, expostos, via ração, a concentrações de 10.000 e 50.000ppm de LETE, durante 6 e 8 semanas, com os iniciadores DEN (*N*-dietilnitrosamina) e DMH (1,2-dimetilhidrazina), conforme citado nos respectivos protocolos (Figuras 4 e 5). A avaliação toxicológica do lodo de esgoto desenvolvida pelo Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental Sobre a Saúde Humana (TOXICAM), enfocou os parâmetros toxicológicos, como seu potencial genotóxico, pelos testes do cometa e micronúcleo em sangue periférico e medula óssea e carcinogenicidade pelos ensaios de FCA e FHA. Os dois ensaios foram divididos em 4 grupos (FCA- GI=Controle Negativo, GII=Controle

Positivo/DMH III=10.000ppmLETE e GIV=50.000ppmLETE); (FHA-GI=Controle Negativo, GII=Controle Positivo/DEN, GIII=10.000ppmLETE e GIV=50.000ppmLETE). Entretanto, na 3ª semana foi realizada hepatectomia parcial em todos os animais dos respectivos grupos do ensaio de FHA. No teste do cometa foram utilizados 10 animais como controle positivo (controle interno - MNU-N-metil-N-nitrosourea), e 10 animais como controle negativo nos respectivos ensaios (FCA e FHA). Os testes em questão indicaram que o LETE não promove aumento do número de criptas aberrantes no cólon, número e área de focos de hepatócitos alterados no fígado, lesões no DNA (cometa), e também, não houve aumento de forma significativa a frequência de micronúcleo nas células, conforme as tabelas a seguir: 2.1(G=III e IV); 3.1(G=IV); 4(G=,III e IV); 5(G=III,IV e V); 6(G=III,IV e V); 7(G=IV e V). Em relação ao controle positivo. Estes dados poderão fornecer suporte na avaliação de risco da população humana e o meio ambiente, quando expostos ao lodo de estação de tratamento de esgoto.

Descritores: 1.Águas residuárias 2.Ratos Wistar 3.Camundongos 4.Dietilnitrosamina 5.1,2 Dimetillidrazina 6.Metilnitrosouréia 7.Testes de mutagenicidade 8.Testes de carcinogenicidade

SUMMARY

Silva PRP. *In vivo evaluation of the carcinogenic potential of sewage sludge from a urban wastewater treatment plant in experimental systems* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 84p.

Fast oxidation of organic matter on tropical soils is another evidence of the great advantage of using biosolids as conditioners once they are able to improve biological, chemical and physical characteristics of the soil with remarkable consequences on agricultural productivity. Therefore, the present project aimed at verifying genotoxic and carcinogenic potential plots of sludge from sewage treatment plants in a pre-defined watershed region at Piracicaba, Capivari and Jundiaí (PCJ1). These data may provide support to evaluate risks on human populations and the environment exposed to sludge from sewage treatment plants. In the study, 140 Wistar male rats, 8 week-old, were used. They were exposed, via chow, to a 10.000 and 50.000 ppm concentration of sludge from sewage treatment plants during 6 to 8 weeks with DEN initiators (diethylnitrosamine) and DMH (1,2-dimethylhydrazine) as mentioned in protocols (Figures 4 and 5). Toxicological evaluation of LETE developed by Center of Evaluation of Environmental Impact on Human Health (TOXICAM) focused toxicological parameters with its genotoxic potential by comet and micronucleus assays on peripheral blood and bone marrow in Wistar rats and carcinogenicity using ACF and AHF assays. Both assays were divided into 4 groups (ACF- GI=Negative Control, GII=Positive Control/DMH III=10.000ppmLETE and GIV=50.000ppmLETE); (AHF-

GI=Negative Control, GII=Positive Positive/DEN, GIII=10.000ppmLETE and GIV=50.000ppmLETE). Therefore, on the 3rd week partial hepatectomy was performed in every animal from AHF assays respective groups. assays and to FCA comet test, using MNU (N-methyl-N-nitrosourea) as positive control. The tests in question indicated that the SS not promote increased number of aberrant crypts in the colon, number and area of foci of altered hepatocytes in the liver, lesions in DNA (comet), and also, significantly increased the frequency of micronucleus in cells, according to the following tables 2.1(G=III and IV); 3.1(G=IV); 4(G=,III and IV); 5(G=III,IV and V); 6(G=III,IV and V); 7(G=IV and V). For the positive control. These data may provide support to evaluate risks on human populations and the environment exposed to sludge from sewage treatment plants.

Descriptors:1.Sewage 2. Wistar rats 3.Mouse 4.Diethylnitrosamine 5.1,2 Dimetillidrazine 6.Methylnitrosourea 7.Mutagenicity tests 8.Carcinogenicity tests

INTRODUÇÃO

O destino final dos resíduos produzidos pelos sistemas de tratamento de água e esgoto é uma preocupação mundial. Embora a maioria dos países desenvolvidos já tenha adequado seus sistemas para gerenciar esses resíduos, um grande número de estações de água e esgoto ainda lança esse material diretamente nos corpos d'água, principalmente nos países em desenvolvimento (Andreoli et al., 2001). Nos Estados Unidos, a produção de lodos no ano de 2000 foi estimada em 7,1 milhões de toneladas, devendo chegar a 8,2 milhões em 2010 (Environmental Protection Agency - EPA, 1999). Mais de 90% do lodo produzido no mundo tem sua disposição final por meio de três processos: incineração, disposição em aterros e uso agrícola (Andreoli et al., 2001).

Nesse contexto, os bioensaios podem ser utilizados para complementar a avaliação química do lodo, pois podem integrar os efeitos de todos os agentes tóxicos, inclusive as possíveis interações entre efeitos (aditivos, antagônicos e sinérgicos), sendo sensíveis à fração biodisponível dos toxicantes presentes (Kapenen, Itavaara, 2001).

A ideia de utilização dos resíduos de estações de tratamento de esgoto na agricultura é interessante, pois combina destinação de resíduos sólidos com aumento potencial da produtividade agrícola. Neste cenário, é importante assegurar que o uso destes resíduos não traga riscos à saúde. Desta forma, a utilização de testes de toxicidade de média-duração poderia orientar as autoridades sanitárias sobre a segurança da utilização destes

resíduos para a produção de alimentos. Uma região de interesse em nosso Estado e monitorada pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) é a Unidade Hidrográfica de Gerenciamento Piracicaba, Capivari e Jundiaí, onde estão sete dos 30 municípios mais poluidores do Estado de São Paulo.

A disposição em aterros requer cuidados especiais em relação à seleção de local, a características de projeto que evitem a percolação de lixiviado, à drenagem dos gases gerados e ao tratamento do chorume produzido, assim como a uma operação eficiente que evite a proliferação de vetores. A reciclagem agrícola implica na garantia de fornecimento de insumos de boa qualidade à agricultura, com seleção criteriosa, escolhendo áreas e culturas aptas com a orientação técnica adequada ao produtor rural e realizando o monitoramento ambiental. A rentabilidade do uso de biossólidos é uma forma de garantir o interesse contínuo dos agricultores e, conseqüentemente, a sustentabilidade do processo (Martinelli et al., 2002). Entre os anos de 2002 a 2004 constatou-se que o lodo de estação de tratamento de esgoto (LETE) é uma fonte eficiente de nitrogênio e fósforo para a cana-de-açúcar, não sendo necessária aplicação adicional de fertilizantes nitrogenados (Chiba et al., 2005). Quanto ao risco de contaminação do solo, os poluentes orgânicos do lodo são importantes, porque podem causar mudanças no comportamento desses contaminantes existentes para o meio ambiente. A conseqüente melhoria da microbiologia do solo pela utilização do lodo, permitindo a redução da aplicação de

fertilizantes químicos, foi destacada por alguns autores (Schowanek et al., 2004).

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

A academia norte-americana de Ciência (NAS - North-American Academy Science) recomendou que a EPA realizasse novos levantamentos sobre os produtos químicos e patógenos encontrados no LETE, além de estudos epidemiológicos sistemáticos dos agravos à saúde humana e de monitoramento do impacto ambiental, que estejam possivelmente relacionados ao lodo. Ao lado dos aspectos positivos do uso do LETE em

solos agrícolas, deve ser destacado que pouco se conhece a respeito dos efeitos desta mistura complexa sobre organismos superiores, como o homem. Considerando essas informações, faz-se necessário o conhecimento do eventual potencial toxicológico do LETE sobre mamíferos, a fim de calcular quantidades seguras para sua incorporação ao solo, sem riscos às espécies expostas (Tollefson, 2008).

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) desenvolveu o projeto “**Avaliação e Aperfeiçoamento de Metodologias Analíticas**” que inclui, dentre outros, o subprojeto “**Implantação e validação de métodos para avaliação toxicológica de lodo de esgoto doméstico**” que visa verificar a aplicabilidade de ensaios de toxicidade sistêmica, genotoxicidade e carcinogenicidade em ratos Wistar para a caracterização do lodo de uma ETE pré-definida do estado de São Paulo. O presente trabalho acha-se nesse contexto [deve ser destacado que não há informações disponíveis sobre o potencial de nocividade (“*hazard*”) do LETE]. Assim, em 2006, o Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana (TOXICAM), na FMBo, em colaboração com a CETESB e com o Laboratório de Poluição Atmosférica (LPA) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, iniciaram estudos experimentais para caracterização da toxicidade do LETE.

O potencial tóxico de uma substância pode ser determinado por metodologias de complexidade biológica variável, que dependem dos sistemas estudados (in vitro, in vivo, organismos uni e pluricelulares, vias potencias de exposição) e das respostas esperadas por parte de

determinadas espécies. Para organismos superiores, como os mamíferos, vários testes têm sido utilizados, objetivando particularmente aumentar a confiabilidade na extrapolação dos seus resultados para o homem (Luvizutto et al., 2009).

As atividades de pesquisa sobre o LETE foram iniciadas com testes de mutagenicidade com vegetais. Várias espécies podem ser utilizadas como bioindicadores da presença de substâncias tóxicas e os seus biomonitoramentos podem representar um método complementar às estratégias convencionais para avaliar o risco nos ambientes. O efeito dos poluentes sobre as plantas pode ocorrer em diversos níveis, sendo que, muitas dessas reações podem ser utilizadas como critérios de avaliação das mudanças ambientais em estudos de biomonitoramento (Guimarães, 2003). Certas plantas possuem ciclo de vida curto e se apresentam como bioindicadores para avaliações após exposição em curto período de tempo (de horas ou dias). A maioria dos ensaios com espécies vegetais apresenta alta sensibilidade (baixa ocorrência de falso-positivo), sendo apropriados para avaliação de riscos à exposição de agentes mutagênicos. Plantas, particularmente o *Allium cepa*, a *Tradescantia* e a *Vicia faba*, têm sido utilizadas para avaliação da poluição presente tanto na água quanto na atmosfera (Silva et al., 2003; Mielli, 2008). O teste Trad-MN é um teste citogenético, baseado na verificação de quebras cromossômicas expressas em micronúcleos (porções de cromatina que permanecem próximas ao núcleo celular) e podem ser originados de fragmentos cromossômicos acêntricos (efeito clastogênico) ou de cromossomos inteiros (efeito

aneugênico). Sua frequência tem sido utilizada para avaliar o grau de dano genotóxico aos quais as células germinativas desse vegetal (células-mãe dos grãos-de-pólen) são expostas. Ma e colaboradores (1978) padronizaram o ensaio do micronúcleo na tétrade para mutagênese empregando o clone BNL 4430, um híbrido estéril (*Tradescantia hirsutiflora* x *Tradescantia subcaulis*) do gênero *Tradescantia*. Os micronúcleos são formados de fragmentos cromossômicos derivados de quebras moleculares, causados por erros na replicação do DNA no momento de sua duplicação na prófase I da meiose, após exposição das inflorescências jovens aos agentes mutagênicos (Ma, 1981; Rodrigues et al., 1997; Mielli, 2008). Estudos conduzidos em nosso Laboratório demonstraram que o LETE produz efeitos clastogênicos pelo bioensaio com *Tradescantia* (Mielli et al., 2008). Uma vez detectados efeitos positivos em *Tradescantia*, o passo a seguir seria o desenvolvimento de estudos em animais superiores, com a finalidade de melhor compreender a toxicidade do LETE.

Os testes de toxicidade em animais têm sido cada vez mais utilizados para a determinação de efeitos deletérios. Os estudos relativos a este assunto podem ser conduzidos através de testes experimentais com metodologias distintas, estabelecidas de acordo com os objetivos que se procura alcançar nessas avaliações (Lombardi, 1999).

A exposição a um agente tóxico pode ser aguda, quando a dose letal do tóxico pode ser em um único evento e rapidamente absorvida, com sua toxicidade podendo durar horas ou dias. A crônica, quando o agente tóxico é liberado em eventos periodicamente repetidos, em doses subletais, durante

um período de tempo. Devido às grandes variações da sensibilidade aos contaminantes apresentados pelos diferentes grupos de animais, conforme o tipo de teste escolhido e seu propósito pode-se constatar a letalidade do produto testado, ou verificar seus efeitos subletais, que muitas vezes, manifestam-se atingindo as estruturas celulares dos organismos de forma molecular e bioquímica ou mesmo o próprio material genético. Os trabalhos de bioensaios com análises “in vivo” ou com exposição “in situ” de animais, utilizando amostras de sangue e tecido para análises complementares, são importantes ferramentas de rastreamento toxicológicos e monitoramento ambiental (Ferreira, 2002). As fontes de informações para avaliação de carcinogenicidade são: epidemiologia, teste de longa-duração em roedores (padrão), testes alternativos de média-duração, testes em camundongos transgênico/knock-outs, relação estrutura-função do agente químico e testes de mutagenicidade. Os bioensaios de curta-duração são testes que contribuem muito para a determinação das substâncias nocivas, porém não são definitivos.

Vantagens dos ensaios de média-duração: Boa correlação com os resultados dos testes de longa-duração, conclusões em prazo relativamente curto, relação dose-resposta nítida, detecção de cancerígenos não-genotóxicos, poucos resultados falso-positivos e falso-negativos, uso pequenos de animais, tempo e recursos (Ito et al., 2003).

Algumas técnicas de avaliação de toxicidade em roedores são particularmente sensíveis para a detecção da ação de agentes tóxicos

ambientais como: cometa em sangue periférico, micronúcleo na medula óssea.

O ensaio do cometa *cell gel electrophoresis* in vivo pode ser usado para investigar a genotoxicidade de químico industrial, biocidas, agroquímicos e farmacêuticos. A maior vantagem deste ensaio é que tem uma aplicação relativamente fácil para alguns tecidos de interesse, e detecção de múltiplas classes de danos do DNA (Hartmann et al., 2003). O DNA não é uma molécula estável. Quando sua estrutura de dupla hélice foi desvendada, no famoso trabalho de James D. Watson e Francis Crick em (1953), previu-se a existência de mecanismos implicados na sua replicação, assim como na transferência de informações para o RNA. Na época, entretanto, não se pensava em sistemas de reparo de DNA. Hoje, sabe-se que o material genético é constantemente agredido por fatores físicos, químicos e biológicos e que sistemas de reparo de DNA constituem mecanismos de defesa extremamente eficientes que garantem estabilidade do genoma e, conseqüentemente, a própria existência da célula e ou do organismo. Entretanto, em algumas situações esses sistemas falham e algumas lesões podem alterar o código genético de modo permanente, causando o estabelecimento de mutações (Hoeijmakers, 2001;.Rydberg, Johanson, 1978).

O teste do micronúcleo foi idealizado por Schmid (1975) e é o ensaio “*in vivo*” mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clatogênicos e aneugênicos. Na eritrogênese, durante 10 a 24hs, os eritrócitos jovens são policromáticos (PCEs ou RNA-positivos), isto é, apresentam coloração

azulada diferente dos eritrócitos maduros, que têm coloração rósea quando coradas pela coloração de Leishman, sendo denominados eritrócitos normocromáticos (NCEs). Ao se contar os micronúcleos somente na população de PCEs tem-se garantia de que os mesmos formam-se na mitose anterior, na presença da substância teste (MacGregor et al., 1987; Hayashi et al., 1994; OECD, 1997).

Os carcinomas do cólon induzidos pela DMH (1,2-Dimetilhidrazina) e seus derivados constituem atualmente um dos modelos mais utilizados na oncologia experimental para o estudo de vários aspectos da morfologia, patogênese, prevenção e tratamento do câncer do cólon. Assim, é possível estudar em roedores, sob condições experimentais controladas, a indução de câncer no cólon e a influência de fatores promotores ou inibidores no processo de oncogênese (Serqueira, 1997; Ziliotto, 2008). A maioria das neoplasias malignas do intestino grosso são adenocarcinomas. Muitos se iniciam como pólipos adenomatosos. A progressão a partir de lesões microscópicas discretas, como os focos de criptas aberrantes ou de adenoma, para o carcinoma ocorre pelo acúmulo sequencial de alterações genéticas, que muitos consideram como o principal modelo para o entendimento da carcinogênese (Rodrigues et al., 2002). A etapa de iniciação corresponde ao dano permanente e irreversível do DNA da célula, levando à alteração do material genético (mutação). As alterações genotípicas podem permanecer latentes durante anos, até a etapa seguinte, a promoção, na qual ocorre proliferação celular e a expressão fenotípica da mutação induzida na iniciação. Durante a promoção, as células iniciadas são

estimuladas a se dividir por fatores genéticos, hormonais ou mecânicos e, então, dar origem às lesões pré-neoplásicas. A principal característica desta fase é a reversibilidade. Na etapa de progressão, a neoplasia é expressa fenotipicamente e evidenciada histologicamente, caracterizando-se pela instabilidade do genoma. As alterações estruturais verificadas nesta fase estão diretamente relacionadas à elevada taxa de proliferação celular, às capacidades de invasão e de produzir metástases e às alterações bioquímicas, que fornecem substrato biológico para a última etapa da carcinogênese, que é a manifestação clínica do câncer. A displasia, o tamanho do adenoma, a extensão do componente viloso, a multiplicidade e a idade avançada são fatores associados com alto potencial de malignidade (Agner et al., 2003; Rodrigues & Serqueiro, 2006). Embora a mucosa colônica normal se origine de várias células tronco, portanto, policlonal, as neoplasias colo-retais têm composição monoclonal. Até mesmo o menor adenoma e o câncer mais precoce são monoclonais, sugerindo que os pólipos e cânceres tenham origem na expansão clonal de uma única célula tronco iniciada. No câncer de cólon e reto, as alterações genéticas encontradas nos genes K-ras, C-myc, C-src, p-53, DCC, MCC e APC são: instabilidade de microssatélites no cromossomo 2 e desregulação de sinais da via de transdução, como a proteína cinase (Guillem et al., 1995; Kern, Kinzler, 1995). A determinação de que o pólipo adenomatoso é um fenótipo pré-maligno para o adenocarcinoma colo-retal permitiu estudos epidemiológicos da ocorrência e progressão destes pólipos como representantes precoces na prevenção do câncer (Fuku et al., 2007). As

criptas aberrantes são visualizadas nas primeiras semanas após exposição a cancerígenos químicos específicos, como a dimetilhidrazina e o azoximetano. São facilmente observadas ao exame esteroscópico do cólon corado com azul de metileno, giemsa ou azul de toluidina. Os focos de criptas aberrantes (FCA) têm sido propostos como marcadores morfológicos intermediários do câncer de cólon e utilizados em estudos experimentais como indicadores de indução neoplásica precoce (McLellan, Bird, 1988; Bird, 1995; Park et al., 1997).

1.1. DMH

A 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e seus metabólitos, tais como o azoximetano e o metilazometanol, são cancerígenos com alto grau de especificidade para o cólon, em várias espécies de roedores. A DMH é um carcinógeno completo que induz a iniciação e promoção da carcinogêneses, levando à formação de neoplasias, visíveis macroscopicamente, de forma dose dependente (Rogers, Nauss, 1985; Rodrigues et al., 2002). É considerada pró-carcinógeno por requerer ativação metabólica da DMH, que envolve sua oxidação no fígado, originando o azometano, que sofre segunda oxidação gerando azoximetano. Esse último, após hidroxilação por enzimas microssômicas hepáticas, resulta em metilazoximetanol que é quimicamente instável. Sua decomposição libera formaldeído, água e nitrogênio, além do agente alquilante, que é capaz de provocar metilação do DNA e RNA e outras proteínas. Seu modo de ação envolve interação com bases purinas dos ácidos nucleicos. Neste processo, ocorre metilação da guanina em 7-

metilguanina, levando à modificação do genoma das células alvo (Rodrigues & Sequeira, 2006).

De acordo com a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) o fígado é o melhor órgão para determinar a classificação de carcinogenicidade (Shirai, 1997; Ito et al., 2003).

Em 1976, com uma longa experiência em pesquisa experimental de hepatocarcinogênese em roedores, Solt e Farber foram capazes de desenvolver um protocolo pelo qual alterações dos focos de células do fígado fossem induzidos em ratos por 4 semanas. Este protocolo foi baseado na seleção de crescimento que utilizara supressão de crescimento de células normais, pela hepatotoxicidade hepática e crescimento de células do fígado hepatotóxico-resistente, alterados pela estimulação regenerativa. Entretanto, os primeiros modelos estudaram mecanismos de hepatocarcinogênese para utilizar como um sistema de ensaio para carcinógenos. Peraino e colaboradores (1987) descreveram um modelo de dois estágios, em que a formação do tumor hepático foi aumentada por químico semelhante ao fenobarbital, administrado após iniciação com 2-acetilaminofluoreno. Seus dados sugeriram que estes dois estágios poderiam ser utilizados para detecção de carcinógenos como resposta a um químico. Baseados nesta concepção, gradativamente estabeleceram um novo sistema de ensaio, em que o potencial carcinogênico pode ser detectado pela quantificação de focos alterados do fígado e como marcador final em período relativamente curto. A natureza dos focos de hepatócitos alterados é útil como indicadora de lesões da hepatocarcinogenicidade,

sendo agora bem aceita como ensaio para detecção de agentes carcinogênicos. As características fenotípicas dos focos de hepatócitos têm sido extensivamente estudadas usando enzimas histoquímicas e imunohistoquímicas, como a glutathione S-transferase na forma placentária (GST-P), que é um marcador para visualização de células claras em pequenas lesões. Diferentes tipos de FHAs, induzidos por cancerígenos químicos, têm sido identificados no fígado de ratos, em alterações dependentes de seus componentes citoplasmáticos, como glicogênio, retículo endoplasmático, ribossomos e peroxissomos. Assim, sob coloração de rotina (HE), as alterações do citoplasma permitem classificar os focos de hepatócitos alterados em focos de células claras, focos de células acidofílicas, focos de células intermediárias, focos de células anfófilas, focos de células xenomórficas, focos de células tigróides, focos de células basofílicas e focos de células mistas. Pode-se identificar três linhagens hepatocíticas durante a evolução dos FHAs para tumores hepáticos em roedores: glicogenólica-basofílica, anfófila-basofílica e xenomórfica-basofílica (Bannasch et al., 1989; 2001).

O significado biológico da expressão aumentada da GST-P (Glutathione S-Transferase positivo) em lesões hepáticas pré-neoplásicas e neoplásicas não foi, ainda, totalmente estabelecido. A expressão da GST-P é normalmente baixa em hepatócitos fetais, adultos quiescentes ou em regeneração, placenta, coração e outros órgãos de ratos machos, mas significativamente elevada nos rins, pâncreas, nódulos hiperplásicos e tumores hepáticos (Solt-Farber et al., 1976).

1.2. DEN

As nitrosaminas são capazes de induzir tumores em diferentes espécies de animais e há suspeita de estarem envolvidas em alguns tumores humanos. Os metabólitos requerem ativação de algumas moléculas, como o p450 (CYP), gerando instabilidade dos metabólitos, com meia-vida curta e que reagem com o DNA das células, abrindo sítios de formação de bases premutagênicas (Lijinsky, 1992; Aiub et al., 2004). Em ratos, a indução do câncer com a N-dietilnitrosamina (DEN) tem sido correlacionada com as alterações no aumento da expressão da ICAM-1 no sangue periférico, causando atipias nos hepatócitos das áreas do parênquima. Para avaliar o envolvimento do TSLC em cascata na hepatocarcinogênese, foi investigada a expressão da metilação do DNA dos genes *Tslc1* e *Dol-1*, induzindo o carcinoma hepatocelular, utilizando a DEN em ratos (Tsujiuchi et al., 2007; Matsuoka et al., 2009). Com o uso do indutor DEN obtém-se um quadro quase completo de alterações moleculares, que podem estar envolvidas no desenvolvimento dos processos de cirrose, carcinoma e metástase (Liu et al., 2009).

1.3. Hepatectomia Parcial (HP)

O primeiro modelo experimental bem sucedido para o estudo da regeneração hepática foi introduzido por Higgins e Anderson, em 1931, e é até hoje, um dos modelos mais usados em estudos que envolvam regeneração hepática em roedores. Esse modelo consiste em remoção cirúrgica dos lobos laterais esquerdo e médio do fígado de ratos, os quais representam aproximadamente 65 a 75% da massa hepática total desses animais.

Em ratos, a regeneração hepática inicia-se dentro de 6 horas após a HP e a máxima regeneração entre a 24^a e a 30^a hora, diminuindo progressivamente nos próximos 10 a 15 dias. Depois de 6-24 horas após a HP, ocorre aumento no tamanho do núcleo e do citoplasma. Em um segundo momento, entre as 24^a e a 30^a hora, ocorre uma rápida fase de divisão celular, mas as células permanecem com tamanho aumentado. Após 15 dias, a divisão celular diminui e a mitose torna-se menos evidente. Na 3^a semana pós-hepatectomia, o parênquima hepático apresenta-se completamente normal, ou seja, ao final de 28 dias o fígado está 100% regenerado (Higgins, Anderson, 1931; Lambert, 1965).

1.4. Focos de Hepatócitos Alterados (FHA)

Os focos e áreas de alterações celulares são lesões constituídas por células com alterações na coloração e textura citoplasmática, vistas em cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina. A diferença entre focos e áreas é somente o tamanho ocupado por estas lesões de tamanho igual ou superior a um nódulo hepático. Nestas lesões não ocorre alteração nítida da arquitetura hepática e as trabéculas de hepatócitos alterados fundem-se sem demarcação com o parênquima ao redor. As células alteradas podem ser maiores ou menores do que o hepatócito normal. Os núcleos podem ser maiores, vesiculares ou hipercromáticos e com células aumentadas. Os nódulos neoplásicos são esféricos e geralmente ocupam área equivalente a alguns lóbulos hepáticos e mostram perda da arquitetura normal. Os hepatócitos dentro dos nódulos são similares a aqueles vistos nos focos ou áreas e podem mostrar misturas de alterações citoplasmáticas. Algumas vezes estão presentes mitoses e graus variados de atipia nuclear, caracterizados por aumento, hipercromasia, duplicação e nucléolo aumentado. Um aspecto importante do nódulo é a distorção da arquitetura e nítida demarcação do fígado circunjacente. As células podem estar em arranjos sólidos desordenados em uma ou mais fileiras de células. Os sinusóides podem estar comprimidos pelos hepatócitos aumentados ou mostrar variados graus de dilatação. Estes nódulos são lesões proliferativas e, no mínimo, representam aumento da probabilidade de desenvolvimento de hepatocarcinoma (Tatematsu et al., 1983).

2. OBJETIVOS

Considerando o acima exposto, o presente estudo foi concebido tendo como objetivo avaliar a toxicidade do LETE em roedores, através de testes de média-duração em ratos Wistar, focalizando os efeitos do LETE sobre os seguintes parâmetros:

- Genotoxicidade (Cometa - sangue periférico)
- Mutagenicidade (Micronúcleo - medula óssea)
- Carcinogenicidade (FCA e FHA).

3. MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da FMUSP (Protocolo N° 021/06).

3.1. Animais e Ambiente de Experimentação

Foram utilizados ratos Wistar machos com 8 semanas de idade, pesando em média 200g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, com dimensões de 41x34x16 centímetros, forradas com maravalha de pinho autoclavada, trocadas três vezes por semana. Durante os experimentos, os animais permaneceram no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP em Botucatu (FMBo), recebendo ração basal *peletizada* (Biobase, Bio-tec, Bases Química Ltda., Colombo-PR) e água filtrada *ad libitum*. Os animais foram mantidos em sala com temperatura de 22°C, umidade relativa de 55%, ciclo de luz de 12 horas claro/escuro e exaustão contínua do ar ambiente. Após período de aclimação de duas semanas, os ratos foram distribuídos ao acaso em lotes de 5 animais por caixa. Os animais destinados ao ensaio de focos de criptas aberrantes foram mantidos por 10 semanas e os destinados ao ensaio dos focos de hepatócitos alterados por 8 semanas. Em ambos os experimentos os animais foram sacrificados por asfixia por CO₂.

3.2. Identificação dos Animais

Durante a fase de aclimação, os animais receberam marcação provisória na cauda, com uma caneta de ponta porosa (*Pilot*), de acordo com as seguintes cores: animal um (branco), dois (verde), três (vermelho), quatro (preto) e cinco (azul).

Ao final da fase de aclimação, os animais foram redistribuídos nos diferentes grupos experimentais e identificados anatomicamente com ácido pícrico (2%) da seguinte maneira: o animal sem marcação correspondia ao número um, a marcação na cauda ao número dois, marcação na cabeça ao número três, na pata dianteira direita ao número quatro e na pata traseira direita ao número cinco. Este esquema de marcação foi mantido durante toda a experimentação.

3.3. Preparo dos Controles Positivos

O MNU (*N*-metil-*N*-nitrosouréia, Sigma-Aldrich Co., St. Louis MO, USA; Catalog No.684-93-5), não tem uso comercial conhecido. Sua fórmula química é $C_2H_5N_3O_2$, existe na forma de cristais pálidos de cor amarela e tem peso molecular de 103,10 g/mol. Os animais tratados com MNU receberam 1ml para cada 100g de peso do animal de uma solução de MNU diluído em NaCl, na concentração de 50mg/Kg, administrada via intraperitoneal uma vez. Três horas após a administração da dose de MNU (Ensaio do cometa), as amostras de sangue foram coletadas do plexo periorbital e após 24hs foi realizada a retirada do fêmur para o ensaio de micronúcleo.

A solução de DMH (1,2-dimetilhidrazina - CAS Tokyo Kasei Co., Tokyo), foi preparada no momento do uso, diluída em solução de EDTA (37mg/100mL de água destilada), na concentração de 400mg/100mL. Foi utilizada a dose de 40mg/Kg de peso corpóreo, administrada em duas aplicações semanais s.c., em duas semanas sucessivas.

A solução de DEN (N-dietilnitrosamina - CAS 7756; Sigma-Aldrich Co., St. Louis MO, USA) foi preparada pela diluição da DEN em solução de NaCl 0,9% (4mL/Kg). Foi utilizada a dose de 200mg/Kg de peso corpóreo, administrada via i.p. em uma única aplicação.

3.4. Locais de Amostragem do Lodo

Para a realização deste estudo foi escolhida uma ETE (PCJ-1) que pertence à Bacia Hidrográfica Piracicaba, Capivari e Jundiaí. A ETE “PCJ-1” trata esgoto urbano e industrial, principalmente de indústrias têxteis e tinturais. O lodo é tratado por um processo em que na fase líquida usa-se filtro biológico, e adiciona polímero no processo de deságue para obter um composto pastoso. Nesta fase sólida usa-se centrifuga e leito de secagem, a quantidade atual 110 L/s, ou seja, gerando 7 ton/dia de lodo. As etapas do processamento do lodo podem ser esquematizadas da seguinte forma:

- Estabilização do Lodo de Esgoto pode ser Química, Física e Biológica.
- O processo de estabilização tem por objetivo atenuar duas características indesejáveis dos resíduos: odor e patógenos.

- Digestão anaeróbia.
- Digestão aeróbia.
- Digestão aeróbia autotérmica.

Tabela 1. Principais características do processo de tratamento de esgoto das ETEs amostradas.

ETEs	Processo de tratamento		Q* Atual (L/s)	Lodo gerado (ton/dia)	Adiciona ao		
	Fase líquida	Fase sólida			Cal	FeCl ₃	Polí- mero
PCJ-1	Filtro biológico	Digestor,	110	7	-	-	sim
		centrífuga e leito de secagem					
PCJ-2	Lagoas aeradas de mistura completa, seguidas de lagoas de sedimentação.	Centrífuga e secagem ao ar em leiras com revolvimento	900	28	-	-	sim
AT-1	Lodo ativado convencional	Digestor, filtro prensa	⁴ 7000	⁴ 300	⁴ -	⁴ sim	⁴ sim
AT-2	Lodo ativado convencional	Digestor, filtro prensa	⁴ 750	⁴ 37	⁴ sim	⁴ sim	-
SG	Lodo ativado convencional	Digestor, Filtro esteira	⁴ 480	⁴ 100	⁴ -	⁴ sim	⁴ sim

Cada uma dessas opções tem vantagens e desvantagens. A adição de cal tem a vantagem de elevar o pH próximo a 12, reduzindo assim os patógenos presentes, porém, o cal e o cloreto férrico são adicionados em proporções de até 30%, elevando assim o volume de lodo a ser transportado. Já os polímeros têm a vantagem de serem adicionados em concentrações bem reduzidas ($\approx 0,25$ a $0,5\%$), porém não têm a capacidade de reduzir patógenos, a qual nesse caso deverá ser feita por outro método. Ressalte-se que no caso de solos ácidos, como o do estado de São Paulo, o fato de o lodo estar com pH elevado pode ser uma vantagem do ponto de vista de aplicação na agricultura. Cada ETE define qual o método que utilizará para o deságue do lodo, e isso deve ser levado em conta na interpretação dos testes de toxicidade.

3.5. Preparo das Rações Experimentais Adicionadas com o LETE

Amostras do LETE tratado, conforme a descrição acima, foram fornecidas pela CETESB/SP, coletadas em um único lote de uma ETE pré-definida (PCJ-1). Essa amostra foi mantida a -20°C até a preparação de rações, contendo 10.000 e 50.000 ppm de lodo, que teve por base a ração em pó Nuvilab-CR1 (Nuvital/PR). Todos estes procedimentos foram realizados no Dietário Experimental da FMBo. A mistura da ração em pó com o LETE pulverizado foi feita por misturador industrial, Prensa Peletizadora Chavantes, CAF-modelo M60, PR (*Figuras 1 e 2*). A seguir, a mistura foi peletizada. Os “*pellets*” foram secos por ventilação à temperatura ambiente, durante 24h (*Figura 3*).

Figura 1. Ração misturada com o lodo, em forma de pó.

Figura 2. Processamento da ração misturada com o lodo, para confecção de “pellets”.

Figura 3. Ração peletizada após o processamento.

As rações com as diferentes concentrações de LETE foram embaladas em sacos plásticos identificados e mantidas em freezer (-20°C) por período máximo de 30 dias.

3.6. Carcinogênese Química

Na carcinogênese química, durante a biotransformação do carcinógeno, ocorre formação de diferentes espécies reativas de oxigênio pela cadeia respiratória mitocondrial, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. O estresse oxidativo que acompanha a metabolização dos carcinógenos causa dano adicional ao DNA, aumentando a formação de aductos. A atividade potencial de um carcinógeno, de fonte endógena ou exógena, depende fortemente da sua biotransformação ou bioativação no organismo. Assim, alterações na expressão de genes e / ou

na atividade de enzimas relevantes para a modificação estrutural dos carcinógenos podem ter forte influência sobre as consequências da carcinogênese iniciada quimicamente (Chen, Kong, 2004).

3.7. Ensaio dos Focos de Criptas Aberrantes (FCA)

3.7.1. Protocolo

O protocolo deste ensaio acha-se na *Figura 4*. Três grupos de ratos Wistar receberam 4 injeções de DMH (40 mg/Kg s.c), duas vezes por semana/duas semanas a ingestão da ração contaminada com o lodo foi por 8 semanas. Após o sacrifício de cada animal, foi feita abertura longitudinal da cavidade abdominal. O cólon foi removido desde a parte proximal até o reto e lavado com solução salina 0,9% para retirar as fezes. A seguir, foi aberto longitudinalmente pela borda da inserção mesocólica. O cólon foi seccionado transversalmente em segmentos menores, representando as porções média e distal, que foram distendidos sobre pequenas placas de “isopor” e presos com alfinetes. As placas foram mergulhadas, por no mínimo 24 horas, em cuba contendo solução de formalina 10% tamponada. O método proposto por Bird (1987) para identificação das criptas aberrantes consiste da análise estereoscópica da mucosa do cólon corada com azul de metileno 0,1%, por cerca de 10 minutos. As criptas aberrantes são caracterizadas por alteração de forma e tamanho, resultante de hiperplasia do epitélio, que se torna mais espesso em relação às criptas normais circunvizinhas e pelo aspecto mais escuro devido à captação do corante

(Fenoglio-Preiser, Noffsinger, 1999). Para análise em lupa (aumento de 4x), cada segmento de cólon foi colocado sobre uma lâmina de vidro, com a face mucosa voltada para cima. Foram analisados por volta de 25 campos consecutivos em cada segmento de cólon, para a identificação e quantificação dos focos de criptas aberrantes (FCA). O número total de FCA, de criptas aberrantes/FCA e a relação cripta/FCA foram comparados entre os diferentes grupos (Rodrigues et al., 2002). O nível de significância adotado para avaliar a diferença entre os grupos tratados e o controle foi $p < 0,05$. Após esta análise, o cólon foi emblocado para análise histológica convencional.

Figura 4. Delineamento do ensaio dos Focos de Criptas Aberrantes (FCA) em ratos Wistar.

Figura 4.A. Foco de cripta aberrante (FCA) no cólon de ratos Wistar, corada pelo azul de metileno 0,1%.

3.8. Ensaio dos Focos de Hepatócitos Alterados (FHA)

3.8.1. Protocolo

O protocolo deste ensaio encontra-se descrito na *Figura 5*. Os fígados foram retirados, pesados e avaliados macroscopicamente. As amostras de cada lobo foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 48 horas. Após o processamento histológico, foram feitos cortes de 3 a 4 μm de espessura, corados com hematoxilina e eosina (HE) e também pelo método imunohistoquímico do complexo avidina-biotina (ABC) (Hsu et al., 1981). A detecção imunohistoquímica da enzima glutathione S-transferase forma placentária (GST-P) seguiu as seguintes etapas: As amostras foram tratadas com H_2O_2 a 3% por 10 minutos, lavadas com PBS por 3 vezes, incubadas em leite Molico a 1%, por 1h. Após os bloqueios, o anticorpo primário policlonal anti-coelho GST-P (Medical and Biological Laboratories Co., Tokyo, Japan, Clone 311), foi diluído em BSA (1:1000) e aplicado sobre as lâminas, mantendo-as incubadas por 2 horas. As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com o Ac secundário biotinilado IgG anti-camundongo por 1 hora em uma diluição de 1:200 (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA). Em seguida foram incubadas por mais 1 hora, com a solução avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA, em uma diluição de 1:50 por 45 minutos). Posteriormente foi feita a revelação pelo cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma Aldrich Co, St Louis Mo, USA). Após a revelação das lâminas, as mesmas foram lavadas com água abundante e contra-coradas com

hematoxilina. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas e montadas com resina para microscopia (Entellan - Merck, Darmstadt, Alemanha). Nos cortes histológicos corados pela imunohistoquímica foram quantificados os focos de hepatócitos alterados (FHA) expressando a enzima GST-Positivo (*Figura 5.A.* Região periportal e ductos biliares imunocorados para GST-P e *Figura 5.B.* Foco de hepatócito alterado-FHA expressando a enzima GST-P), com diâmetro maior ou igual a $0,15\text{mm}^2$, com auxílio de sistema de análise de imagens KS300 (CARL ZEISS, Alemanha) conectado a microscópio óptico Nikon (AXIOPHOT-X, Japão). Estes parâmetros, número de focos GST-P⁺ por área de fígado (número de focos/cm²) e área agregada de foco por área de fígado (mm²/cm²), foram analisados estatisticamente para verificação de diferenças entre os grupos (Barbisan et al., 2003).

Figura 5. Delineamento do ensaio dos Focos de Hepatócitos Alterados (FHA) em ratos Wistar.

Figura 5.A. Região perinuclear e ductos biliares imunocorados para GST-P. Controle positivo interno.

Figura 5.B. Foco de hepatócito alterado (**FHA**) expressando a enzima GST-P+.

3.9. Ensaios de Genotoxicidade e Mutagenicidade

Os testes do cometa e micronúcleo foram realizados em todos os grupos de acordo com os protocolos anteriormente mencionados (*Figuras 4 e 5*). No teste do cometa foram utilizados 10 animais como controle positivo (controle interno - MNU-N-metil-N-nitrosourea), e 10 animais como controle negativo nos respectivos ensaios (FCA e FHA). Estes animais eram todos do mesmo lote dos hepatectomizados, porém, foram mantidos fora dos grupos de estudo porque tínhamos que evitar situações que pudessem comprometer as interpretações dos resultados.

Entretanto, foi necessário substituir o grupo controle negativo do ensaio de FHA devido ao procedimento da hepatectomia parcial, que pode promover lesões no DNA. Porém, optou-se por utilizar os mesmos animais para os dois estudos, uma vez que foram mantidos nas mesmas condições, com idade e linhagem iguais.

3.9.1. Protocolo - Cometa

O ensaio do cometa também é utilizado em estudos de biomonitoramento humano e ambiental, na avaliação do sistema de reparo do DNA e em estudos de quimioprevenção do câncer (Collins, 2004; Gleio, Pool-Zobel, 2006).

Neste estudo optamos pela utilização da técnica descrita por Singh e colaboradores (1988), com modificações (Nadin et al., 2001; Hartmann et al., 2003; Fukumasu et al., 2006). Todo o procedimento deste ensaio foi

realizado sob baixa luminosidade devido à fotosensibilidade dos reagentes. Em resumo, lâminas de microscopia foram mergulhadas em gel de agarose mantido em banho-maria a 60°C e, após remoção do excesso com papel-toalha, foram secas em temperatura ambiente e em posição horizontal. Amostras de sangue periférico de todos os animais foram coletadas do plexo venoso periorbital com tubo microcapilar. Após coleta, o material foi transferido para um microtubo identificado. Este material foi misturado com agarose de baixo ponto de fusão (Low Melting Point) 0,5% e PBS livre de Ca^{++} e Mg^{++} . Uma alíquota de cada tubo foi aspirada para preparo de esfregaços individuais sobre as lâminas previamente revestidas de agarose normal. Para adesão adequada das células à agarose, as lâminas foram mantidas em geladeira por 5'. A seguir, procedeu-se à lise das células por 24h e dentro da geladeira, com detergentes (n-lauroil sarcosinato, SIGMA) e altas concentrações de sais (EDTA, NaCl, Tris, Dimetilsulfóxido e Triton X-100) para ruptura das membranas e liberação do DNA. A eletroforese foi realizada em condições alcalinas ($\text{pH} > 13$) com soluções de EDTA e NaOH. A neutralização desses álcalis foi feita com solução de tampão Tris (Invitrogen). A coloração foi realizada com prata pelo método descrito por (Nadin et al., 2001; Fukumasu et al., 2006). Para tanto, misturou-se em uma cubeta, 32mL da solução A (50g Na_2CO_3 q.sp. 1000mL de H_2O bidestilada), e 68mL da solução B (0,2g de NH_2NO_3 , 0,2g de AgNO_3 , 1g de ácido silicotungstênico, 500uL de formaldeído, q.s.p. 1000mL de H_2O bidestilada) por 1 minuto. Ao término da coloração, realizou-se banho de 5 minutos em solução finalizadora (1 mL de ácido acético q.s.p. 100 mL de água

bidestilada) e banho em H₂O bidestilada por 1 minuto. A quantificação dos cometas foi feita pela mensuração do comprimento total da estrutura, sob microscópio com aumento de 200X, em um sistema de análise de Imagens Pro-plus®, versão 4.5 (Media Cybernetics).

O processo de coloração pode ser feito com fluorescência pelo brometo de etídio, iodeto de propídio e cyber green ou pela coloração de prata. No entanto, comparando-se as colorações com brometo de etídio e prata há vantagens e desvantagens. Na coloração de fluorescência há necessidade de um microscópio de fluorescência para a análise das lâminas e se forem armazenadas para posterior observação necessitam passar novamente pelo processo de coloração, porque esta é perdida em um dia. Já com a coloração de prata não há necessidade de corar as lâminas novamente, podendo-se, portanto, armazená-las para análise posterior em microscópio de luz convencional, o que facilita o emprego do ensaio do cometa. Outra desvantagem do brometo de etídio é sua toxicidade e mutagenicidade, podendo causar sérios danos quando em contato com o indivíduo que realiza o procedimento, causando tosse e espirros quando inalados, desarranjos gastrointestinais, problemas no fígado, rins, irritações na pele e olhos. Na exposição crônica é um provável cancerígeno. Quando comparadas, as duas colorações não apresentam diferenças em relação aos resultados das imagens obtidas, sendo equivalentes (Nadin, 2001; Garcia, 2007). Comparado a outros ensaios de genotoxicidade, o ensaio do cometa apresenta vantagens como sensibilidade para detectar baixos níveis de danos no DNA, uso de pequena amostra de células, não necessita de

células em proliferação, avaliação de células individuais, simplicidade, baixo custo, rapidez para obtenção dos resultados e, finalmente flexibilidade, uma vez que pode ser usado para qualquer população de células, necessitando apenas de que estas sejam estáveis. Essas vantagens têm favorecido o uso desse ensaio em avaliação de potencial genotóxico de agentes químicos industriais, aditivos alimentícios, biocidas, agroquímicos e medicamentos (Brendler-Schwaabe et al., 2005).

Figura 6. Classificação morfológica de cometa segundo a intensidade das lesões (Speit, 1995).

3.9.2. Protocolo - Micronúcleo

O teste do micronúcleo foi realizado baseado no protocolo de MacGregor (1987). Os esfregaços foram preparados de acordo com as *Figuras 4 e 5*. Após a eutanásia dos animais, amostras da medula óssea do fêmur foram coletadas o mais rápido possível, imersas em 3 mL de soro bovino fetal, onde foram ressuspensas por várias vezes, assegurando uma distribuição ao acaso das células nos ensaios FCA. Em seguida, foram preparados os esfregaços desta suspensão, em duas lâminas para cada animal, as quais foram secas à temperatura ambiente e coradas após 24h pelo corante Leishman (eosina-azul de metileno, MERCK). A análise de eritrócitos policromáticos (PCEs) e normocromáticos (NCEs) foi realizada sob microscopia óptica, em primeiro lugar sob aumento médio (200 a 400x) para encontrar campos com boa qualidade técnica, onde as células estivessem bem espalhadas e coradas apropriadamente. Após localizar esse campo, foi feita a análise das células para detecção de micronúcleos, sob aumento de 1000x (objetiva de imersão). Foram analisadas 1000 células policromáticas (PCEs) por animal para 8-10 animais do mesmo sexo, por grupo de tratamento.

Figura 7. Esquema da formação do micronúcleo. (A) Esquema mostrando a origem do MN, a partir de um erro na divisão mitótica, com liberação de fragmentos de cromossomo ou de um cromossomo inteiro. (B) Micrografia de linfócito (mitógeno-estimulado e com bloqueio da citocinese) contendo um MN (Fenech et al., 2006).

3.10. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software Jandel Sigma Stat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Os dados para o peso corpóreo, ganho de peso, peso relativo do fígado, consumo de ração e LETE, número e área de FHA positivo pela GST-P, número e multiplicidade de FCA foram analisados pelos testes ANOVA ou Kruskal-Wallis. Os dados do cometa e micronúcleos foram analisados pelos testes Kruskal-Wallis seguidos pelos Testes de Dunn para comparações múltiplas (cometa) e χ^2 (micronúcleo). As diferenças significativas foram adotadas quando o valor de p era $<0,05$.

4. RESULTADOS

A *Tabela 1* e a *Figura 3* apresentam os valores de peso corpóreo inicial e final, consumo de ração e LETE nos diferentes grupos experimentais do ensaio de FCA. Não houve alterações significativas que pudessem correlacionar a ingestão do LETE. A *Tabela 1.1* apresenta os dados do efeito do LETE nos focos de criptas aberrantes e multiplicidade de criptas nos cólons médio e distal nos 4 grupos experimentais do ensaio de FCA. A ingestão do LETE não indicou aumento do número de criptas aberrantes em relação ao controle positivo. Houve morte de 7 animais pós hepatectomia parcial. A *Tabela 2* e a *Figura 4* apresentam os valores do peso corpóreo inicial e final, consumo de ração e LETE nos diferentes grupos experimentais expostos ao LETE do ensaio de FHA. Os animais apresentaram perda de peso significativa e diminuição no consumo de ração no grupo tratado com 10.000 ppm em relação ao grupo controle negativo. A *Tabela 2.1* não apresentou aumento do número e área de focos de hepatócitos alterados em relação ao grupo do controle positivo. Também, o LETE não indicou aumento de genotoxicidade (cometa) e mutagenicidade (micronúcleo) em ambos os ensaios FCA e FHA, conforme as *Tabelas* a seguir: 4 (G=III e IV); 5 (G=III, IV e V); 6 (G=III, IV e V) e 7 (G=IV e V) em relação ao grupo controle positivo.

Tabela 2. Peso corpóreo inicial e final, ganho de peso, consumo de ração e LETE nos diferentes grupos experimentais expostos ao LETE durante 10 semanas.

Grupos/Tratamento	Número de ratos	Peso corpóreo inicial (g)	Peso corpóreo final (g)	Ganho de peso (g)	Consumo de ração (g/rat/dia)	Consumo de LETE (g/kg/dia)
GI= Controle Negativo	10	254,00±9,11	411,00±22,99	155,70±9,90	23,72±4,37	-
GII= DMH	10	263,00±15,63	412,00±21,63	155,90±15,56	22,98±3,58	-
GIII=DMH+10.000ppmLETE	10	260,00±18,66	408,00±29,20	141,80±19,09	23,25±2,76	0,66±0,09
GIV=DMH+50.000ppmLETE	10	265,00±19,48	400,00±38,47	139,50±24,04	25,33±2,76	3,68±0,42

Valores de Média±DP - **DMH** = 1,2- dimetilhidrazina (4x40mg/Kg, s.c.); **LETE** 10.000 e 50.000 ppm. Na ração durante 10 semanas; iniciado na 2ª semana.

Figura 8. Peso corpóreo dos animais ao longo das 8 semanas - Estudos de focos de criptas aberrantes (FCA).

Tabela 2.1. Efeito do LETE nos focos de criptas aberrantes (FCA) multiplicidade de criptas (Criptas/FCA) no cólon médio e distal.

Número de criptas aberrantes por FCA							
Grupos/Tratamento	Número de ratos	1 Cripta	2 Criptas	3 Criptas	Total número CA	Total número FCA	Criptas/FCA
Cólon Médio							
GI=Controle Negativo	0	0	0	0	0	0	0
GII= DMH	8	19,50±21,53	33,50±19,24	43,88±35,10	232,00±136,40	94,75±53,62	2,44±0,35
GIII=	8	14,00±7,23	29,50±6,33	40,00±17,05	215,00±75,30	83,50±25,34	2,58±0,28
DMH+10.000ppmLETE							
GIV=DMH+	8	11,00±6,12	28,88±5,99	45,00±18,28	232,13±85,02	84,88±25,68	2,69±0,29
50.000ppmLETE							
Cólo Distal							
GI=Controle Negativo	0	0	0	0	0	0	0
GII= DMH	8	9,13±4,39	36,63±15,81	35,50±15,46	202,00±78,15	81,63±29,97	2,46±0,88
GIII=DMH+10.000ppm	8	7,63±6,41	25,50±13,35	34,63±24,02	177,63±114,85	67,75±41,29	2,63±0,22
LETE							
GIV=DMH+50.000ppm	8	5,50±5,10	21,50±15,15	25,13±15,57	137,75±79,83	52,13±29,51	2,64±0,30
LETE							

Valores de Média±DP - **DMH** = 1,2- dimetilhidrazina (4x40mg/Kg b.w., s.c.); **LETE** 10.000 e 50.000 ppm. Na ração durante 10 semanas; iniciando na 2ª semana do experimento. **CA** = Criptas abertantes **FCA** = Focos de criptas aberrantes. Teste Kruskal Wallis diferenças significativas foram adotadas quando $p < 0,05$.

Tabela 3. Peso corpóreo inicial e final, ganho de peso, consumo de ração e LETE nos diferentes grupos experimentais expostos ao LETE durante 8 semanas.

Grupos/Tratamento	Número de ratos	Peso corpóreo inicial (g)	Peso corpóreo final (g)	Ganho de peso (g)	Consumo de ração (g/rat/dia)	Consumo LETE (g/kg/dia)
GI= Controle Negativo	19	267,00±15,55	417,04±28,32	155,11±26,16	25,62±8,50	-
GII= DEN	16	279,05±15,20	381,09±24,01	108,06±19,80	21,84±5,62	-
GIII= DEN+10.000ppmLETE	20	265,00±17,95	398,05±32,65	130,85±1,41	3,21±5,70*	0,71±0,13*
GIV= DEN+50.000ppmLETE	17	273,00±19,10	399,04±44,82	128,47±16,60	25,01±6,77	3,81±0,75

Valores de Média±DP - **DEN** = dietilnitrosamina (200mg/Kg, i.p.); **LETE** 10.000 e 50.000 ppm. Na ração durante 8 semanas; iniciando a partir da 2ª semana do experimento. *p<0,05 (teste Kruskal Wallis).

Figura 9. Peso corpóreo dos animais ao longo de 6 semanas - Estudos de focos de hepatócitos alterados.

Tabela 3.1. Número e área de focos de hepatócitos alterados preneoplásico GST-P-positivo no fígado de ratos machos Wistar não iniciados e iniciados até o fim do experimento.

Grupos/Tratamento	Número de ratos	Peso relativo do fígado (%)	Focos GST-P+	
			Número (focos/cm ²)	Área (mm ² /cm ²)
GI= Controle Negativo	19	3,87±0,49	-	-
GII= DEN	14	3,96±0,52	6,02±3,20	0,20± 0,12
GIII= DEN+10.000ppmLETE	14	3,86±0,40	2,58±2,13*	0,12±0,08*
GIV= DEN+50.000ppmLETE	14	4,23±0,62	5,79±2,72	0,29±0,21

Valores de Média±DP - **DEN** = dietilnitrosamina (200mg/Kg, i.p.); **LETE** 10.000 e 50.000 ppm, na ração, durante 8 semanas; iniciando na 2ª semana do experimento. *p<0,05 (teste Kruskal Wallis).

Tabela 4. Medidas totais das lesões do DNA em linfócitos de sangue periférico de ratos expostos com 10.000 e 50.000 ppm de LETE por 8 semanas - Ensaio de focos de criptas aberrantes (FCA).

Grupos/Tratamentos	Números de animais	Comprimento do cometa (µm)
CN ¹	5	39,42±11,81e
CP=MNU ²	7	63,33±0,66a
CP=DMH ³	7	69,60±60,39b
DMH+10.000ppmLETE ⁴	10	40,37±12,14c
DMH+50.000ppmLETE ⁵	10	46,17±11,16d

Valores de Média±DP - 1. Controle negativo; 2. Controle positivo; 3. Controle positivo interno; 4. e 5. Substâncias teste - a vs b, p>0,05; a vs c, p<0,05; a vs d, p>0,05; a vs e, p>0,05; b vs e, p>0,05; c vs e, p>0,05; d vs e, p>0,05. Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. As diferenças significativas foram adotadas quando p<0,05.

Tabela 5. Medidas totais das lesões do DNA em linfócitos de sangue periférico de ratos com 10.000 e 50.000 ppm de LETE por 6 semanas - Ensaio de focos de hepatócitos alterados (FHA).

Grupos/Tratamentos	Número efetivo de animais	Comprimento do cometa (µm)
CN ¹	5	39,42±11,81e
CP=MNU ²	7	63,33±0,66a
CP=DEN ³	9	58,25±11,49b
DEN+10.000ppmLETE ⁴	11	65,01±15,75c
DEN+50.000ppmLETE ⁵	7	44,38±1,64d

Valores de Média±DP - 1. Controle negativo; 2. Controle positivo; 3. Controle positivo interno; 4. e 5. Substâncias teste - a vs b, $p>0,05$; a vs c, $p<0,05$; a vs e, $p>0,05$; b vs e, $p>0,05$; c vs e, $p>0,05$. Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn para comparações múltiplas. As diferenças significativas foram adotadas quando $p<0,05$.

Tabela 6. Frequência de micronúcleos (PCEs) em medula de ratos com 10.000 e 50.000 ppm de LETE por 8 semanas.

Ensaio de focos de criptas aberrantes (FCA).

Grupos/Tratamento	Número efetivo de animais	Número de PCEs Analisados	PCEMNs		Relação PCE/NCE
			Nº	(%)	
CN ¹	10	10000	37	(0,37)e	1,26
CPMNU ²	10	10000	270	(2,7)a	1,07
CP/DMH ³	10	10000	70	(0,70)b	1,38
DMH+10.000 ppmLETE ⁴	10	10000	57	(0,57)c	1,25
DMH+50.000 ppmLETE ⁵	10	10000	59	(0,59)d	1,16

1. Controle negativo; 2. Controle positivo; 3. Controle positivo interno; Concentrações 4. e 5. - Substância teste. a vs e, $p < 0,001$; a vs b, $p < 0,001$, a vs c, $p < 0,001$; a vs d, $p < 0,001$; c vs e, $p = 0,049$; d vs e, $p = 0,032$. Para o teste χ^2 as diferenças significativas foram adotadas quando $p < 0,05$.

Tabela 7. Frequência de micronúcleos (PCEs) em medula de ratos com 10.000 e 50.000 ppm de LETE por 6 semanas

Ensaio de hepatócitos alterados (FHA).

Grupos/Tratamento	Número efetivo de animais	Número de PCEs Analisados	PCEMNs	Relação PCE/NCE
			N° (%)	
CN ¹	19	190000	33 (0,33)b	1.22
CPMNU ²	10	10000	270(2.7)a	1.07
CPDEN ³	16	160000	21 (0.21)c	1.43
DEN+10.000ppm LETE ⁴	20	20000	63 (0.63)d	1.63
DEN+50.000ppm LETE ⁵	18	180000	42 (0.42)e	1.44

1. Controle negativo; 2, Controle positivo; 3. Controle positivo interno; 4. e 5. Concentrações 1 e 2 - Substância teste. a vs b, $p < 0,001$; a vs c, $p < 0,001$; a vs d, $p < 0,001$; a vs e, $p < 0,001$; b vs c, $p = 0,384$; a vs d, $p = 0,007$; a vs e, $p = 0,246$. Teste X^2 as diferenças significativas foram adotadas quando $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

No Estado de São Paulo, em meados do século XIX, o governo da província de São Paulo demonstrava preocupação com o saneamento básico. Aquele governo inaugurou o primeiro distrito de esgoto em 1883, no bairro da Luz, quando a cidade de São Paulo tinha somente cerca de 20.000 habitantes. Atualmente, o governo paulista reconhece que “o ambiente salubre, indispensável à segurança sanitária e à melhoria da qualidade de vida, é direito de todos, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de assegurá-lo” (www.rekursoshidricos.sp.gov.br/acesso-10.10.08). Mais de um século após a inauguração do 1º distrito de esgoto, em 1992, promulgou-se a lei 7.750, que dispõe sobre a política estadual de saneamento básico de São Paulo, porém ainda hoje vivemos uma situação grave quanto ao tratamento de esgoto doméstico no Estado de São Paulo (Martinelli et al., 2002). Apesar desta preocupação histórica do governo paulista com saneamento básico, chegamos ao século XXI com graves problemas. Por um lado, praticamente 76% de todo esgoto domiciliar gerado no Estado é recolhido por redes de esgoto. Entretanto, somente cerca de 17% do volume gerado no Estado sofre algum tipo de tratamento. Considerando-se a população total de cada município (rural + urbana), o percentual de esgoto tratado cai para 15%. Como uma pequena parte do esgoto produzido é tratada, a carga poluidora remanescente é próxima da carga poluidora potencial e ambas são função direta do número de habitantes que vivem principalmente nos grandes centros urbanos. Assim,

não é surpreendente que somente 30 municípios, os quais congregam 58% da população do Estado, são responsáveis por cerca de 70% da carga domiciliar poluidora remanescente. Somente a região da Grande São Paulo congrega nove municípios, responsáveis por 48% da carga poluidora remanescente de todo o Estado (Martinelli et al., 2002).

Os rios e córregos da Grande São Paulo recebem diariamente alta carga poluidora lançada por imóveis residenciais cujas redes internas não estão ligadas à rede pública coletora de esgoto. Proprietários de imóveis se recusam a conectar as tubulações internas e externas para se livrar do custo dos serviços de coleta de esgoto, que faz dobrar o valor da conta de água. A resistência ameaça altos investimentos realizados pelos governos municipal, estadual e federal na área de saneamento, além de prejudicar sobremaneira o meio ambiente e a saúde pública. Há programas caros em andamento, como o Programa Córrego Limpo, que exigirá investimentos de R\$ 200 milhões para despoluir mais de 300 cursos d'água da capital em dez anos. A ação impedirá a contaminação de mananciais e evita que, nas enchentes, as águas da chuva se misturem ao esgoto não tratado, agravando os riscos dos moradores de áreas atingidas. O Programa de Mananciais, que prevê despoluição das represas Billings e Guarapiranga, consumirão R\$ 1,22 bilhão. Também, a Operação Defesa das Águas, conduzida pelo Estado e pela Prefeitura visa congelar o número de ocupações em áreas de manancial. O próprio Projeto Tietê corre risco, devido à resistência dos proprietários de imóveis em conectar as redes internas e pública (O Estado de São Paulo, p.A3, 19.09.2008).

O setor têxtil é classificado como de alto potencial poluidor, pois apresenta elevado consumo de água e energia elétrica, utiliza produtos tóxicos em seus processos, produz e lança grandes volumes de efluentes, que quando tratados, geram quantidades elevadas de lodo (Mathur et al., 2007; Sharma et al., 2007). O destino final desse lodo é um grande problema, pois nesses resíduos podem estar presentes altas concentrações de substâncias tóxicas conhecidas e desconhecidas, bem como os seus produtos de transformação, que podem ser produzidos durante o próprio tratamento ou ainda no meio ambiente por processos bióticos e abióticos. Devido a esses fatores, determinar quimicamente todos os toxicantes presentes em amostras de lodo é uma tarefa impraticável (Kapenen, Itavaara, 2001; Wilke et al., 2008).

Nos Estados Unidos, o programa de utilização de biossólidos funciona desde 1970, de tal modo que cerca de 60% do LETE gerado são usados como fertilizantes e não mais incinerados ou enterrados. Mas ainda existem muitas dúvidas quanto ao uso deste devido a seu impacto potencial sobre a saúde humana, animal e vegetal (USEPA, 1995).

O clima tropical predominante em nosso país proporciona condições muito favoráveis ao cumprimento dessas premissas, possibilitando a escolha de tecnologias de tratamento de esgoto. No entanto, o lodo mais adequado para o solo brasileiro seria o lodo com estabilização química à base de cal, elevando o pH e destruindo a maior parte dos microorganismos patogênicos. Por outro lado, a higienização de lodos por meio de produtos alcalinos, associados à existência de solos predominantemente ácidos na maioria das

regiões brasileiras, permite-nos também adotar esta prática, agregando valor ao biossólido produzido, o que pode substituir total ou parcialmente o uso de corretivos agrícolas (Adreoli et al., 2001).

Os lodos de esgotos contêm nutrientes e matérias orgânicas que podem fornecer benefício ao solo e são largamente utilizados como corretivo agrícola no solo. Eles também contêm contaminantes incluindo metais, patógenos e poluentes orgânicos (Harrison et al., 2006). A “Bacia hidrográfica” é definida como determinada área de drenagem contida por um divisor de águas e delimitada pela topografia de uma região. Trata-se de um sistema terrestre e aquático, geograficamente definido por características físicas, econômicas e sociais. No entanto, até o momento, apenas os lodos gerados pela CAESB/Brasília, SABESP/Franca, CSJ/Jundiaí, SANASA/Campinas e SANEPAR/Curitiba estão sendo utilizados na agricultura (www.google.com.br/acesso-23.03.09).

Avaliações relativas ao potencial toxicogenético de substâncias químicas são utilizadas para detecção de efeitos iniciais importantes relacionados ao processo cancerígeno. A exposição a substâncias químicas genotóxicas podem causar danos, resultar no estabelecimento de mutações em genes específicos os quais, subsequentemente, podem determinar vantagens de crescimento que favorecem a promoção e progressão neoplásica (Krishna, Hayashi, 2000).

A carcinogênese ou oncogênese é um processo dinâmico, de múltiplas etapas, que envolve alterações celulares, moleculares e morfológicas, sustentadas por modificações na expressão de genes que

coordenam atividades essenciais da célula, como proliferação, diferenciação e apoptose (Ochiai et al., 2003; Agner et al., 2003). A indução do câncer quimicamente envolve múltiplas etapas: **Iniciação** - é caracterizada pela formação de uma célula preneoplásica resultado de uma mutação fixa em torno da síntese de DNA; **Promoção** - é o estágio que envolve a expansão clonal seletiva da célula iniciada através do aumento do crescimento celular ou a diminuição na apoptose; **Progressão** - é um evento genotóxico que resulta na mudança do estado preneoplásico. Neste estágio as mudanças são irreversíveis na integridade cromossomal. Os processos de danos do genoma seguido pela expansão clonal das células do DNA eventualmente se transformam em neoplasma. A carcinogênese química tem demonstrado o impacto de todos os estágios do processo da tumorigênese. Isto tem demonstrado, aparentemente, que agentes químicos e físicos que induzem ao câncer podem ocorrer através de diferentes mecanismos celulares e moleculares. Carcinógenos químicos (epigenéticos não genotóxicos) são agentes que funcionam como indutor da formação pelo mecanismo exclusivo de forma direta na modificação ou danos do DNA. Estes agentes aparecem para modular o crescimento e morte celular e relacionar a dose-resposta entre exposição e formação do tumor. O mecanismo exato ou exclusivo pelo qual estes agentes funcionam não está bem estabelecido (Klauning et al., 2000).

No presente estudo, foi investigado o potencial genotóxico e cancerígeno na ingestão diária do lodo de estação de tratamento de esgoto (LETE), em ratos Wistar, utilizando os modelos de média-duração para o

cólon e fígado. Para avaliar os efeitos os animais receberam ração suplementada com 1 e 5% de LETE. Para quantificar as criptas aberrantes do cólon foi utilizada a microscopia óptica (4x), enquanto que para a identificação dos focos de hepatócitos alterados realizou-se a imunohistoquímica.

As lesões consistem de focos e nódulos que na sua maioria mostram características de nódulos de remodelação, os quais tendem a regredir e adquirir aspecto semelhante ao do parênquima hepático normal. Poucos nódulos persistem, podendo progredir e originar o hepatocarcinoma (Enomoto, Farber, 1982; Tatematsu et al., 1983).

Como o lodo analisado foi obtido de uma estação de tratamento que recebe os efluentes de indústrias têxteis e tinturiais e esgoto doméstico, foi necessário realizar os testes de genotoxicidade (cometa) e mutagenicidade (micronúcleo) em duas espécies diferentes: ratos *Wistar* e camundongos *Swiss*. Entretanto, no presente documento serão apresentados somente os dados relacionados aos ensaios dos ratos *Wistar*, conforme os protocolos citados acima. Os dados dos camundongos serão apresentados em artigo científico.

De acordo com as análises químicas, realizadas pela CETESB, dos lotes coletados na estação de tratamento de esgoto pertencente à bacia hidrográfica Piracicaba, Capivari e Jundiaí foi constatado que havia os seguintes metais: Arsênio, Bário, Cádmio, Chumbo, Cobre, Cromo, Mercúrio, Molibdênio, Níquel, Selênio, Zinco, Alumínio, Antimônio, Boro, Cianeto, Cobalto, Estanho, Ferro, Fluoreto, Prata, Sulfato, Vanádio, Cálcio total,

Fósforo total, Magnésio total, Potássio total, Sódio. Entretanto, nenhum dos metais acima citados apresentaram valores superiores aos do CONAMA e CETESB, que são os órgãos responsáveis pelas regulamentações e fiscalização.

Os animais de laboratórios como ratos e camundongos são as espécies mais relevantes para avaliação de alterações que servirão como “*endpoint*” biológico. Os testes de genética toxicológica exigidos para regulamentação de substâncias químicas constituem uma série de testes de mutagenicidade, bem definidos, para detectar substâncias com potencial mutagênico (Haley, 2003; Moranpot, 2006).

É nesse contexto que a avaliação toxicológica do LETE como um todo difere dos estudos convencionais, pois trata-se de uma mistura complexa e variável em sua composição. Com relação a seus componentes (metais pesados e microorganismos) seria possível utilizar bancos de dados toxicológicos disponíveis de forma isolada para cada um deles. No entanto, como o lodo é uma mistura complexa, foram realizadas a avaliação de toxicidade oral sistêmica de 28 e 90 dias (sobreaguda e subcrônica), que seguiram os “*guidelines*” da OECD nº 407 (1997) e nº 408 (1998). Os animais foram distribuídos em 4 grupos de acordo com os níveis de LETE na ração (controle negativo, 5.000, 10.000 e 50.000 ppm). Foram realizadas necrópsia completa, análises hematológicas, bioquímica, uroanálises e histologia dos órgãos como: cérebro, coração, pulmão, fígado, rins, bexiga, intestino, baço, pâncreas. Do total de 120 animais estudados, 116 animais foram utilizados para avaliação dos testes de genotoxicidade (teste do

cometa - sangue periférico) e mutagenicidade (teste do micronúcleo - medula óssea). Os testes de toxicidade sistêmica indicaram que a matriz complexa avaliada possui atividade tóxica oral inexpressiva, não exercendo efeitos significativos sobre a evolução do peso corpóreo e consumo de água, ração basal e LETE em ratos, mesmo administrada em doses muito elevadas (50.000 ppm) e, por período relativamente longo, 90 dias (Solano et al., 2009; Luvizutto et al., 2008), a escolha das doses de 10.000 e 50.000 ppm do LETE dos ensaios de FCA e FHA foram feitas a partir dos estudos preliminares citados acima. Os dados das *Tabelas 2, 2.1, 3 e 3.1* referentes aos ensaios de carcinogenicidade apresentaram desvio padrão um pouco elevado, portanto, foi necessário retirar 2 animais de cada grupo.

Em resumo, os resultados dos ensaios de média-duração em roedores podem ser usados como screening na avaliação de matrizes complexas como o lodo de estação de tratamento de esgoto, e também na estimação do potencial de risco à população humana.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que os resultados do presente estudo forneceram dados importantes do perfil toxicológico do lodo de estação de tratamento de esgoto, que servirão como base para estimar o potencial de risco de eventual exposição à saúde humana e ao meio ambiente. Portanto, também poderão ser utilizados como suporte técnico nas decisões de legislação, quanto à produção e uso do lodo de esgoto de áreas urbanas.

7. ANEXOS

7.1. Determinações químicas de substâncias inorgânicas e outros parâmetros de caracterização do lodo de esgoto da ETE PCJ-1 e limites máximos segundo Resolução CONAMA 375 de 2006.

Parâmetros	Concentração massa bruta de lodo (mg/Kg) base seca	
	PCJ-1	CONAMA 375
Arsênio	< 2,00	41
Bário	573	1300
Cádmio	5,41	39
Chumbo	102	300
Cobre	317	1500
Cromo	106	1000
Mercúrio	< 0,10	17
Molibdênio	< 15,0	50
Níquel	51,7	420
Selênio	4,2	100
Zinco	1095	2800
Alumínio	10240	-
Antimônio	187	-
Boro	31,9	-
Cianeto	< 3,0	-
Cobalto	< 4,00	-
Estanho	< 75,0	-
Ferro	16160	-
Fluoreto	5,89	-
Prata	< 1,00	-
Sulfato	9798,04	-
Vanádio	50,9	-
Cálcio total	16310	-
Fósforo total	6000	-
Magnésio total	1622	-
Potássio total	528	-
Sódio	274	-
Outros parâmetros		
pH	6,19	-
Sólidos voláteis (%)	54	-
Umidade (%)	30	-

Data de coleta da amostra (2/4/2007)

Verifica-se que a concentração de nenhum metal analisado no lodo PCJ-1 excedeu o limite estabelecido pela Resolução CONAMA 375 (BRASIL, 2006).

7.2. Descrição da ETE Barueri - 2008

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

Descrição da Estação de Tratamento de Esgotos – Barueri

LEGENDA DO FLUXOGRAMA SIMPLIFICADO

- 0 - POÇO DE DISTRIBUIÇÃO
- 1 - GRADE GROSSEIRA
- 2 - ESTAÇÃO ELEVATÓRIA DE ESGOTO BRUTO
- 3 - GRADE MECANIZADA MÉDIA
- 4 - CAIXA DE AREIA AERADA
- 5 - DECANTADOR PRIMÁRIO
- 6 - TANQUE DE AERAÇÃO
- 7 - DECANTADOR SECUNDÁRIO
- 8 - COMPRESSORES
- 9 - ADENSADOR POR FLOTAÇÃO
- 10 - ADENSADOR POR GRAVIDADE
- 11 - DIGESTOR ANAERÓBIO
- 12 - GASÔMETRO
- 13 - MEDIDORES DE GÁS
- 14 - TANQUE DE ESTOCAGEM DE LODO
- 15 - SISTEMA DE ESTOCAGEM E DOSAGEM DE CLORETO FÉRRICO
- 16 - SISTEMA DE DOSAGEM E EXTINÇÃO DE CAL VIVA
- 17 - FILTRO PRENSA

ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTOS DE BARUERI

01. CARACTERÍSTICAS GERAIS

A unidade de Negócio de Tratamento de Esgotos – MT é responsável pela interceptação, tratamento e disposição final do esgoto do Sistema Principal da Região Metropolitana de São Paulo.

O Sistema Principal de Esgotos da RMSP é constituído por cinco Sistemas de Tratamento, a seguir:

- ETE ABC
- **ETE Barueri**
- ETE Parque Novo Mundo
- ETE São Miguel
- ETE Suzano

Os cinco Sistemas de Tratamento juntos possuem capacidade de tratamento de 18.000 l/s.

O Sistema Principal compõe-se ainda de 130 quilômetros de interceptores, sifões, travessias e emissários com diâmetro variando de 0,60

m a 4,50 m e trata atualmente 11.000 l/s, beneficiando uma população de aproximadamente 6.500.000 habitantes.

A RMSP foi dividida em duas grandes áreas para efeito de esgotamento sanitário. A área central e densamente urbanizada comporta um sistema integrado, denominado “Sistema Principal”, e engloba as bacias drenantes aos rios Tietê, Pinheiros e Tamanduateí, e algumas sub-bacias drenantes aos reservatórios Guarapiranga e Billings.

As demais áreas, situadas em regiões periféricas, com menor grau de urbanização, serão servidas por sistemas próprios, denominados “Sistemas Isolados”.

Nesta oportunidade iremos abordar apenas a ETE Barueri.

Estação de Tratamento de Esgotos Barueri

Localização

A ETE está localizada no município de Barueri, na margem esquerda do Rio Tietê, em terreno limitado por este curso d'água e pela estrada de ferro da CPTM. Serve a maior parte da cidade de São Paulo e aos municípios de Jandira, Itapevi, Barueri, Carapicuíba, Osasco, Taboão da Serra e partes de Cotia e Embu.

Histórico

A ETE Barueri foi projetada na década de 70 para tratar 63.000 litros de esgoto por segundo. Com a revisão e atualização do Plano Diretor da RMSP – COPLADES, em 1985, o volume de esgoto a ser tratado passou para 28.500 litros por segundo.

Início de operação: 11/05/1988

Vazão média de projeto: 9.500 l/s

População atendida considerando a vazão de projeto: 4.460.000 habitantes

Vazão média de tratamento: 7.000 l/s

Tratamento do Esgoto: O processo de tratamento é por lodo ativado do tipo convencional, em nível secundário, com eficiência de 90% baseada na remoção de carga orgânica, expressa em DBO.

02. UNIDADES DE TRATAMENTO

Devido às grandes distâncias existentes entre as diversas unidades constituintes do processo de tratamento, optou-se por uma concepção de projeto onde as informações provenientes do sistema de instrumentação, fossem centralizadas em 9 (nove) painéis de controle, em locais estrategicamente distribuídos na planta.

De acordo com essas centrais de informações, a estação foi subdividida em 9 (nove) áreas, cujas características básicas serão descritas a seguir.

ÁREA 1 – Poço Distribuidor e Elevatória Final

O esgoto chega à ETE através do interceptor Tietê Oeste Margem Sul (ITI-6), instalado a cerca de 30 metros de profundidade, que encaminha o fluxo ao poço distribuidor, onde, por bombeamento, é recalcado até o canal afluente às grades mecanizadas.

Devido às baixas velocidades do esgoto no poço, foi prevista a construção de um pórtico móvel, que, através de guindaste provido de caçamba tipo “*Clam Shell*”, promove, periodicamente, a remoção do material sedimentado e da espuma. O poço é também equipado com sistema de insuflamento de ar, para a eliminação dos gases liberados pelo esgoto. A água residuária é recalcada a uma altura geométrica de cerca de 30m, por intermédio de 4 (quatro) conjuntos elevatórios, operando com motores de 3.100 HP, de velocidade variável e fixa. Cada conjunto trabalha com vazões na faixa de 3 a 6 m³/s. Está prevista a entrada em funcionamento de um sistema de instrumentação que permitirá o controle automático de velocidade de rotação das bombas, de modo a manter o nível desejado no poço distribuidor.

ÁREA 2 - GRADES MECANIZADAS, CAIXAS DE AREIA E TANQUES DE PRÉ-AERAÇÃO

As grades recebem o esgoto bombeado através de canais cobertos e aerados com difusores de bolha grossa, com intuito de evitar problemas de odores e a sedimentação de sólidos em suspensão. A referida unidade é constituída por barras paralelas fixadas em posição inclinadas em 60 graus com a horizontal e espaçadas de 1 polegada entre si. O material retido é removido através de um sistema de rastelos de acionamento automático. O controle de acionamento automático de rastelos é efetuado por tempo ou perda de carga (diferença de nível do fluido à montante e jusante da grade). Concomitante ao sistema de rastelos ocorre o acionamento de uma correia transportadora, que encaminha o material removido para as caçambas especialmente destinadas a este fim.

Os sólidos suspensos, de elevado peso específico, são removidos em duas caixas de areia. Estas unidades são do tipo aerada de fluxo orbital, que se caracterizam pela remoção do material com baixo teor de matéria orgânica, eliminando assim, a necessidade de dispositivos de lavagem. A taxa de ar, nessas unidades, é controlada automaticamente por instrumentação apropriada. O material depositado é removido periodicamente através de guindastes providos de caçambas tipo "*Clam Shell*".

Devido às características sépticas apresentadas pelo esgoto em função do longo tempo de trajeto até a estação, foi prevista a execução de tanques de pré-aeração no sentido de controlar odores. O ar é introduzido à massa líquida, através de difusores de bolha grossa, a uma taxa também controlada automaticamente por sistema de instrumentação.

ÁREA 3 – Decantadores Primários

A remoção dos sólidos em suspensão é realizada em unidades de decantação primária de forma retangular, com 95 metros de comprimento, 18 metros de largura e 3,5 metros de altura útil. O material sedimentado e a espuma são encaminhados para a cabeceira dos tanques, através de pontes removedoras de funcionamento contínuo e conduzidos, por conjuntos elevatórios, ao tratamento sólido (Área6).

ÁREA 4 – Tanques de Aeração e Compressores

O esgoto decantado é conduzido a tanques de aeração de forma retangular com 130m de comprimento, 25 de largura e 6m de altura útil. Junto ao fundo, uma malha de 8500 difusores de bolha fina promovem a aeração do fluido. Os 8 (oito) tanques de aeração foram projetados para operar pelo sistema de mistura completa, havendo entretanto possibilidades físicas para que quatro unidades possam operar sob regime de fluxo de pistão.

O suprimento de ar para os tanques de aeração e tratamento preliminar é efetuado por 4 (quatro) compressores do tipo centrífugo multiestágio de 60.000 SCFM (102.000 N.m₃/h). Os 4 (quatro) compressores instalados tem capacidade para atender a demanda de 2 (dois) módulos de tratamento.

ÁREA 5 – Decantadores Secundários

A separação da massa biológica dos tanques de aeração se realiza em clarificadores circulares com diâmetro interno de 46m e 4m de profundidade.

A extração do lodo do fundo se dá por dispositivos de sucção (por gradiente hidráulico), sistema esse que permite a retirada do lodo ao longo de todo o fundo do decantador, reduzindo os riscos de anaerobiose. O lodo assim recolhido é encaminhado às elevatórias de lodo ativado, sendo recirculado, em parte, para o tanque de aeração e o excesso para os adensadores por flotação.

As elevatórias de recirculação de lodo ativado estão dimensionadas para trabalhar com taxas de recirculação na faixa de 30% a 90%. A taxa de recirculação é fixada e controlada automaticamente por intermédio de instrumentação apropriada. Existem, ainda, dispositivos que permitem a automação do controle do descarte do lodo em excesso, através de derivação da linha de retorno ou diretamente do “*mixed liquor*” (descarte hidráulico). Quando se utiliza a primeira forma de descarte, o lodo é

conduzido para o tratamento da fase sólida por bombeamento em conjuntos elevatórios, especialmente destinados a esse fim (elevatória de excesso de lodo). Por outro lado, quando se utiliza o descarte hidráulico (via “*mixed liquor*”), o lodo é recirculado por gravidade para o início do tratamento. Os clarificadores contam, ainda, com sistema de retirada e bombeamento de espuma.

ÁREA 6 – Adensadores, Digestores e Gasômetro

O projeto prevê o adensamento do lodo primário em adensadores por gravidade e do lodo ativado em adensadores por flotação.

Estão instalados 4 (quatro) adensadores circulares de diâmetro interno de 29m e profundidade da lâmina d'água de 3,5m (lateral). Foram previstos dispositivos para a adição de água de diluição ao lodo, de modo a garantir uma taxa de aplicação superficial adequada à prevenção de odores. O controle da vazão de diluição é efetuado através de sistema de instrumentação apropriado.

Foram instalados 6 (seis) unidades circulares de flotação com 14,60m de diâmetro e volume de 535m³. Os flotadores promovem o adensamento dos sólidos provenientes do tratamento biológico, reduzindo de forma significativa o volume a tratar nas unidades subsequentes de tratamento. Água pressurizada saturada de ar é injetada no fundo do flotador junto com o lodo para auxiliar a flotação do lodo biológico. O lodo mistura-se com

bolhas de ar num cilindro situado na parte inferior da estrutura central do removedor de superfície. A separação lodo-água realiza-se na saia, onde o flotado passa por cima e a água passa por baixo, até a chicana periférica do flotador, extravasando ao poço de água de recirculação e de subenadante dos flotadores.

O líquido retirado na operação retorna à entrada da ETE via DFU, os lodos flotados e acumulados no fundo são conduzidos por gravidade até os postos de lodo, a partir dos quais são bombeados para a digestão.

O lodo adensado por gravidade e por flotação é estabilizado em 8 (oito) digestores de cobertura fixa e volume útil de 10.492 m³. As unidades de digestão foram projetadas de modo a proporcionar grande flexibilidade operacional. A mistura do conteúdo dos digestores é efetuada através de recirculação por compressores de parte do gás produzido.

O gás resultante da decomposição biológica é encaminhado para o gasômetro e deste para os queimadores.

ÁREAS 7 e 8

Compreendem as áreas de controle operacional da ETE, localizadas no edifício administrativo.

ÁREA 9 – DESIDRATAÇÃO E CONDICIONAMENTO QUÍMICO DO LODO

O lodo digerido é enviado por bombeamento ou por gravidade ao tanque de acumulação (tanque 22) e posteriormente recalcado através de bombas parafuso às células de condicionamento químico, onde é feita a adição de cloreto férrico – aplicação entre 3% e 5% (base seca). O lodo segue ao tanque de lodo condicionado (tanque 16), é bombeado por bomba pistão de alta pressão (seis bombas disponíveis) e antes de alimentar o Filtro Prensa, é dosado polímero catiônico na linha de recalque do lodo utilizando aplicação máxima de 6 kg de polímero catiônico em pó para cada tonelada de lodo digerido (base seca).

Atualmente a desidratação do lodo conta com 3 Filtros Prensa de Placa, composto por 151 placas de 4m² (2m x 2m) cada e uma série de esteiras que conduzem o lodo descarregado do filtro ao pátio de lodo. A produção de lodo desidratado é de 250 toneladas por dia (em média) e tem como destino o Aterro Sanitário.

Elevatória de Utilidades

Em virtude do grande volume de água necessário na operação da estação foi previsto um sistema que promove a reutilização, após tratamento adicional do efluente final, para diversas utilidades, entre as quais, selagem de gaxeta de equipamentos, diluição, quebra espuma e lavagem.

FLUXOGRAMA DE PROCESSO - E.T.E. BARUERI

8. REFERÊNCIAS

Agner AR. *Atividade do extrato de urucum sobre a carcinogênese hepática e de cólon de ratos Wistar* [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2003.

Aiub CA, Pinto LF, Felzenszwalb I. Standardization of condition for the metabolic activation of N-nitrosodiethylamine in mutagenicity tests. *Genet Mol Res*. 2004;3(2):264-72.

Andreoli CV, Pinto MAT. *Resíduos sólidos do saneamento: Processamento, reciclagem e disposição final*. Curitiba: Prosaba; 2001.

Bannasch P, Enzmann H, Klimek F, Weber E, Zerban H. Significance of sequential cellular changes inside and outside foci altered hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol*. 1989;17:617-29.

Bannasch P, Nehrbass D, Kopp-Schneider A. *Significance of hepatic preneoplasia for cancer chemopretention*. In: Miller AB, Bartsch H, Dragsted L, Blaauboer BJ, editors. *Biokinetic and toxicodynamic modeling and its role in toxicological research and risk assessment. Alternatives to laboratory animals*. 2001;31(3):277-281.

Barbisan LF, Scolastici C, Miyamoto M, Salvadori DM, Ribeiro LR, Eira AF. Effects of crude extracts of *Agaricus blazei* on DNA damage and on rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Genet Mol Res*. 2003;2:295-308.

Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Lett.* 1987;37:147-51.

Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon treated. *Cancer Lett.* 1995;93:55-71.

BRASIL (2006). 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.

Brendler-Schwaab S. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutag.* 2005;20(4):245-54.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1999. Aplicação de Lodo de Sistemas de Tratamento Biológicos em Áreas Agrícolas - Critérios para Projeto e Operação. (Manual Técnico – P4230). p32.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1999. Critérios Específicos para Aplicação do Lodo de Esgoto no Estado de São Paulo. p13.

Chiba MK. *Uso de lodo de esgoto na cana-de-açúcar como fonte de nitrogênio e fósforo: Parâmetros de fertilidade do solo, nutrição da planta e rendimento da cultura* [tese] Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo; 2005.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications and limitations. *Mol Biotech*. 2004;26(3):249-61.

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

Enomoto M, Hatanaka J, Igarashi S, Uwanuma Y, Ito H, Asaoka S, Lyatomi A, Kuyama S, Harada T, Hamasaki T. High incidence of angiosarcomas in brown-fat tissue and livers of mice fed sterigmatocystin. *Food Chem Toxicol*. 1982;20(5):547-56.

Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mut Res*. 2006;600:58-66.

Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger A. Aberrant crypt foci: a review. *Toxicol Path*. 1999;27:632-42.

Ferreira CM. *Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (Rana catesbeiana shaw 1802) como animais sentinelas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Fuku N, Ochiai M, Terada S, Fujimoto E, Nakagama H, Tabata I. Effect of running training on DMH-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39:70-4.

Fukumasu H, Avanzo JL, Heidor R, Silva TC, Atroch A, Moreno FS. Protective effects of guaraná (Paullinia cupana Mart.var. Sorbilis) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. *Food Chem Toxicol.* 2006;44:862-7.

García O, Mandina T, Lamadrid AI, Dias A, Remigio A, Gonzalez Y, Piloto JE, Alvarez A. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutat Res.* 2007;556:25-34.

Glei M, Pool-Zobel BL. The main catechin of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), reduces bleomycin-induced DNA damage in human leucocytes. *Toxicol In Vitro.* 2006;20(3):295-300.

Guimarães ET. *Poluição atmosférica urbana na cidade de São Paulo e mutagênese: avaliação de riscos utilizando-se bioindicadores vegetais do gênero Tradescantia* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003.

Haley PJ. Species differences in the identification and function of the immune system. *Toxicology.* 2003;188(1):49-71.

Harrison EZ, Oakes SR, Hysell M, Hay A. Organic chemicals in sewage sludges. *Sci Total Environ.* 2006;367:481-97.

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*. 2003;18(1):45-51.

Hartmann A, Speit G. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister chromatid exchanges (SCE). *Mutat Res*. 1995;346:49-56.

Hayashi M, Tice RR, Macgregor JT, Anderson D, Blakey DH, kirsh-Voders M, Oleson FB JR, Pachierotti F, Romagna F, Shimada H. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring. *Mutat Res*. 1994;312(3):293-304. Review.

Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver regeneration following hepatectomy. *Nutrition*. 1931;15(1):23-28.

Hoeijimarkers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001;362:709-15.

Hsu SM, Raine L, Fanger N. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981;29:557-80.

IARC. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Some N-Nitroso compounds. Lion: IARC.1978;17.

Ito N, Tamano S, Shirai Tomoyuki. A medium-term rat liver bioassay for rapid in vivo detection of carcinogenic potential of chemicals. *Cancer Sci.* 2003;94(1):3-8. Review.

Ito N, Tsuda H, Tatematsu M, Inoue T, Tagawa Y, Aoki T, Uwagawa S, Kagawa M, Ogiso T, Masui I K, Fukushima S, Asamoto M. Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats an approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis.* 1988;9:387-94.

Kapanen A, Itävaara M. Ecotoxicity tests for compost applications. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2001;49:1-16. Review.

Kern SE, Kinzler KW. *Molecular genetics of colorectal carcinoma.* In: Rustgi AK. Editor. *Gastrointestinal cancers.* Biol Diag Ther. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1995. p.413-22.

Klaunig JE, Kamendulis LM, Xu Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Hum Exp Toxicol.* 2000;19:543-55.

Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assays: Protocol, Conduct and data interpretation. *Mutat Res.* 2000;20(1-3):155-66.

Lambert R. *Surgery of the digestive system of the rat.* Springfield: Charles C. Thomas. 1965. p.53-9.

Lijinsky W, Kavatch RM, Thomas GJ. The carcinogenic effect of methapyrilene combined with nitrosodiethylamine given to rats in low doses. *Carcinogenesis*. 1992;13(7):129-7.

Lombardi AT, Garcia Júnior O. An evaluation into the potential of biological processing for the removal of metals from sewage sludges. *Crit Rev Microbiol*. 1999;25(4):275-88. Review.

Luvizutto JF, Silva PRP, Solano MLM, Camargo JLV. *Estudo da toxicidade oral de 90 dias (doses repetidas) do lodo de estação de tratamento de esgoto de esgoto (LETE) em ratos Wistar*. Doutorado - Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Ma TH, Sparrow AH, Nauman AF. Effect of 1,2-dibromoethane (DBE) on meiotic chromosomes of *Tradescantia*. *Mutat Res*. 1978;58:251-8.

Ma TH. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. *Environ Health Perspect*. 1981;37:85-90.

MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, Margalin BH, Ramel C, Salamone MF, Tice RR, Wild D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res*. 1987;189(2):103-12.

Maronpot RR. Enhanced histopathology of lymphoid tissues. *Toxicol Pathol*. 2006;34(5):631-3.

Martinelli LA, Silva AM, Camargo PB, Moretti Ir, Tamazelli AC, Silva DML, Fischer EG, Sonoda KC, Salomão MSMB. Levantamento das cargas orgânicas lançadas nos Rios do Estado de São Paulo. 2002;2:1-18.

Mathur N, Bhatnagar P, Mohan K, Bakre P, Nagar P, Bijarnia M. Mutagenicity evaluation of industrial sludge from common effluent treatment plant. *Chemosphere* 2007;67:1229-35.

McLellan EA, Bird RP. Specificity study to evaluate induction of aberrant crypts in murino colons. *Cancer Res.* 1988; 48(21):6183-6.

Merck Index. An Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Rahway, NY. MERCK & CO. Inc. 1989:2451.

Mielli AC, Matta MEM, Nerseyan A, Saldiva PHN, Umbuseiro GA. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. *Mutat Res.* 2009;672(1):51-4.

Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem.* 2001;9:1183-6.

O Estado de São Paulo, p.A3, 19.09.2008

Ochiai M, Ushigome M, Fujiwara K, Ubagai T, Kawamori T, Sugimura T. Characterization of dysplastic aberrant crypt foci in the rat colon induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Am J Pathol.* 2003;163:1607-14.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development, 1997. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. (OECD Guideline for Testing the Chemicals, 407). OECD, Paris.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development, 1998. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents. (OECD Guideline for Testing the Chemicals, 408). OECD Paris.

Park HS, Goodlad RA, Wright NA. The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology. *Cancer Res.*1997;57:4507-10.

Peraino C, Haugen DA, Carnes BA, Reilly CA Jr, Springer DL, Mahlum DD. Phenotypically selective promotion of diethylnitrosamine initiated altered hepatocyte foci by dietary phenobarbital or a topically applied coal derived organic mixture in male and female rats. *Cancer Lett.* 1987.30;37(2):133-8.

Rodrigues GS, Ma TH, Pimentel D, Weintein LN. *Tradescantia* bioassay monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. *Crit Review Plant Sci.* 1997;16:325-59.

Rodrigues MA, Silva LAG, Salvadori DMF, Camargo JLV, Montenegro MR. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz J Biol Res.* 2002;35(3):351-5.

Rodrigues MAM, Sequeira JL. *Modelos experimentais de câncer de cólon*. In: Rhoden EL, Rhoden, CR, editores. *Princípios e técnicas em experimentação animal*. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2006:299-313.

Rogers JE, Li SW. Effect of metals and other inorganic ions on soil microbial activity: soil dehydrogenase assay as a simple toxicity test. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1985;34(6):858-65.

Rydberg B, Joahnanson KJ. *Estimation of single strand breaks in single mammalian cells*. In: Hanawlt PC, Friedberg EC, Fox CF, editors. *DNA repair mechanisms*. New York: Academic Press; 1978:465-8.

Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res*. 1975;31(1):9-15.

Schowanek D, Carr R, David H, Douben P, Hall J, Kirchmann H, Pátria L, Sequi P, Smith S, Webb S. 2004. A risk-based methodology for deriving quality standards for organic contaminants in sewage sludge for use in agriculture -- Conceptual Framework. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2004;40(3):227-51.

Serqueira JL. *Influência do processo de reparação de feridas cutâneas na carcinogênese química experimental do cólon no rato* [Tese]. Doutorado - Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 1997.

Shirai T. A medium-term rat liver bioassay as a rapid in vivo test for carcinogenic potential: A historical review of model development and summary of results from 291 tests. *Toxicol Pathol*. 1997;25(5):453-60. Review.

Silva J, Fonseca MB. *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.

Singh NP, Mecay MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184-91.

Solano MLM, Lima PLA, Luvizutto JF, Silva PRP, Umbuzeiro GA, de Camargo JLV. In vivo genotoxicity evaluation of a treated urban sewage sample. *Mutat Res*. 2009;676(1-2):69-73.

Solt D, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*. 1976;263:701-3.

Speit G. Protocol for the application of the alkaline single cell gel test (SCG-Test or Comet assay) to detection of DNA damage in eukaryote cells. Publicação avulsa, 1995.

Tatematsu M, Nagamine Y, Farber E. Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. *Cancer Res*. 1983;43(11):5049-58.

Tollefsson J. Raking through sludge exposes a stink. *Nature*. 2008;453(15):262-3.

Tsujiuchi T, Masaoka T, Sugata E, Onishi M, Fujiu H, Shimizu K, Honoki K. Hypermethylation of the Dal-1 gene in lung adenocarcinomas induced by N-

nitrosobis ((2-hydroxypropyl) amine in rats. *Mol Carcinog.* 2007;46(10):819-23.

USEPA - Environmental Protection Agency., 1999. Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. Washington.

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

Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953;171(4356):737-8.

Ziliotto L. Modulação da carcinogênese do cólon pelo cogumelo *Agaricus blazei* no rato [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2008.

www.rekursoshidricos.sp.gov.br/acesso-10.10.08

www.google.com.br/acesso-23.03.09

Esta mensagem HTML tem imagens incorporadas a ela. Imagens bloqueadas aparecem desta forma: ■
[Clique aqui para EXIBIR as imagens.](#)

■
■Main Menu ■Author Dashboard ■Submission Confirmation

You are logged in as João Lauro de Camargo

For security reasons, your session will time out in 10 minutes (at). Please save your work to avoid potential loss. To refresh your session, close this message and save your work or return to your main menu. You may then continue working as normal.

Thank you for submitting your manuscript to *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* .

Manuscript ID: GEAC-2008-0503

Title: THE CARCINOGENIC POTENTIAL OF A TREATED SEWAGE SLUDGE
EVALUATED IN A RAT LIVER BIOASSAY

Authors: Silva, Paula Regina
Luvizutto, João Francisco
Umbuzeiro, Gisela
Barbisan, Luis Fernando
Saldiva, Paulo Hilário
de Camargo, João Lauro

Date Submitted: 30-Nov-2008

Manuscript Central™ v4.11 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2008. All Rights Reserved.
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)