

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL – PPGEA**

**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**

**Vanessa Guimarães Machado**

**Determinação do Potencial Tóxico e Genotóxico de  
Líquido Percolado gerado em Aterramento  
Sanitário de Resíduos Sólidos Urbanos**

Florianópolis – 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL – PPGA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**

**Vanessa Guimarães Machado**

**Determinação do Potencial Tóxico e Genotóxico de  
Líquido Percolado gerado em Aterramento  
Sanitário de Resíduos Sólidos Urbanos**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia Ambiental  
da Universidade Federal de Santa  
Catarina, para a obtenção do grau de  
Mestre em Engenharia Ambiental, na  
linha de pesquisa: Tecnologia de  
Saneamento Ambiental.**

**Orientador: Prof. Dr. William Gerson Matias**

Florianópolis – 2005

***" À medida que nos aventuramos, renovamos as  
nossas esperanças, ambições e sonhos.***

***Haverá momentos em que o destino e as  
circunstâncias nos ajudarão, e outros em que a  
luta e o desespero tomarão conta de nós.***

***Mas precisamos avançar ! !***

***Porque são aqueles que seguem em frente e que  
mantêm vivas as suas aspirações, que têm a  
maior chance de conseguir o que desejam.***

***Avancemos com determinação, e  
essa determinação será de alguma  
maneira recompensada !"***

***Neil Somerville***

# DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante esta jornada, em todos os momentos, desta forma:

## **Dedico...**

À **minha filhotinha Maria Júlia** por ser a luz da minha existência, levando a sua alegria de viver por todos os lugares onde quer que esteja;

À **minha mãe Vera Isabel Guimarães**, pelo seu exemplo de vida, por ser uma guerreira nata, além de ter uma força de vontade e alegria fora do comum, por sempre acreditar em meu potencial, mas principalmente **por me ensinar a amar e a respeitar incondicionalmente;**

Ao **meu pai Volnei dos Santos Guimarães**, por ter sido meu herói e meu ídolo quando ainda criança, por **ensinar-me a sempre superar os limites e, dedicar-me a tudo que acreditasse**, por mostrar-se sempre forte como uma fortaleza, mas saber brincar e ser doce nos momentos oportunos.

Ao **meu marido Evandro** por me incentivar e estar ao meu lado durante a realização e conclusão de mais uma etapa da minha vida.

E, sobretudo, dedico a **Deus** e a espiritualidade que sempre me guiaram pelos caminhos da sabedoria, dando-me as ferramentas necessárias para romper dogmas, pré-conceitos, paradigmas, falsas crenças, adquirindo sempre mais conhecimentos e motivação para continuar realizando meu trabalho com amor, lealdade, profissionalismo e dignidade.

# AGRADECIMENTOS

Segundo um grande amigo João Eduardo di Pietro que em sua dissertação escreveu que "*...È preciso agradecer. Sempre é preciso agradecer. Pelo sol que nasce, pela chuva que cai, pelos dias cinzentos, pela noite que chega. Por estarmos aqui, neste momento e neste lugar*". Concordo com ele e enfatizo que o agradecimento nunca é demais, sempre é gratificante ser lembrado com carinho por quem nos cercam, sendo assim:

## **Agradeço....**

Ao professor Dr. William Gerson Matias, meu orientador, por ter acreditado e confiado que eu seria capaz de realizado este trabalho e, pelo constante apoio, compreensão, paciência e grande ajuda na conclusão deste trabalho.

As professoras Dra. Célia Regina Monte Barardi e Dra. Claudia Maria Oliveira Simões, do Laboratório de Virologia Aplicada – LVA, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia – MIP, da UFSC, pela sua confiança e atenção em permitir que eu acompanhasse e participasse da pesquisa de um de seus orientados a fim de aprender os fundamentos do **Ensaio do Cometa**.

Ao amigo e toxicologista Dr. Herling Gregório Aguilar Alonzo, não só pela sua orientação, bibliografia, amizade e auxílio durante o processo em que estava escrevendo este trabalho, mas acima de tudo ao seu caráter, humildade e competência, colocando-se a disposição do País através do Ministério da Saúde.

Aos colegas, mas principalmente amigos Aline Marie, Larissa e Javier, por terem me recebido com tanto carinho e confiança no LVA / MIP, e permitido que fizesse parte de sua equipe de pesquisa.

A todos os colegas de pós-graduação, mas, em especial a minha amiga desde o período de graduação Karla C.G. da Luz – “Globeleza”, que frequentou e me apoiou nas disciplinas deste trabalho de mestrado.

Às minhas amigas do Laboratório de Toxicologia Ambiental – LabTox: Marília, Francyne e Débora por serem dedicadas, leais, prestativas, por me ajudarem nas horas em que eu mais precisei e por estarem sempre comigo, torcendo para que este trabalho desse certo.

Ao meu amigo do LabTox, Leonardo Hoinaski por “pescar” os peixes no açude de sua família em Criciúma e, em especial ao seu pai por ceder gratuitamente todos os animais utilizados durante esta pesquisa.

A minha querida Cátia, também do LabTox que com toda sua paciência, conhecimento, profissionalismo e dedicação, ensinou-me quase tudo o que sei sobre o que é trabalhar num laboratório de Toxicologia, sem negar-me ajuda num só momento... mesmo quando estava em Bordeaux.

Aos meus amigos do Laboratório Integrado do Meio Ambiente – LIMA, Clarissa, Luis, Heloiza, Renata pela amizade, companheirismo e todos os momentos felizes.

Aos bolsistas, mas sobretudo amigos Nadja, Adalberto, Giselle pelo convívio e auxílio dentro e fora do LIMA.

Ao Químico “NICO”, meu amigo, desde a época da graduação em que fui monitora das disciplinas de Qualidade de água I e II, não só pelo seu auxílio em orientar-me no preparo de diversas soluções químicas necessárias para a execução desta pesquisa, mas principalmente pela sua dedicação, humildade, lealdade.

A Eliane – LILICA, que com todos os problemas que passou durante todo o ano de 2004, dia a dia foi meu ombro amigo nos intervalos de trabalho com “nossos cafezinhos e biscoitinhos” e, a Arlete que já “pegou o bonde andando” no LIMA, mas sua alegria e determinação, servem de exemplo para muitos.

Aos amigos Thaís e Maurício do Programa de pós-graduação em Engenharia Ambiental, pelas alegrias, conselhos e muita ajuda durante este tempo.

Aos meus novos colegas do Departamento de Ciência e Tecnologia –DECIT do Ministério da Saúde - MS: Daniela, Adriana Diaféria, Angélica, Clarice, Thenille, Isabel-Tininha, Ana Paula, Fernando, Jaíza, Sérgio, Adriana –Drix, Cristiano...,por me receberem de braços abertos, num momento tão transitório da minha vida e me incentivarem diariamente a escrever e terminar logo esta dissertação.

A minha querida “irmãzinha do coração” Marla, que com sua alegria contagiante e sua força de vontade descomunal, sempre me alegrou, incentivou e apoiou em todos os momentos da minha vida.

Aos meus sogros e cunhados, pela compreensão e incentivo durante todos estes anos.

Aos engenheiros e técnicos que trabalham no Aterro Sanitário de Resíduos Sólidos Urbanos da Grande Florianópolis, onde realizei esta pesquisa, mas em especial ao “Seu Fino” e ao técnico em laboratório Roberto por todo auxílio durante a realização deste estudo.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Ensino superior - CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo apoio financeiro

Aos queridos professores, que na sua grande maioria vem me acompanhando desde a graduação, e aos demais colegas e amigos..... tantos que seria impossível relacioná-los e, inevitavelmente cometeria uma injustiça em não relacionar alguém.

Meu muito obrigada;

***Vanessa***

Esta dissertação foi desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PPGEA, da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Os trabalhos práticos foram realizados no Laboratório de Toxicologia Ambiental – **LabTox**, Depto de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, sob orientação do Professor Dr. William Gerson Matias, em parceria com o Aterro Sanitário da Grande Florianópolis.

A pesquisa recebeu apoio do **CNPq** com recursos financeiros, da **CAPES** bolsa de mestrado.

# S U M Á R I O

<b>SUMÁRIO</b> .....	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
2.1. Objetivo Geral .....	3
2.2. Objetivos Específicos .....	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
3.1. A problemática do lixo em relação a saúde pública.....	4
3.2. Líquido percolado de resíduos sólidos -chorume.....	6
3.3. Toxicologia Ambiental.....	8
3.3.1. Genética Toxicológica Ambiental.....	10
3.3.2. Ecotoxicologia.....	16

3.4. Testes de Toxicidade.....	19
3.4.1. Efeito Agudo.....	20
3.4.2. Efeito Crônico.....	20
3.4.3. Efeito Subcrônico.....	21
3.4.4. Efeito Crônico versus Efeito Agudo.....	21
3.5. Bioindicadores Aquáticos.....	22
3.5.1. <i>Geophagus brasiliensis</i> (Acará, Cará).....	23
3.5.2. <i>Daphnia magna</i> .....	24
3.6. Teste do Cometa.....	25
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
4.1. Aterro sanitário urbano em estudo.....	30
4.1.1. Tratamento adotado para o chorume bruto proveniente do aterro sanitário urbano.....	30
4.2. Preparação dos aquários e aclimação dos peixes ( <i>Geophagus brasiliensis</i> ).....	33
4.2.1. Preparo dos aquários no aterro sanitário (Determinação da Genotoxicidade Crônica).....	33
4.2.1.1 Aquários Controle.....	33
4.2.1.2. Aquário Definitivo (Aquário de Aço).....	35
4.2.2. Preparo dos Aquários no LabTox (Determinação da Genotoxicidade Aguda e Reparo celular).....	36
4.2.3. Aclimação dos Peixes.....	38
4.3. Avaliação de parâmetros físico-químico, biológico, toxicológico e genotoxicológico .....	39

4.3.1. Avaliação dos Parâmetros Físico-Químicos e Biológicos .....	40
4.3.2. Avaliação da Toxicidade através do Ensaio com <i>Daphnia magna</i> .....	43
4.3.2.1. Cultivo das <i>Daphnia magna</i> no LabTox.....	44
4.3.3. Avaliação da Genotoxicidade através do Ensaio do Cometa.....	45
4.3.3.1. Preparo da Suspensão Celular.....	45
4.3.3.1.1. Retirada do Sangue.....	46
4.3.3.1.2. Preparo dos Controles Positivos e Negativos.....	47
4.3.3.2. Preparo das Lâminas.....	48
4.3.3.2.1. Pré-Cobertura.....	48
4.3.3.2.2. Primeira Camada.....	49
4.3.3.3. Lise Celular.....	49
4.3.3.4. Neutralização I.....	50
4.3.3.5. Tratamento Alcalino.....	50
4.3.3.6. Eletroforese.....	50
4.3.3.7. Neutralização II.....	51
4.3.3.8. Fixação dos Cometas.....	51
4.3.3.9. Coloração.....	52
4.3.3.10. Análise ao Microscópio.....	52
4.3.3.11. Análise dos Cometas.....	53
4.3.3.12. Análise Estatística.....	53
4.3.3.13. Otimização do Teste do Cometa.....	54

<b>5. RESULTADOS e DISCUSSÃO</b>	<b>56</b>
5.1. Aclimação dos peixes.....	56
5.2. Parâmetros físico-químicos e biológicos.....	56
5.3. Testes de toxicidade e genotoxicidade.....	59
5.3.1. Testes de toxicidade.....	59
5.3.2. Testes de genotoxicidade utilizando o Teste do Cometa.....	60
5.3.2.1. Otimização dos tempos de despiralização do DNA e eletroforese.....	61
5.3.2.2. Genotoxicidade Crônica.....	63
5.3.2.3. Genotoxicidade Aguda e Reparo do DNA.....	66
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>71</b>
<b>7. RECOMENDAÇÕES</b>	<b>73</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIAS</b>	<b>75</b>
<b>9. APÊNDICE</b>	<b>89</b>
<b>A) Resultado da análise estatística.....</b>	<b>89</b>

# LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Lixo despejado temporariamente a céu aberto para posterior aterramento no aterro sanitário de resíduos sólidos urbanos onde foi realizada a pesquisa. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.....5
- Figura 2** – Vias de transferência e interação entre os meios ambientais. **Fonte:** OPAS/USEPA, 1996.....9
- Figura 3** – Fluxograma demonstrativo do processo de geração de resíduos, baseado em RIBEIRO (2004).....14
- Figura 4** - Diagrama de ciclo contínuo, baseado em RIBEIRO (2004).....15
- Figura 5**- Bioindicadores aquáticos: **(a)** peixe *Geophagus brasiliensis* (Fonte: [www.aquanet.de](http://www.aquanet.de)\ acesso em novembro de 2004); **(b)** microcrustáceo *Daphnia magna* (Fonte: [www.kulac.ac.be](http://www.kulac.ac.be)\ acesso em novembro de 2004).....23
- Figura 6** – Migração do material nuclear (DNA) do peixe *Geophagus brasiliensis* utilizando o Ensaio do Cometa. O DNA migra da cabeça para a cauda em direção ao ânodo (+). **(a)** células sem dano e **(b)** células com dano, formando cometas. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado. ....29

- Figura 7** – Esquema da Estação de Tratamento do líquido percolado proveniente do Aterro Sanitário e a localização dos aquários *in situ*.....31
- Figura 8** – (a) Esquema da Estação de Tratamento de Chorume do Aterro Sanitário onde foi realizada a pesquisa. (b) localização dos aquários *in situ*.**Fonte:** LabTox/ Vanessa Guimarães Machado. ....32
- Figura 9** - Aquários de Aclimação e Controle respectivamente, localizados na área do aterro sanitário, onde foi realizada o trabalho de pesquisa.**Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.....34
- Figura 10** - Detalhe do Aquário de aço(Aquário definitivo), localizado na área do aterro sanitário, onde foi realizada a pesquisa. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado...35
- Figura 11** – Aquários instalados no LabTox: (a) aquário controle onde são criados os carás (*Geophagus brasiliensis*). (b) montagem dos aquários para avaliar se existe reparo nas células com dano. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.....37
- Figura 12** - Fluxograma demonstrando o procedimento da coleta de amostra para a realização dos testes.....40

**Figura 13** – (a) Realização de análises físico-químicas (pelo técnico laboratorista do aterro sanitário) **Fonte:** <http://www.an.com.br/>. (b) cartela do Kit colilert, indicando presença de coliformes totais – amarelo ouro, (c) cartela colilert indicando a presença de coliformes fecais (azul fluorescente). **Fonte:** [www.wsl.com.au/](http://www.wsl.com.au/).....42

**Figura 14** – (a) Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* realizada no LabTox, com as seguintes concentrações: 100%, 50%, 33,33%, 25,0%, 16,66%, 12,5%, 8,33%, 6,25%. (b) Fermentador com o cultivo da alga *Scenedesmus subpicatus*. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.....44

**Figura 15-** Dimensões do peixe *Geophagus brasiliensis*: (a) medida (b) pesagem. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.....45

**Figura 16** – Retirada de sangue do peixe *Geophagus brasiliensis*. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.....46

**Figura 17** – Detalhes de duas etapas do processo dos testes. (a) Eletroforese: detalhe da cuba e fonte de eletroforese. (b) Manipulação de brometo de etídio. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.....51

**Figura 18** – Detalhes de um “cometa” classe 5 de hemócitos do peixe *Geophagus brasiliensis*, submetidos à técnica do “teste do cometa”. Fotografias retiradas com máquina

digital, acoplada ao microscópio Olympus de epifluorescência BX40 (aumento x1000), com filme ASA 400-colorido **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.....52

**Figura 19** – Resultado gráfico da média aritmética entre os parâmetros físico-químicos analisados simultaneamente nos três aquários durante o mesmo período.....57

**Figura 20** – Representação do dano causado ao DNA de acordo com o tamanho das caudas dos cometas, utilizando hemócitos de peixes *Geophagus brasiliensis*. Fotografias retiradas com máquina digital, acoplada ao microscópio Olympus de epifluorescência BX40 (aumentos: x1000 e x400 respectivamente), com filme ASA 400-colorido. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado. ....61

**Figura 21** – Resultado dos escores médios obtidos através do teste de genotoxicidade crônica do peixe *Geophagus brasiliensis*.. .....64

**Figura 22** – Resultado dos escores médios obtidos no teste de genotoxicidade aguda e mecanismo de reparo de DNA do peixe *Geophagus brasiliensis*. .....66

**Figura 23** – Hemócitos do peixe *Geophagus brasiliensis*, submetidos à técnica do “teste do cometa”, formando os “cometas” referentes aos testes realizados na pesquisa. Fotografias retiradas com máquina digital, acoplada ao microscópio Olympus de epifluorescência BX40 (aumentos: x1000, x400 e x200), com filme ASA 400-colorido. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.....68

# LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Relação entre o tempo de exposição aguda dos animais no líquido percolado do aterro sanitário e o tempo de exposição dos animais na água limpa, para verificação da existência de reparo no DNA.....38

**Tabela 2** – Classificação dos Cometas baseados no tamanho da “Cauda” em relação à “Cabeça”.....54

**Tabela 3** – Resultado da média aritmética entre os parâmetros físico-químicos analisados simultaneamente nos três aquários durante o mesmo período.....57

**Tabela 4** – Resultados obtidos através de análises biológicas do líquido percolado tratado, durante os 4 (quatro) meses de monitoramento.....58

**Tabela 5** – Otimização dos tempos de desespiralização alcalina do DNA (hemócitos) do peixes *Geophagus brasiliensis* e Eletroforese.....62

**Tabela 6** – Análise de variância dos escores médios de danos causados ao DNA, durante cada testes respectivo.....89

# R E S U M O

Num aterro sanitário ocorre um grande número de reações químicas, físicas, biológicas e toxicológicas, resultando na formação de líquidos percolados, chamados de chorume. As características destes líquidos percolados depende muitos das características dos resíduos aterrados e do tipo de aterro sanitário, principalmente ao que diz respeito a operação e manutenção deste. Animais aquáticos são largamente utilizados como biomarcadores em condições suspeitas de contaminação e, na mensuração de danos provenientes desta inserção de contaminantes no meio aquático. Os peixes ocupam um dos últimos patamares da cadeia trófica, servindo de alimento para outros animais aquáticos e terrestres, entre eles o ser humano. A morte e mesmo alterações fisiológicas nos peixes podem acarretar importantes desequilíbrios ecológicos e o consumo destes, pode causar patologias para quem se alimente deles. Com base nestes aspectos, esta pesquisa teve como objetivo principal a avaliação *in situ*, do potencial tóxico e genotóxico do chorume tratado utilizando diferentes organismos aquáticos de água doce, o cará (*Geophagus brasiliensis*) e a *Daphnia magna*. Foram utilizadas diversas técnicas, como o ensaio do cometa para análise genotóxicas aguda e crônica nos carás, e toxicológicas com bioensaios com *Daphnias magna*. O aterro utilizado em nossa pesquisa, que recebe diariamente uma grande quantidade de resíduos domésticos provenientes de mais de 30 municípios do Estado de Santa Catarina e os resíduos perigosos de 17 municípios. Os resultados demonstraram a necessidade de incluir análises genotóxicas como prática comum para o monitoramento ambiental, associada aos testes de toxicidade, pois os peixes expostos ao efluente final apesar de não apresentarem nem toxicidade crônica, nem aguda, apresentaram efeitos genotóxicos positivos para ambos os casos. Nos testes para avaliar o potencial de reparo celular deste peixes após exposição aguda, os dados apontaram que as lesões gênicas são passíveis de reparo, indicando que, os animais após expostos por um determinado período de tempo ao chorume tratado, e posteriormente transferidos para um ambiente sem contaminação, tem capacidade de reparar os danos causados ao seu genoma.

# ABSTRACT

A great number of physical, biological, chemical and toxicological reactions occur at a landfill. These reactions produce the percolated liquid known as leachate. The percolated liquid characteristics are dependent to the landfill type and to the buried residue. In conditions of suspicious contamination and when is necessary to measure the damage caused by the insertion of contaminants, aquatic organisms are used as biomarkers. Fish represent a great source of food to aquatic and earthy animals, including man. Therefore, fish's death or even physiological alterations can cause an important ecological unbalance, and the intake of them may cause pathologies. Based on these aspects the aim of this work was to evaluate the toxic and genotoxic potential of treated leachate, using two different aquatic organisms: Cará (*Geophagus brasiliensis*) and *Daphnias magna*, from freshwater. Different techniques were used during this experiment: (i) comet assay to analyze acute and chronic genotoxicity in *G. brasiliensis* (*in situ*); (ii) DNA repair; and (iii) toxicological bioassays in *D. magna*. The analyzed landfill situated at Santa Catarina – Brazil, receives a great amount of domestic residue from 30 municipal and dangerous residuess from 17 municipal daily. The results demonstrated the necessity to include the genotoxic analysis and toxicity assays as a common practice to monitor the environment, considering that fish exposed to treated leachate didn't show neither chronicle nor acute toxicity, but genotoxic effects were observed in both cases. When the experiments aimed to evaluate the DNA repair after an acute exposition the data demonstrated that the lesions can be repaired, which indicates that animals exposed to treated leachate, and then transferred to a clean environment are able to repair the damage in their genome.

## 1. INTRODUÇÃO

Inúmeras doenças possuem veiculação hídrica, entre elas pode-se destacar as desinteiças, viroses e doenças de pele, tornando-se um problema de saúde pública. Somado a este problema vem crescendo as patologias ligadas à poluição ambiental, principalmente por compostos tóxicos. Tanto a água quanto os alimentos, podem estar contaminados com substâncias cuja toxicidade desconhecemos (PALMEIRA, 2000).

Visando estudar os efeitos de substâncias tóxicas em seres vivos, a Toxicologia Ambiental utiliza bioindicadores e biomarcadores, que forneçam resultados rápidos, confiáveis e que possam ser aplicados na Engenharia Ambiental, no que tange a detecção de alterações fisiológicas de animais ou populações, avaliação de risco ambiental e possível impacto ambiental (BARROS & DAVINO, 2003; MATIAS, 2003).

A utilização de novos organismos como mamíferos terrestres, peixes e invertebrados aquáticos, estão sendo utilizados e recomendados por diversos autores em técnicas de biomonitoramento ambiental, como propostas de avaliação de genotoxicidade e carcinogenicidade sobre estes organismos, quando os mesmos são expostos a ambientes aquáticos contaminados (CETESB, 1987a; CETESB, 1988; DE FLORA *et al*, 1991; CETESB, 1992; COONEY, 1995, KAMER & RINKEVICH, 2002; LEE & STEINERT, 2003).

A exposição de peixes aos agentes genotóxicos pode acontecer através da via digestiva, quando o mesmo ingere a substância ou, por via respiratória seguida de absorção química através das guelras (DE FLORA *et al*, 1993; BAINY, 2004). A avaliação de biomarcadores pode ocorrer *in situ* ou em um ambiente laboratorial, com todos os parâmetros físico-químicos e biológicos controlados após exposição a um ou diversos agentes genotóxicos. Uma comparação mais realista pode ser efetivada quando comparado com peixes nativos da mesma espécie, expostos a condições naturais distintas, em meio ambiente contaminado e em habitat isento de contaminações (MOORE, 1993; MITCHELMORE & CHIPMAN, 1998).

Os resíduos sólidos através de inúmeros processos de degradação, produzem um líquido percolado de odor característico, cor escura e, altamente tóxico, denominado chorume ou lixiviado. Quando os resíduos sólidos não recebem destinação final adequada, nem o seu líquido percolado recebe tratamento e monitoramento constantes, tornam-se importantes poluidores do meio, podendo alterar de forma irreversível os ecossistemas (DA LUZ, 1998).

Uma das maneiras mais comuns pelas quais um aterro contamina o meio ambiente é através do vazamento deste líquido percolado, pela base ou laterais do aterro, contaminando não só a água (superficial e subterrânea), também o solo. O líquido percolado bruto é altamente tóxico e, provoca mortalidade de animais e plantas aquáticas. Um tratamento adequado pode reduzir ou até mesmo eliminar os elementos tóxicos desse complexo composto (FINKLER, 2002).

O impacto produzido pelo líquido percolado sobre o meio ambiente, está diretamente relacionado com sua fase de decomposição. O lixiviado de aterro novo, quando recebe boa quantidade de águas pluviais é caracterizado por pH ácido, alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO<sub>5</sub>), alto valor de Demanda Química de Oxigênio (DQO) e diversos compostos potencialmente tóxicos, como já mencionados nos parágrafos anteriores. Com o passar dos anos, há uma redução significativa da biodegradabilidade devido a conversão, em gás metano e CO<sub>2</sub>, de parte dos componentes biodegradáveis (LIMA, 1991; CURUPIRA, 2004).

Pesquisas realizadas com o líquido percolado tratado do Aterro Sanitário da Grande Florianópolis, não apresentaram toxicidade aguda, porém, em se tratando do líquido percolado bruto (*in natura*) do mesmo aterro, o efluente apresentou elevado potencial tóxico para os microcrustáceos. Foi constatado que embora o efluente não tenha apresentado toxicidade aguda, houve uma alteração no ciclo reprodutivo do microcrustáceo *Daphnia magna* (FINKLER, 2002). Desta forma a verificação genotoxicológica do chorume se faz necessária, para observação de possível alteração genética na estrutura de outros animais aquáticos como os peixes.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Verificar possíveis efeitos tóxicos e genotóxicos do líquido percolado gerado em aterramento sanitário de resíduos sólidos urbanos, utilizando a Técnica do Cometa, padronizada para as condições do Laboratório de Toxicologia Ambiental – **LabTox**, utilizando o sangue do peixe *Geophagus brasiliensis*.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1– Desenvolver a técnica conhecida como “Teste do Cometa”, para as condições do Laboratório de Toxicologia Ambiental – **LabTox**, usando como agente genotóxico para controle positivo o Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ );

2 - Quantificar o grau de lesão no DNA do *Geophagus brasiliensis*, causado pelo líquido percolado tratado, através de exposição crônica e aguda, utilizando o “Teste do Cometa”;

3 – Avaliar o mecanismo de reparo do DNA do *Geophagus brasiliensis*, após exposição crônica;

4 –Avaliar a toxicidade aguda do chorume tratado utilizando o indicador biológico *Daphnia magna*;

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

O aumento crescente e acelerado do processo de urbanização na sociedade em que vivemos, formam aglomerados de pessoas estimulados para o consumo de artigos e produtos cada vez mais modernos e tecnológicos. A filosofia do descartável e do excesso de embalagens predomina em diversos setores do mercado o que significa diretamente mais resíduo (CANALCIENCIA, 2004).

Este quadro crescente de ocupação territorial e consumo desordenado podem acarretar uma série de alterações no meio ambiente, principalmente porque o processo de urbanização se dá em geral sem planejamento adequado e, conseqüentemente falta de estrutura adequada, necessária para receber toda esta população e seus resíduos. Alterações ambientais por agentes poluentes têm ocorrido basicamente sob duas formas: *intencional e acidental*, principalmente a partir de fontes não naturais em decorrência da atividade humana (PALMEIRA, 2000; ABNT, 1985).

#### **3.1. A PROBLEMÁTICA DO LIXO EM RELAÇÃO A SAÚDE PÚBLICA**

A presença de substâncias poluidoras em excesso nos ecossistemas representa um risco para os seres vivos (LAITANO, 2003). Essas substâncias podem prejudicar a qualidade de vida da população, pois geralmente não há um estudo prévio sobre a saturação de recursos naturais destes locais em específico, gerando ocupações muitas vezes desordenada, que vem a acarretar o despejo inadequado (na maioria das vezes a céu aberto) de resíduos sólidos, mais comumente chamado de *“lixo”*.

O resíduo sólido e sua forma de gerenciamento constituem um dos grandes desafios deste século, e se equipara em gravidade a outros problemas de solução complexa, como a escassez de água potável, desflorestamento em larga escala, ocorrência de doenças além do efeito estufa provocado pela queima de combustíveis fósseis e, agressão à camada de ozônio causada pelo CFC (clorofluorcarbono) entre tantos outros (LIMA, 1996; LIXO, 2004). A Figura 1 demonstra um grande volume de resíduos despejado temporariamente a céu aberto aguardando sua cobertura adequada.



**Figura 1** – Lixo despejado temporariamente a céu aberto para posterior aterramento no aterro sanitário de resíduos sólidos urbanos onde foi realizada a pesquisa. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado

Quando os resíduos sólidos não são gerenciados de forma correta, isto é, quando não existe nem manejo, nem tratamento final adequado, podem ocasionar *riscos diretos e indiretos* à comunidade, afetando a saúde e o bem-estar de todos os seus integrantes (PALMEIRA, 2000).

Os **riscos diretos** são ocasionados pelo contato direto com os resíduos que podem conter excrementos humanos e de animais. O grupo de risco mais afetado é o dos catadores de lixo, que apresentam maior incidência de parasitas intestinais, ocorrência de lesões nas mãos e pés, enfermidades respiratórias e de pele, etc. Os **riscos indiretos** derivam principalmente da proliferação de vetores sanitários como moscas, mosquitos, ratos e baratas, que encontram neste meio alimento, e condições adequadas para sua reprodução. A inexistência do manejo adequado pode levar à alimentação de animais (domésticos e destinados a “corte”) com lixo. Esta prática perigosa pode causar nos seres humanos, doenças como a cisticercose, entre outras (PALMEIRA, 2000).

Os **riscos** podem ser minimizados através da adoção de sistemas de disposição final mais conveniente do ponto de vista sanitário e econômico. A precária disposição final do lixo pode ocasionar problemas sérios de saúde pública, através da disseminação de

doenças, da contaminação do solo e de mananciais (águas subterrâneas e superficiais) pelo líquido percolado (SÁ & PEPE, 2000).

A correta gestão destes resíduos sólidos através da efetivação de práticas de manejo e disposição final, é essencial para a implementação de soluções ambientais satisfatórias e eficientes em áreas urbanas, que sejam menos impactantes ao Meio Ambiente e, que garantam uma qualidade de vida sanitariamente satisfatória para as populações existentes. Dentre os mais diferentes e diversos métodos de disposição final de resíduos, o que parece ser mais adequado à realidade social, principalmente da América Latina, é o **Aterro Sanitário** (CANALCIENCIA, 2004).

A questão do lixo deve ser abordada de forma complexa, contemplando os aspectos econômicos, político, sociológico, psicológico, sanitário e ambiental. Tais aspectos devem ser tecidos de *forma interativa e inter-retroativa*. Na medida em que geralmente as ações relativas aos resíduos sólidos e ao seu gerenciamento não contemplam as questões sociais e sociológicas, num esforço conjugado de Secretarias e Ministérios, os seres humanos são, e continuarão a ser, excluídos e marginalizados (DA LUZ, 1998; SÁ & PEPE, 2000).

### **3.2. LÍQUIDO PERCOLADO DE RESÍDUOS SÓLIDOS -CHORUME**

O líquido que percola de locais de disposição final de resíduos sólidos, também é denominado de lixiviado e chorume. É um líquido escuro, resultado da umidade presente nos resíduos, da água gerada durante a decomposição dos mesmos e também das chuvas que percolam através da massa do material descartado, possui alto teor de matéria orgânica que contém alta carga poluidora (CLARETO, 1997) caracterizando-se por possuir elevados valores de **DQO** (Demanda Química de Oxigênio) e **DBO** (Demanda Bioquímica de Oxigênio), além de apresentar metais pesados provenientes da decomposição de embalagens metálicas e pilhas. A composição final do chorume é fruto do tipo de lixo depositado e do seu estado de degradação (FINKLER, 2002; LIMA, 1996).

O potencial de impacto deste efluente está relacionado com diversos fatores. Em geral baseados na: **(i) alta concentração de matéria orgânica; (ii) reduzida**

**biodegradabilidade; (iii) presença de metais pesados e de substâncias recalitrantes.** Devido a estas características, estes efluentes persistem por muito tempo no meio ambiente podendo conseqüentemente causar efeitos crônicos adversos à biota. A velocidade de degradação está relacionada não só a substância e a sua estrutura molecular, mas também às condições do compartimento onde foi lançada, isto é, potencial redox, pH, presença de microorganismos, concentração de substratos e constituintes do referido compartimento onde foi depositado (CHASIN & PEDROSO, 2003).

A decomposição dos resíduos sólidos depositados em aterros sanitários é um processo dinâmico comandado por organismos decompositores de matéria orgânica, sendo em sua maioria *bactérias heterotróficas, aeróbias e facultativas* (LIMA, 1996). Esta decomposição pode ser descrita pelas **fases aeróbia e anaeróbia**. A fase aeróbia ocorre durante o primeiro mês de deposição e recobrimento do lixo na vala.

A ação de decomposição é realizada pelas bactérias aeróbias que utilizam o oxigênio presente no interior do aterro é mais intensa no início, e a medida que o oxigênio vai ficando escasso a decomposição torna-se mais lenta (VENKATARAMANI *et al.*, 1984; LIMA, 1996). A presença de águas pluviais exerce grande influência sobre esta fase, pois facilita a redistribuição de nutrientes e microorganismos ao longo do aterro sanitário (MANDELLI *et al.*, 1991; LIMA, 1991).

Quando todo o oxigênio é consumido, inicia-se a fase anaeróbia, onde a decomposição ocorre através dos organismos anaeróbios e/ou facultativos que hidrolisam e fermentam celulose e outros materiais presentes no resíduo (MANDELLI *et al.*, 1991; VENKATARAMANI *et al.*, 1984). Esta fase é caracterizada pela redução da concentração de carbono orgânico, pelos altos níveis de amônia e largo espectro de metais, representando considerável potencial de risco para o meio ambiente. A fase anaeróbia pode demorar vários anos para estar completa (MANDELLI *et al.*, 1991; LIMA, 1991).

Diversos fatores contribuem para que o resíduo da decomposição do lixo (líquido percolado) seja complexo e apresente significativas variações em sua composição. Dentre as mais importantes ressalta-se: **(i) dinâmica de decomposição ao longo do tempo; (ii) variações na forma de operação do aterro sanitário; (iii) tipo**

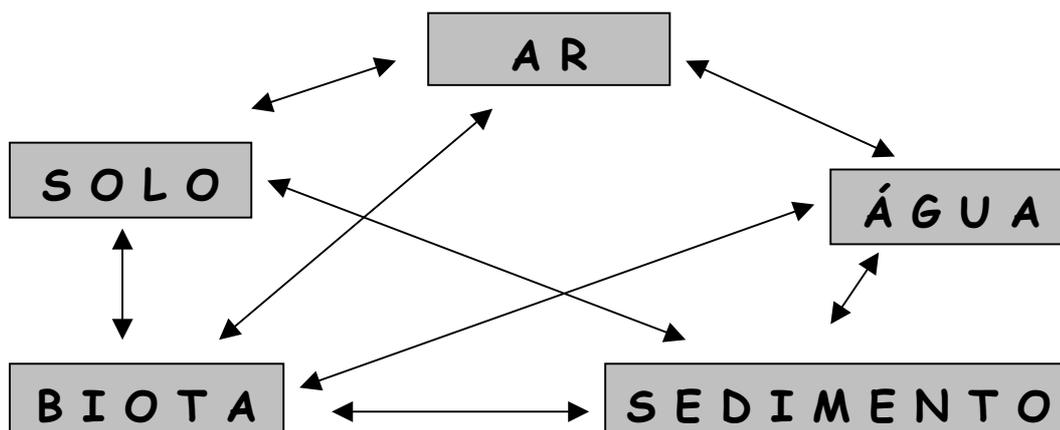
**de solo; (iv) composição dos resíduos depositados; (v) volume de chuvas e outras alterações climáticas** (LIMA, 1991; CLARETO, 1997).

O potencial de contaminação ambiental de um aterro sanitário estende-se desde o início da sua operação até várias décadas após seu encerramento de atividades, ou seja, seu fechamento (MANDELLI *et al*, 1991; FINKLER, 2002). Conhece-se muito pouco sobre a magnitude dos danos causados pela utilização de água proveniente de corpos receptores destes efluentes, e sabendo-se da existência da possibilidade de populações humanas consumirem peixes e alimentos contaminados por este líquido percolado diluído na água, é de grande importância analisar sua toxicidade, bem como a qualidade das águas contaminadas através de parâmetros físico-químicos, biológicos e toxicológicos (FINKLER, 2002; CLARETO, 1997; LIMA, 1996 ).

### **3.3. TOXICOLOGIA AMBIENTAL**

Segundo Chasin & Pedroso (2003) a **Toxicologia Ambiental e a Ecotoxicologia**, são termos usualmente empregados para descrever o estudo científico dos efeitos adversos causados aos organismos vivos, através de substâncias químicas liberadas no ambiente que interagem entre si, através de suas vias de transferência entre os meios também denominados de compartimentos ambientais (Figura 2). Qualquer alteração em um dos meios pode provocar uma alteração em cadeia, alterando qualquer um dos demais meios (OPAS/USEPA, 1996; OGA, 2003).

Muitos pesquisadores diferenciam estas conotações denominando o termo **Toxicologia Ambiental** para estudos referentes aos efeitos diretos das substâncias químicas ou xenobióticos ambientais sobre os seres humanos. Neste caso o termo **Ecotoxicologia** trataria somente dos estudos referentes aos efeitos desses compostos (xenobióticos ambientais) sobre os ecossistemas e seus componentes não humanos (CHASIN & PEDROSO, 2003; LAURINI, 1987).



**Figura 2** – Vias de transferência e interação entre os meios ambientais. Fonte: OPAS/USEPA, 1996.

A designação mais empregada nos dias de hoje para o termo **Toxicologia Ambiental**, refere-se à área da toxicologia que se estuda os efeitos nocivos causados pela interação de agentes químicos contaminantes do ambiente – **água, solo, ar** – com organismos humanos, enquanto que o termo **Ecotoxicologia** é empregado para relacionar os efeitos tóxicos das substâncias químicas e dos agentes físicos sobre os organismos vivos, especialmente nas populações e comunidades (CHASIN & PEDROSO 2003; OGA & DE SIQUEIRA, 2003).

Para Oga & De Siqueira (2003), **agente tóxico** ou **toxicante** corresponde à entidade química capaz de causar dano a um sistema biológico, alterando seriamente uma função ou levando-a a morte sob certas condições de exposição. A Toxicologia Ambiental estuda os efeitos de contaminantes ambientais sobre indivíduos vivos, e a ecotoxicologia é um ramo da toxicologia ambiental, que estuda os efeitos dos contaminantes ambientais sobre as populações, considerando aspectos de: **mobilidade, degradação, bioacumulação e bioamplificação dos contaminantes** (OGA & DE SIQUEIRA, 2003; BARROS & DAVINO, 2003; MATIAS, 2004).

### 3.3.1. GENÉTICA TOXICOLÓGICA AMBIENTAL

A genética toxicológica é uma área da ciência relativamente jovem. Reconhecida durante os anos 60, seus avanços foram impulsionados principalmente pelo cientista Alexander Hollaender, através de suas pesquisas em que significantes riscos a células germinativas humanas poderiam ser consequência de exposições aos agentes químicos e radiação (VILLELA *et al.*, 2003).

Esta área da ciência está continuamente recebendo maiores interesses pela comunidade científica e pelos técnicos especializados dentro dos conceitos modernos de saúde pública, devido ao fato de buscar analisar e, avaliar os fatores que determinam a vida e os fatores que podem perturbá-la podendo causar até a morte. Apesar da vida e da morte serem mutuamente exclusivas, uma não existir sem a outra (ERDTMANN, 2003).

Durante a 2ª guerra mundial, a explosão da bomba atômica nas cidades de Hiroshima e Nagasaki, liberou (e continua liberando) ondas radioativas que expôs toda a população. Houve um “pool” gênico em toda população exposta e conseqüentemente em seus descendentes, que até hoje carregam alterações genéticas. Neste período foi questionado sobre a capacidade humana em manipular o material genético de toda uma população através de intervenções no meio ambiente natural (RIBEIRO, 2004).

Após a 2º grande guerra em que se perpetuaram os efeitos da bomba atômica por toda uma população, seus descendentes e o meio ambiente, os estudos convergiram para dois pontos: a **ecologia** e a **genética**. Foi então que nas décadas de 50 e 60 desenvolveram-se os primeiros testes rápidos e eficientes que até hoje são empregados em genotoxicidade. Em 1946, os cientista Auerbach e Robson estudaram através do gás mostarda, a mutagênese química provocada pelo efeito do agente radiominético similar aos efeitos da radiação, por provocarem queimaduras e aberrações cromossômicas (RIBEIRO, 2004).

Em 1969, foi criada a Sociedade de Mutagênese Ambiental (EMS), com o objetivo de reunir cientistas provenientes de diversas partes do mundo, interessados em detectar

agentes mutagênicos e seus riscos ao genoma humano, a fim de disporem de informações necessárias para suas pesquisas (VILLELA *et al*, 2003).

Todo o processo de alteração ambiental não é recente, embora neste momento as preocupações tendem a aumentar devido à escassez de matéria primas e ao processo de desertificação que ocorre em muitos ambientes no mundo (MATIAS, 2003). A revolução industrial iniciou-se em meados do século XVIII com o crescimento exacerbado das fábricas e indústrias, e conseqüentemente a substituição das energias provenientes da tração humana e animal, dos moinhos de vento, e das rodas d'água pela energia a vapor.

Para ocorrer à ebulição da água a fim de produzir vapor, deve haver o fornecimento de calor para elevar sua temperatura. No início da Revolução Industrial, este calor era produzido através da queima de combustíveis a base de carbono (carvão, óleo e gás natural), que ocasiona uma liberação de substâncias complexas na atmosfera (RIBEIRO, 2004).

O desenvolvimento industrial trouxe como resultado, o depósito de lixo orgânico e inorgânico no ambiente, além da liberação de substâncias químicas no ambiente. O próprio estilo de vida de cada indivíduo reflete as conseqüências da produção em massa, o uso excessivo de sabões, sabonetes, detergentes, por exemplo, ou também no campo tecnológico através da busca por informações que impulsiona a inovação com a finalidade de facilitar a vida cotidiana: são baterias de celulares cada vez mais modernas, pilhas, disquetes, os próprios celulares cada vez menores e mais multifuncionais.

Como tudo tem seu preço, a evolução tecnológica quando ocorre sem a preocupação com o descarte e a destinação final de seus produtos ocorre atraso e em muitas vezes retrocesso no desenvolvimento sustentável de todo um ambiente e, por conseguinte um ecossistema (RIBEIRO, 2004).

As expectativas de lucros imediatos em curtos espaços de tempo, além da ausência de efeitos nocivos em curto prazo, tem provocado um sacrifício gradual e contínuo dos ambientes naturais. Na grande maioria das vezes na sociedade moderna, os interesses econômicos de grandes empresas e empresários têm prioridade em detrimento das questões ambientais (LEMOS & TERRA, 2003).

Monitorar os possíveis impactos ecológicos e os riscos à saúde humana é uma questão problemática devido não só a complexidade e o custo decorrente da identificação das substâncias químicas envolvidas, mas também às dificuldades nas investigações epidemiológicas que necessitam um número elevado de dados (SILVA *et al*, 2003).

Segundo a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB, “*uma área contaminada pode ser definida como área, local ou terreno onde há comprovadamente poluição ou contaminação causada pela introdução de quaisquer substâncias ou resíduos que nela tenham sido depositados, acumulados, armazenados, enterrados ou infiltrados de forma planejada, acidental ou até mesmo natural*” (CONASQ, 2003).

Dentre os casos de contaminação ambiental ocorridos no Brasil por substâncias químicas envolvendo aterros sanitários que teve grande repercussão nacional, pode-se citar o caso do aterro industrial de resíduos perigosos, localizado em Santo Antônio da Posse – SP, que se tratava de um aterro de recepção de resíduos industriais de 61 indústrias, que foi fechado em 1987. Em torno de 150 mil toneladas de resíduos perigosos foram depositados em 22 mil metros quadrados, além da contaminação do solo, houve também contaminação de águas subterrâneas e, até 2001, não havia registro de indivíduos contaminados (CONASQ, 2003).

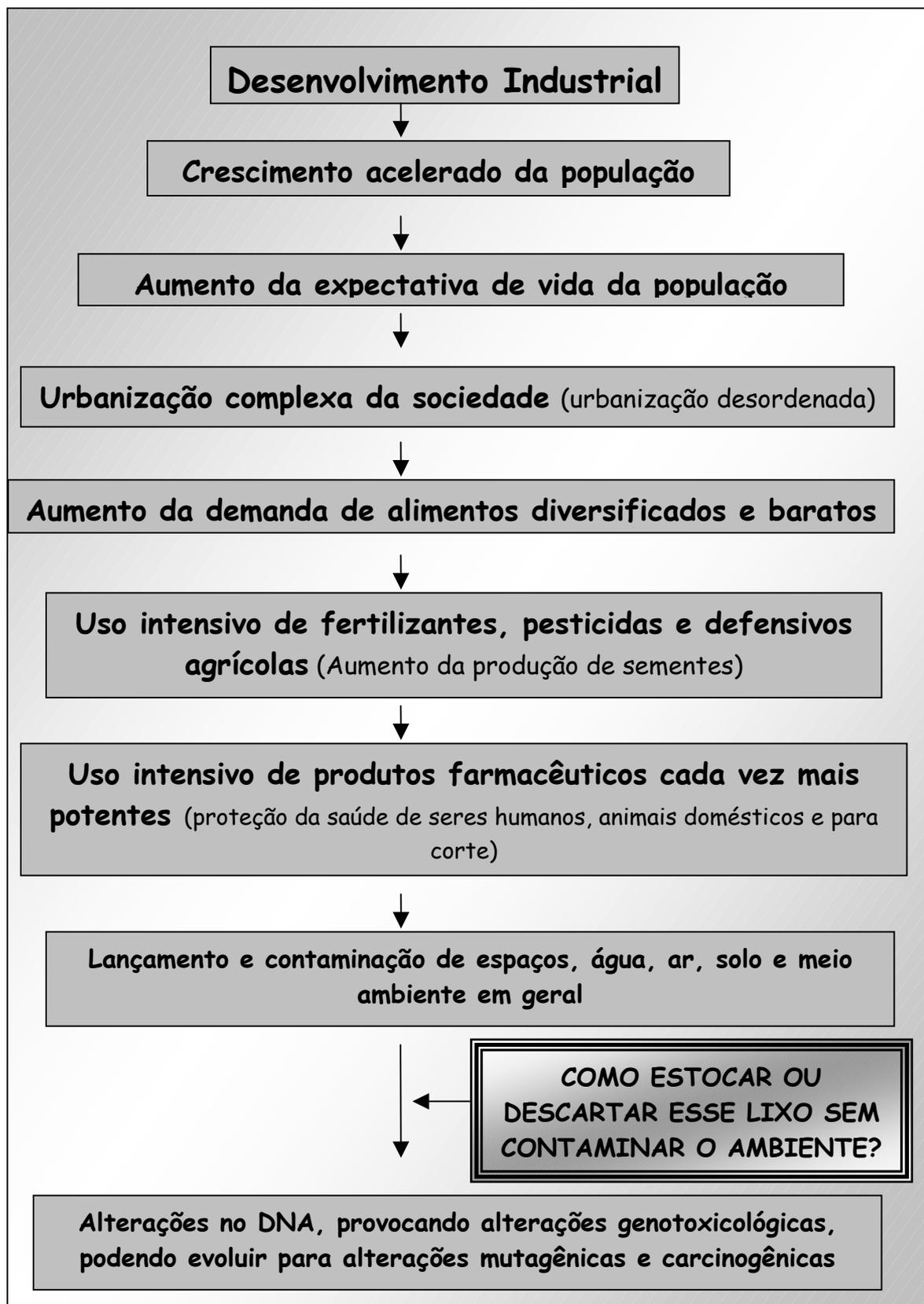
Outro exemplo pode se dar através da “Cidade dos Meninos”, que leva este denominação devido a um internato masculino, que existia no local. Localizada no município de Caxias (RJ), uma antiga fábrica de malariologia, antigo órgão do Ministério da Educação e Saúde, que na década de 50 produzia o hexaciclohexano (HCH), inseticida utilizado no controle de vetores transmissores de doenças. A fábrica iniciou seu desmonte em 1962, mas ainda permaneceram no local cerca de 13 mil m<sup>2</sup> de resíduos químicos (CONASQ, 2003).

Desde 1989 existem pesquisas objetivando encontrar soluções para o problema, a área contaminada identificada atinge cerca de 150 mil m<sup>2</sup> e, uma população diretamente exposta estimada em 370 famílias que moram perto do local. Além destas famílias, estima-se a existência de cerca de 60 outras famílias residentes ao longo do curso d’água canal do Pilar e rio Capivari, que também estiveram expostas (CONASQ, 2003).

Grandes agências de controle ambiental de diferentes países como a Sociedade de Mutagênese Ambiental (EMS americana e européia), a Comissão Internacional para Proteção contra Mutágenos e Carcinógenos Ambientais (ICPEMC), a Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMTC), entre outras, vêm recomendando a utilização de um conjunto de testes para avaliação de substâncias quanto às suas características genotóxicas principalmente, no que diz respeito à regulamentação tanto para o consumo, quanto para a liberação no meio ambiente (LEMOS & TERRA, 2003; CONASQ, 2003).

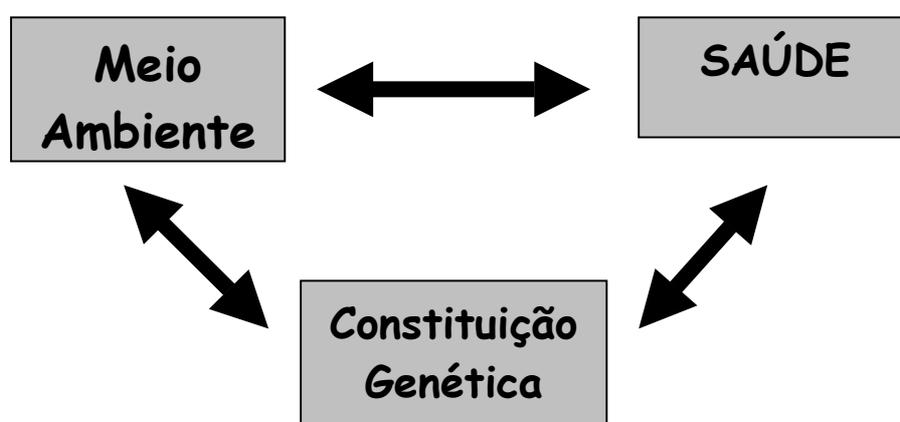
Recentemente a prefeitura de São Paulo regulamentou uma lei municipal como uma medida preventiva, obrigando proprietários de terrenos suspeitos de contaminação a apresentar laudos toxicológicos de solos antes do início de obras naqueles terrenos. A preocupação com a avaliação ambiental tem como objetivo não só a preservação do meio ambiente, mas também a qualidade de vida e a saúde humana. A poluição e/ou contaminação gerada pela disposição inadequada de resíduos, é um problema complexo que tem aumentado a preocupação dos governantes em todo o mundo, uma vez que a produção de lixo não cessa e, sua crescente geração tem causado danos às populações de diversos países (LEMOS & TERRA, 2003; CONASQ, 2003).

A modificação do ecossistema natural “saudável” resultante de interferências de disposições de lixo no meio físico interage com o meio biótico, por meio de relações físicas, químicas biológicas e radioativas, com menor ou maior intensidade de acordo com as características de exposição. A geração constante e crescente de vários tipos de resíduos sólidos evoluiu com a evolução histórica do desenvolvimento da humanidade, principalmente a partir da Revolução Industrial, o que pode ser evidenciado por meio do fluxograma da figura 3 (RIBEIRO, 2004).



**Figura 3** – Fluxograma demonstrativo do processo de geração de resíduos, baseado em RIBEIRO (2004)

Como consequência desta exposição aos efeitos dos contaminantes sobre a saúde de uma população, podem acarretar alterações cromossômicas em células reprodutivas e não reprodutivas, que podem evoluir até mesmo para um processo de mutação genética ou não (COOK & BRAZELL, 1976; MATIAS, 2003). A figura 4 apresenta o diagrama de ciclo contínuo que demonstra o mecanismo de inter-relação entre o meio ambiente, a saúde e a constituição genética, onde havendo alteração em algum destes componentes, provoca uma reação em cadeia para os demais.



**Figura 4** - Diagrama de ciclo contínuo, baseado em RIBEIRO (2004)

Todas as células possuem diversos mecanismos de reparar as lesões (danos) no DNA, ou simplesmente auxiliar as células a tolerá-las. O sistema de reparo de DNA constitui um mecanismo de defesa extremamente eficiente que garante a estabilidade do genoma e, conseqüentemente a própria existência da célula e/ou do organismo. Esses sistemas eventualmente falham e algumas lesões podem alterar o código genético de modo permanente causando mutações. Basicamente as vias de reparo de DNA podem ser classificadas em: **(i) reversão da lesão; (ii) reparo por excisão; (iii) reparo recombinacional e (iv) tolerância a lesões** (PINTO & FELZENSZWALB, 2003; AGNEZ-LIMA *et al*, 2003)

Observa-se que em muitos casos quando um organismo é exposto a um agente genotóxico que induz alterações genéticas e suspendendo a exposição do organismo ao agente verifica-se após algum tempo, que muitas alterações foram reparados naturalmente (MATIAS, 2004; RIBEIRO, 2004). Esta capacidade de regeneração é natural e ocorre quando se cessa a exposição do organismo ao agente tóxico e genotóxico e o transfere para seu ambiente natural As células por estarem em contínua renovação e devido ao seu mecanismo de reparo voltam ao seu estado natural (SAFFI & HENRIQUES, 2003).

È difícil determinar o efeito da mutação em células germinativas, mas não há dúvidas de que o câncer se constitui na preocupação mais imediata. A constatação de que a utilização de pesticidas e a contaminação dos ecossistemas com resíduos tóxicos são perigosas para a saúde humana e animal é um fato real e atual; sendo de extrema necessidade a regulamentação de normas e diretrizes visando a obrigatoriedade do monitoramento toxicológico e genotoxicológico ambiental, a fim de que sejam avaliados adequadamente os riscos e, sua posterior remediação (SILVA & DA FONSECA, 2003; ALBERTS & BRAY, 1997).

### 3.3.2. ECOTOXICOLOGIA

Segundo a Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia – SETAC, a **Ecotoxicologia** é a ciência que tem como princípio básico o estudo dos agentes físicos, químicos e biológicos sobre os organismos vivos. Particularmente sobre as populações e comunidades em seus ecossistemas, incluindo as formas de transporte, distribuição, transformação, interações e destinação final desses agentes nos diferentes compartimentos do ambiente (SETACBRASIL, 2004).

A Ecotoxicologia insere-se nas Ciências do Ambiente como ferramenta básica e essencial que subsidiará através do conhecimento, a formulação segura de dispositivos legais, normas, programas e diretrizes gerenciais para enfrentar questões de risco ecotoxicológico potencial ou real, determinado pelo uso e pelo lançamento de agentes químicos no ambiente (LAURINI, 1987).

O ambiente aquático cobre cerca de 2/3 do planeta e é habitado pela maioria das espécies viventes, sendo que os organismos aquáticos e seus habitats, têm função vital no ecossistema da terra, por estarem inseridos em uma cadeia alimentar composta de muitos outros animais aquáticos ou não (MACKAY, 1996). Nos últimos anos tem aumentado os relatos sobre danos ao ecossistema aquático e principalmente ao material genético provocado por substâncias genotóxicas (ALBERTS & BRAY, 1997; COX *et al.*, 2001).

Organismos aquáticos podem ser expostos temporariamente a derrames acidentais de poluentes na água ou a contaminantes cronicamente presentes no ambiente. Este lançamento pode ocorrer de forma **(i) intencional ou criminosa; (ii) acidental; (iii) permitida ou controlada**, visando a algum efeito considerado positivo (econômico ou do ponto de vista da saúde pública, como a aplicação de praguicidas e fertilizantes) (LÓPEZ-BAREA & PUEYO, 1998; FERNÍCOLA *et al.*, 2003).

Essas exposições da fauna aquática as genotoxinas, podem levar num contexto ecológico, a mutações herdáveis e perda na diversidade genética, com significantes implicações para a sobrevivência das populações expostas a longo prazo, oferecendo desta forma um risco para a saúde humana através da cadeia alimentar (DEPLEDGE, 1998; SILVA, 2000; MACKAY, 1996; MATIAS, 2003).

Deste modo, a genotoxicidade pode resultar em rápidas alterações na frequência dos genes em populações naturais com conseqüências ecológicas, as quais são insuficientemente compreendidas, mas são provavelmente graves. Em virtude desta constatação, vem crescendo a preocupação ecológica no que diz respeito ao monitoramento ecotoxicológico justificando e necessidade e preocupação em utilizar os peixes e os microcrustáceos nesta pesquisa (DEPLEDGE, 1998; LÓPEZ-BAREA & PUEYO, 1998; MACKAY, 1996; MATIAS, 2003).

Os estudos de ecotoxicologia incluem também a monitorização biológica que consiste em avaliar os organismos expostos, visando detectar efeitos adversos que possam indicar a exposição em níveis tóxicos de substâncias no ambiente, ou avaliar as substâncias químicas com relação aos efeitos produzidos por meio da controle de indicadores de

deficiências enzimáticas ou genéticas (LÓPEZ-BAREA & PUEYO, 1998; BARROS & DAVINO, 2003).

Ao se avaliar o risco ambiental de uma dada substância química, existe uma série de fatores que devem ser considerados, dentre os mais comuns destacam-se (BARROS & DAVINO, 2003):

- (i) **Químicos** (possíveis estados de oxidação, interações com outros materiais e impurezas, vias e produtos de degradação e biodisponibilidade, forma física);
- (ii) **Potencial de Biodegradação** (Demanda biológica e química de oxigênio, variação de temperatura, disponibilidade de oxigênio e biodegradação de produtos de interação);
- (iii) **Testes de Toxicidade Aguda** (microorganismos, plantas superiores, invertebrados, peixes, pássaros e mamíferos);
- (iv) **Testes de Toxicidade Crônica** (espécies de peixes, cadeia alimentar de invertebrados e mamíferos mais significativos);
- (v) **Desaparecimento da Atmosfera, águas de rios, lagos, solos, Bioacumulação em microorganismos, plantas superiores, invertebrados, peixes, pássaros, mamíferos e humanos;**
- (vi) **Eutroficação**, ou seja, excesso de nutrientes em águas naturais (ensaios laboratoriais da resposta em algas e outras plantas aquáticas);
- (vii) **Solos, Lodo e Sedimentos** (acumulação e liberação de outros materiais por reações de troca ou pela modificação do meio), além dos
- (viii) **Efeitos Físicos** (radiações)

### **3.4. TESTES DE TOXICIDADE**

Os testes de toxicidade são utilizados para avaliar os efeitos causados à(s) espécie(s)-teste(s) em geral animais aquáticos que sejam representativos dentro de um ambiente em estudo, quando submetidos a várias concentrações de uma ou mais substâncias ou a fatores ambientais, durante um determinado período de tempo, tendo como finalidade detectar os possíveis efeitos letais e/ou subletais destas condições. Até pouco tempo atrás estes testes eram denominados de bioensaios, ou ensaios biológicos (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990). Estes testes podem ser realizados de duas maneiras: (i) *in vivo* ou (ii) *in vitro*.

Em laboratório, os testes podem ser realizados de forma **aguda ou crônica**, sendo que na forma aguda, o organismo é exposto durante curto período de tempo, geralmente num período de 24 a 96 horas com administrações de elevadas concentrações de um agente tóxico específico. A vantagem do teste sob a forma aguda em relação à crônica refere-se à obtenção de resultados rápidos e reprodutíveis com as curvas de concentração-resposta, a identificação e a estimativa dos efeitos de substâncias químicas nos organismos aquáticos (COONEY, 1995).

A imobilidade e a letalidade são os parâmetros observados nos testes de toxicidade aguda, sendo que os demais parâmetros tais como as alterações nas atividades respiratórias, cardíacas, bioquímicas e no desenvolvimento, são considerados efeitos subletais avaliados em testes de toxicidade crônica (PRÓSPERI, 1993; COONEY, 1995).

No passado os estudos sobre poluição aquática caracterizavam-se apenas em realizar análises físico-químicas para identificar e quantificar os agentes tóxicos e, o grau de alteração nestes parâmetros baseado em normas federais e estaduais, sendo impossível indicar com clareza e confiabilidade a relação entre a quantidade de um dado agente químico e os efeitos que este poderia causar a biota. A presença de poluentes e contaminantes em baixas concentrações às vezes não detectada pelas análises físico-químicas podem ser evidenciadas através de testes de toxicidade (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990; BACCI, 1993).

Os testes de toxicidade quando direcionados e orientados a um objetivo prático bem definido como, por exemplo, o subsídio de ações de controle da poluição, utilizam-se preferencialmente reações biológicas consideradas adequadas para estimar os efeitos potenciais de agentes tóxicos sobre uma determinada comunidade de seres vivos (CETESB, 1992; KAMER & RINKEVICH, 2002). Através de estudos ecotoxicológicos, verifica-se que nem todos os efeitos observados nos organismos vivos podem ser utilizados como um objetivo prático, pois para tanto, é necessário que os mesmos tenham um significado ecológico bem definido, caso contrário o estudo muitas vezes não pode ser correlacionados (LAURINI, 1987; CETESB, 1992).

### 3.4.1. EFEITO AGUDO

O efeito toxicológico agudo é uma resposta rápida e muitas vezes abrupta dos organismos aquáticos a um determinado estímulo, que se manifesta em geral num intervalo de 0 a 96 horas. Normalmente o efeito é a letalidade, ou alguma outra manifestação do organismo que a antecede, como por exemplo, o estado de imobilidade em alguns crustáceos como a *Daphnia magna* (CETESB, 1986; CETESB, 1987a; COONEY, 1995).

Para avaliar os efeitos agudos de agentes tóxicos em testes de toxicidade usa-se geralmente a **Concentração Letal (CL50)** ou a **Concentração Efetiva (CE50)** a 50% dos organismos em teste (MATIAS, 2003; BARROS & DAVINO, 2003).

### 3.4.2. EFEITO CRÔNICO

O efeito toxicológico crônico refere-se a uma resposta referente a determinado estímulo que continua por um longo período, podendo abranger partes ou todo o ciclo de vida dos organismos. Na maioria das vezes (apesar de não ser uma regra), esses efeitos podem ser subletais, e observados em situações cujas concentrações dos agentes tóxicos permitam a sobrevivência do organismo, embora afetem uma ou várias de suas funções

biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, dentre outras (BRONW *et al*, 1991; BACCI, 1993; LU, 1996).

Para avaliar esses efeitos utilizam-se testes de toxicidade crônica nos quais é determinada a concentração do agente tóxico que não causa o efeito observado, denominada **Concentração de Efeito Não Observado (CENO)** (MATIAS, 2003; BARROS & DAVINO, 2003).

### 3.4.3. EFEITO SUBCRÔNICO

Os testes de toxicidade subcrônica são realizados para a obtenção de informações sobre a toxicidade das substâncias químicas após exposições repetidas. Esses estudos podem durar pelo menos 21 dias, mas usualmente recomenda-se 90 dias (MATIAS, 2003; BARROS & DAVINO, 2003; CHASIN & PEDROSO, 2003).

Em geral este é o primeiro e o único teste, com doses repetidas a ser realizado para determinadas substâncias químicas, destacando-se como principais objetivos:

*(i) Estabelecimento dos níveis nos quais não são mais observados os efeitos tóxicos;*

*(ii) Identificação e caracterização dos órgãos afetados e a severidade após exposições repetidas;*

*(iii) Estabelecimento quanto a reversibilidade dos efeitos tóxicos no organismo, determinando-se assim se o período de observação pós-tratamento é necessário ou não* (MATIAS, 2003; BARROS & DAVINO, 2003; CHASIN & PEDROSO, 2003; MATIAS, 2004).

### 3.4.4. EFEITO CRÔNICO versus EFEITO AGUDO

Quando efluentes líquidos mesmo os tratados (esgoto, chorume, efluentes industriais), são lançados de forma contínua no ambiente aquático, podem ocorrer **efeitos**

**crônicos** (longo prazo), uma vez que os organismos estão sendo expostos a baixas concentrações contínuas, de determinados poluentes durante longos períodos de tempo.

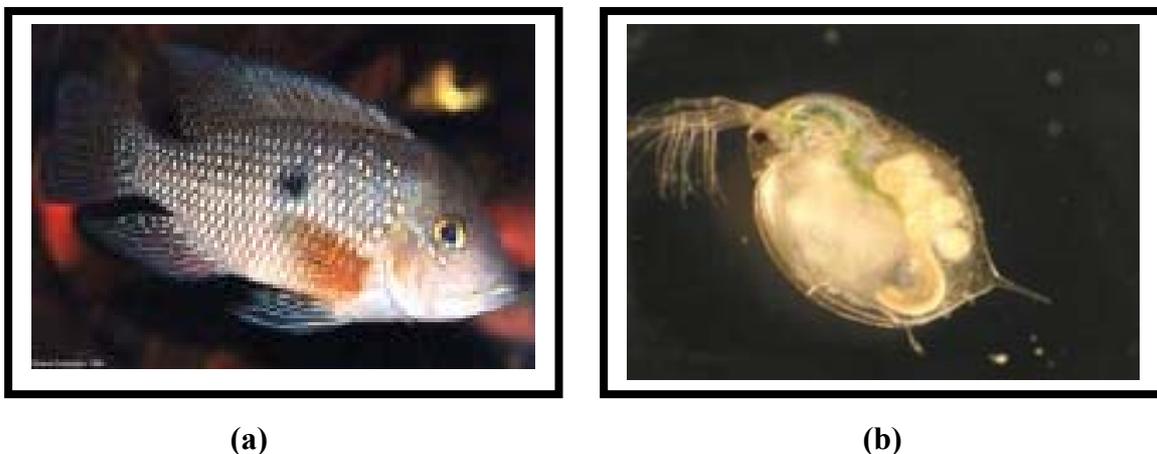
Quando os poluentes possuem dentre suas características a biodegradabilidade, ocorrerá um equilíbrio na diversidade ecológica a uma certa distância do seu lançamento. Porém ao longo do trecho em que está ocorrendo este processo de reações físico-químicas e biológicas de degradação, os organismos possivelmente sofrerão alterações significativas os não em sua estrutura fisiológica e/ou metabólica, podendo levar a mudanças na estrutura e funcionamento do ecossistema aquático em questão (LU, 1996; BARROS & DAVINO, 2003; MATIAS, 2004).

Em se tratando de acidente ambiental (derramamento de produtos químicos, vazamento de efluentes industriais...), que ocasione uma distribuição anômala de poluente para o corpo hídrico, a exposição de elevadas concentrações de agentes tóxicos, mesmo que por um curto espaço de tempo, pode causar letalidade em organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos (de *trofi*, nutrição em grego), mas que estão ligados através de uma trama alimentar incluindo seres vivos de diversos ecossistemas ocorrendo, afetando de **forma aguda** todo o ecossistema. Embora costumeiramente estes episódios de letalidade são relatados como “mortandade de peixes”. Dependendo dos efeitos que se deseja analisar deve-se levar em conta, todo o processo que o ocasionou (BRONW *et al.*, 1991; CHASIN & PEDROSO, 2003).

### 3.5. BIOINDICADORES AQUÁTICOS

Bioindicadores são organismos ou comunidades cujas funções vitais se correlacionam tão estreitamente com determinados fatores ambientais, que podem fornecer informações sobre as condições de um ecossistema, como por exemplo, o valor do pH ou a concentração de metais pesados na água. Muitos organismos são utilizados como bioindicadores em testes de toxicidade aguda para avaliar a qualidade do meio onde se encontram (LU, 1996; BAPTISTA, 2001). Para testes de toxicidade utilizando animais, os chamados bioensaios, são realizados em geral com três organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos do ambiente aquático. Normalmente utilizam-se algas,

microcrustáceos (Figura 5b) e peixes (Figura 5a), representando cada qual um nível trófico diferente (SILVA, 2000; FLOHR, 2004).



**Figura 5-** Bioindicadores aquáticos: **(a)** peixe *Geophagus brasiliensis* (Fonte: [www.aquanet.de](http://www.aquanet.de)\ acesso em novembro de 2004); **(b)** microcrustáceo *Daphnia magna* (Fonte: [www.kulac.ac.be](http://www.kulac.ac.be)\ acesso em novembro de 2004).

### 3.5.1. *Geophagus brasiliensis* (Acará, Cará)

O *Geophagus brasiliensis*, ou cará como é conhecido popularmente é um peixe da família cichlidae (Ciclídeos) e, ordem perciformes originário da América do Sul (Brasil), típico de lagos, córregos e açudes, possui um comprimento máximo de 25 cm, e atinge sua maturidade sexual com 1 ano (Figura 5a). É um animal ovíparo e sua desova ocorre em pedras e grutas (BAINY, 2004; SAUDE ANIMAL, 2004).

È um peixe típico de água que possui temperaturas quentes (22 a 28° c) e pH básico entre 6,8 e 7,5. Apresenta comportamento pacífico, porém territorialista, possuindo características social-solitário ou em casal, mas necessita de um aquário de porte médio a grande. Quanto ao dimorfismo sexual da espécie, a protuberância cefálica não é indicativo do indivíduo ser macho ou fêmea (BAINY, 2004), pois diversos *Geophagus brasiliensis* foram capturados na represa municipal de São José do Rio Preto (SP) para análise estomacal e gonadal, e tanto machos quanto fêmeas possuíam a protuberância (AQUA ON LINE, 2004).

Testes utilizando peixes como bioindicadores de toxicidade já possuem regulamentações nacionais e internacionais. A ABNT através da NBR 00:001.44-001(2003b) dispõem sobre métodos de ensaios com peixes para toxicidade.

### 3.5.2. *Daphnia magna*

A *Daphnia magna* popularmente conhecida como pulga-d'água, é um microcústáceo planctônico dulciaquícola, natural de regiões temperadas, facilmente encontrado em lagos e represas de águas continentais na América do Norte, podendo sobreviver em locais em que a dureza da água seja maior que 180 mg/l (CaCO<sub>3</sub>), oxigênio dissolvido menor do que 4 mg/l, temperatura da água entre 6° a 22° C e pH da água entre 6,5 e 10 (LAITANO, 2003; EPA,1993).

Pertencente à Classe Branchiopoda (pés com brânquias), classe que é composta de diminutos crustáceos, quase inteiramente restritos a água doce, a *Daphnia magna* (figura 5b) é um pequeno crustáceo (pode variar entre 0,5 a 5,0 mm) de água doce, pertencente ao filo Artrópoda, sub-filo Crustácea, e ordem Anomopoda, sub-ordem, Cladocera, família Daphniidae, Gênero *Daphnia* e espécie *magna norte* (ELMOOR-LOUREIRO, 1997).

Estes bioindicadores ou reativos biológicos vem sendo largamente utilizado, para cálculo da **CL50** em diversos tipos de efluentes (EPA, 1993; ELMOOR-LOUREIRO, 1997) e, são utilizados pelos centros de investigação em suas análises toxicológicas, devido a diversas características típicas da espécie como:

- (i) Apresentem-se em grande distribuição geográfica, além de possuírem uma fácil manutenção em laboratório;
- (ii) Apresentem um curto ciclo de vida;
- (iii) Possuírem numerosa descendência,e
- (iv) Apresentem sensibilidade a uma grande variedade de contaminantes químicos e biológicos como efluentes de diversas indústrias, com alto grau de potencial poluidor.

BRENTANO & LOBO (2002) utilizaram a *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladocera, Crustácea), em ensaios ecotoxicológicos de efluentes de curtume da região do Vale do Rio Pardo no Estado do Rio Grande do Sul, da mesma forma como Finkler (2002), avaliou o efeito tóxico de líquidos percolados sobre o sistema reprodutivo da *Daphnia magna* e Baptista (2001) avaliou a toxicidade de efluentes gerados em uma indústria têxtil catarinense e, finalmente Laitano (2003), que utilizou a *Daphnia magna* através de testes de toxicidade como uma ferramenta para avaliação de um reator experimental **RAFA/UASB** (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente).

Largamente utilizada em aquicultura e aquariofilia, as pulgas-d'água são encontradas no mercado normalmente na forma desidratada. Constituem bom alimento por serem ricas em iodo, fósforo e cálcio, porém devem ser ministradas no máximo três vezes por semana por serem muito ricas em vitamina A e por terem seu corpo constituído na maioria, por água e partes não assimiláveis (BRENTANO & LOBO, 2002; LAITANO, 2003).

### **3.6. TESTE DO COMETA**

Com os avanços tecnológicos, vem crescendo também a busca contínua de novas tecnologias capazes de mensurar e analisar possíveis impactos que determinadas substâncias possam vir a causar nos seres vivos. Entre as novas técnicas de biomonitoramento, as que permitem a detecção de danos no DNA têm sido úteis em estudos de toxicologia ambiental, carcinogênese e envelhecimento celulares (AMES, 1983; CERUTTI, 1985).

O Teste do Cometa vem sendo proposto em estudos sobre efeitos genéticos, por apresentar características particulares e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Uma de suas peculiaridades, diz respeito ao fato do mesmo não analisar mutações, mas sim alterações genômicas, que após todo seu processamento podem resultar em mutações (KLAUDE *et al.*, 1996; COX *et al.*, 2001; GONTIJO & TICE, 2003).

O teste é um importante método para analisar, quantificar e qualificar os danos no DNA de uma célula individualmente, utilizando uma técnica de gel de eletroforese com uma solução alcalina, não é utilizado para detecções de mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. O teste também pode ser utilizado para estudos de reparo de DNA (KLAUDE *et al.*, 1996; RIBEIRO *et al.*, 2003).

Em 1978, Rydberg & Johanson foram os primeiros pesquisadores a quantificarem danos diretamente no DNA de células individuais, através do processo de lise das células depositadas e embebidas em gel de agarose sob condições levemente alcalinas (tendendo a neutralidade), a fim de permitir a desnaturação do DNA. Depois da neutralização, o DNA era corado com alaranjado de acridina (*acridine orange*) e a dimensão do dano era mensurada através da razão do verde (indicando a quantidade de DNA em fita dupla) com o vermelho (indicava o DNA em fita simples) usando um fotômetro fluorescente (McKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993).

Inicialmente o teste foi concebido em células de mamíferos, mas após diversas variações permissíveis ao teste, este tem sido utilizado também células de peixes (DE FLORA, 1991, DE FLORA, 1993, PANDRANGI *et al.*, 1995; BELPAEME *et al.*, 1996; NACCI *et al.*, 1996; VILLARINI, 1998), em invertebrados (VERSCHAEVE & GILLES, 1995; NACCI *et al.*, 1996; STEINERT *et al.*, 1998; WILSON *et al.*, 1998; COX *et al.*, 2001; FERNANDES, 2004). Já existem pesquisas utilizando tecidos celulares como as brânquias de mexilhões *Mytilus edulis* (WILSON *et al.*, 1998), entre outros tipos celulares.

Mais tarde em 1984, Östling & Johanson apresentaram uma nova tecnologia que objetivava aumentar a sensibilidade e a resolução da detecção da destruição parcial ou total do DNA de quase todos os tipos de células individuais eucarióticas, utilizando o “*fluorescent halo assay*”. O teste foi desenvolvido e chamado de “*a técnica de eletroforese em microgel*” (ÖSTLING & JOHANSON, 1984).

Nesta técnica as células eram depositadas em lâminas de microscopia contendo uma fina camada de (filme) agarose, depois lisadas com uma solução neutra de detergente, o que levava a uma expansão do DNA no espaço anteriormente ocupado pelo citoplasma e, em seguida realizada a eletroforese por um curto período de tempo, a baixa voltagem (5

V/cm) sob condições neutras. Após o término da eletroforese, as células eram coradas com corante fluorescente específico para DNA, para então o DNA das células individualizadas serem visualizados por microscopia de fluorescência (GONTIJO & TICE, 2003; RIBEIRO, 2004).

Células com dano mostram migração do DNA nuclear em direção ao ânodo formando uma cauda rastro (WESTERFIELD & BLACK, 1997). Singh *et al.* (1988) introduziram mudanças no protocolo original, descrito por Östling & Johanson, ou seja, realização do ensaio passou a ocorrer em condições alcalinas, que promoveriam a desespiralização da dupla fita de DNA, tornando as quebras bem mais evidentes.

O nome “Comet Assay” (teste do cometa) sugerido por Olive (1989) refere-se à aparência semelhante a “um cometa” que ocorre quando o DNA danificado migra em direção ao ânodo. O teste também ficou conhecido pelo nome de **SINGLE-CELL GEL (SCG) ASSAY** (OLIVE, 1989). A interpretação dos resultados neste ensaio refere-se à quantificação do dano causado ao DNA, por meio da comparação das duas partes distintas do “cometa”: a “**cabeça**” e a “**cauda**”. De forma que as células sem ou com pouco dano no DNA não apresentariam cauda, enquanto que as células com mais danos apresentariam caudas maiores (TICE, 1995).

A migração das alças relaxadas e/ou DNA danificado (fragmentos livres) para o ânodo (pois o núcleo é negativo, sendo então atraído para o pólo positivo), pode ser quantificada em microscópio de epifluorescência, pois as células são coradas com brometo de etídio que é intercalante de dupla fita de DNA e, torna o DNA fluorescente à luz ultravioleta. Como muitos testes existentes, o teste do cometa permite variações, o que lhe garante grande flexibilidade de utilização, não só quanto ao tipo celular analisado, mas também quanto aos tempos pré-determinados em cada etapa do teste e, algumas soluções (ÖSTLING & JOHANSON, 1987).

Em caso de animais marinhos invertebrados como as ostras, mariscos e mexilhões são utilizados a solução salina de Kenny, para o preparo de agarose LMP (PANDRANGI *et al*, 1995; STEINERT *et al*, 1998; LEE & STEINERT, 2003; FERNANDES, 2004) e,

em se tratando de células oriundas de animais vertebrados é preparada com o tampão de fosfato PBS (VILLARINI *et al.*, 1998, LEE & STEINERT, 2003).

Uma das variações mais comuns no teste do cometa para detecção de danos no DNA, diz respeito à situação alcalina ou neutra da solução de lise. A lise celular, sob condições neutras em que a faixa de pH esteja compreendida entre 7,5 – 9,0 seguidas de eletroforese, permite detectar quebras da dupla-fita de DNA, mas não permite a detecção de quebra do DNA em fita simples (GONTIJO & TICE, 2003; SINGH & STEPHENS, 1997). As condições alcalinas, introduzidas posteriormente, além de permitirem este tipo de visualização, degradam o RNA eliminando um possível agente de interferência na quantificação das amostras coradas com o brometo de etídio (SINGH *et al.*, 1988).

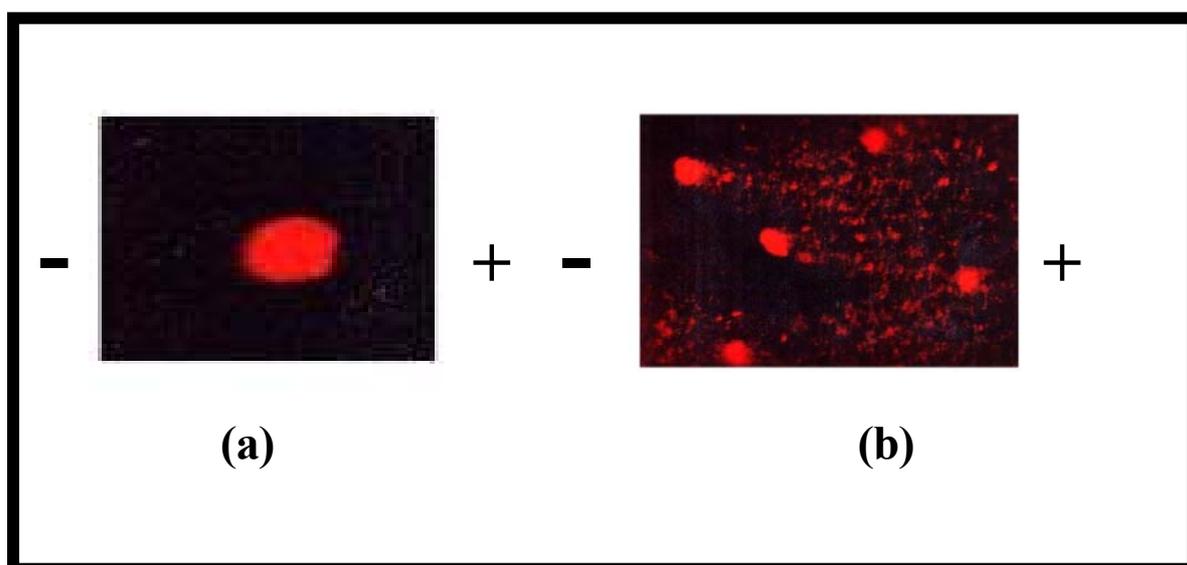
Este teste é essencialmente comparativo, sendo que sempre é necessário à presença simultânea de um controle positivo e de um controle negativo, para que a mensuração do dano esteja compreendida basicamente entre estes dois limites. Essa precaução se deve ao fato de não existir células sem dano no DNA, visto que o próprio metabolismo celular pode gerar em torno de 1000 lesões diárias no DNA/célula (KOBAYASHI, 1995; RIBEIRO *et al.*, 2003).

O princípio deste teste é a detecção do dano causado num organismo vivo, através da degradação do material genético em uma microeletroforese em gel de agarose. As células expostas a algum agente genotóxico são submetidas a vários tratamentos, nos quais elas são lisadas, seu genoma é exposto a um tampão alcalino (pH 10) e, neste momento, ocorre a desespiralização da dupla hélice de DNA (KOBAYASHI, 1995; RIBEIRO *et al.*, 2003).

Em seguida, essas células são submetidas a uma microeletroforese, que pode variar de 15 á 40 min, em lâminas de microscópio, recobertas com agarose, que permitirá medir a migração dos fragmentos de DNA para fora do núcleo, através da matriz constituída pela agarose (SINGH *et al.*, 1988). A fixação do material nas lâminas é realizada com álcool absoluto na maioria das vezes antes do processo de coloração. Após a coloração com o agente fluorescente e intercalante de DNA (brometo de etídio), as células são visualizadas no microscópio de epifluorescência (KLAUDE *et al.*, 1996; FAIRBAIRN *et al.*, 1998).

Quando o DNA apresenta algum tipo de lesão, os núcleos celulares apresentam a forma de um cometa, o que dá o nome à técnica (FAIRBAIRN *et al.*, 1998; STEINERT *et al.*, 1998; WILSON *et al.*, 1998), como mostram as figuras 6a e 6b. As diferentes aparências dos cometas dependem do tipo de eletroforese utilizada, tipo celular em estudo. Cometas originados sob condições neutras têm cauda sólida, enquanto cometas gerados em condições alcalinas se apresentam mais dispersos (KLAUDE *et al.*, 1996).

Singh *et al.* (1988) foram os primeiros a comprovar que o tamanho da cauda do cometa está diretamente relacionado com o grau de destruição do DNA, ou seja, quanto maior a cauda do cometa, maior o dano e, vice versa para o caso da não ocorrência de danos (lesões).



**Figura 6** – Migração do material nuclear (DNA) do peixe *Geophagus brasiliensis* utilizando o Ensaio do Cometa. O DNA migra da cabeça para a cauda em direção ao ânodo (+). **(a)** células sem dano e **(b)** células com dano, formando cometas. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.

Este método é altamente sensível para detectar a degradação do DNA, onde cada célula pode ser utilizada na análise estatística do estudo. Seu custo é relativamente baixo e requer pouco tempo, (aproximadamente 3h) quando comparado a outros métodos para detecção da genotoxicidade (McKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993; SINGH *et al.*, 1988).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. ATERRO SANITÁRIO URBANO EM ESTUDO**

O aterro sanitário, onde foi realizada parte desta pesquisa, recebe lixo domiciliar de 35 municípios catarinenses e, lixo hospitalar de 17 cidades do Estado. No total, recebe cerca de 11.500 toneladas por mês de resíduos sólidos na baixa temporada (período letivo) e 14.500 toneladas por mês durante a alta temporada (período de férias e verão), nos meses de novembro a março (IBGE, 2004).

#### **4.1.1. TRATAMENTO ADOTADO PARA O CHORUME BRUTO PROVENIENTE DO ATERRO SANITÁRIO URBANO.**

O líquido percolado ou chorume, produzido no aterro sanitário de resíduos sólidos urbano em questão, recebe tratamento físico-químico e biológico. A seqüência dos processos do tratamento do líquido percolado está demonstrado na Figura 7. A captação deste percolado no aterro ocorre através de drenos específicos para esta finalidade, através do qual o chorume é conduzido ao tanque de equalização (poço de captação), onde ocorre um processo anaeróbio com circulação forçada do tipo reator vertical, com o objetivo de reter os metais pesados e homogeneizar os efluentes, para a próxima etapa do tratamento que ocorre num reator tipo **RAFA/UASB** (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente).

No reator RAFA/UASB, inicia-se o processo de biodegradação da matéria orgânica, onde são então adicionados produtos químicos como cal, polímeros e sulfato de alumínio. Após este pré-tratamento o efluente segue para a próxima etapa composta de um conjunto de lagoas de estabilização ligadas em série (anaeróbia, facultativa, oxigenação e polimento), que irão tratar estes efluentes por processos aeróbios e anaeróbios (FINKLER, 2002; LAITANO, 2003).

O tratamento biológico composto de lagoas de estabilização (Figura 7) inicia-se pela lagoa anaeróbia onde ocorre à fermentação ácida (conversão da M.O. em ácidos) e a

fermentação metônica (conversão dos ácidos gerados em  $\text{CO}_2$ , metano em água). É nesta fase que as bactérias vão atacar a parte orgânica, provocando a biodegradação.



**Figura 7** – Esquema da Estação de Tratamento do líquido percolado proveniente do Aterro Sanitário e a localização dos aquários *in situ*.

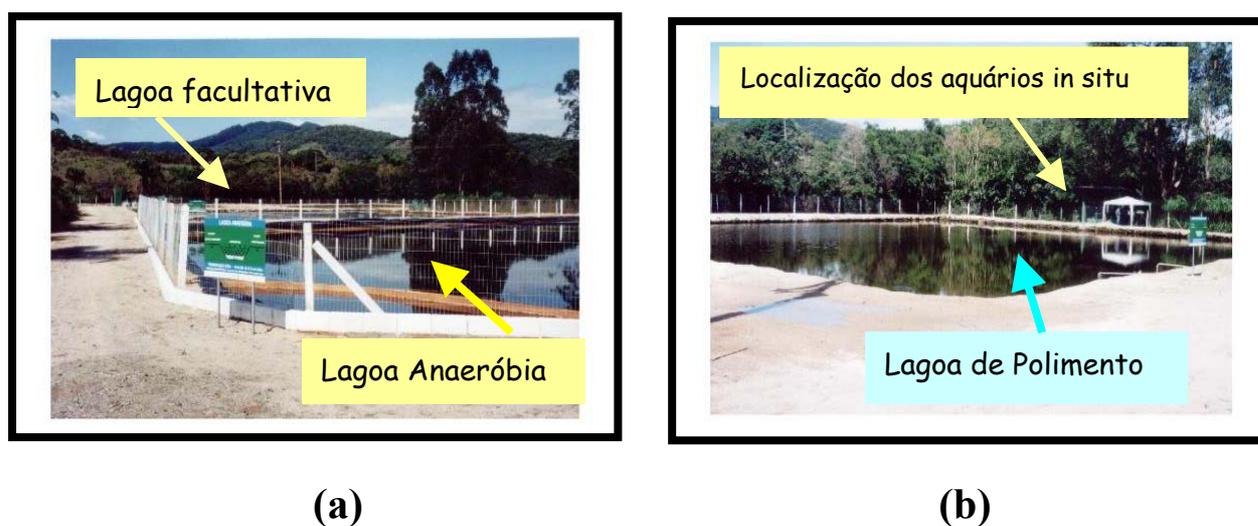
Em seguida o efluente da lagoa anaeróbia é conduzido para a lagoa facultativa onde, pela sua concepção, possui uma menor profundidade em relação à lagoa anterior, existindo uma maior participação da luz solar na massa líquida, ocorrendo desta forma: respiração aeróbia, fotossíntese e respiração anaeróbia. O efluente da lagoa facultativa segue então para a lagoa de oxigenação ou, mais comumente chamada lagoa aerada, onde através da introdução artificial por meio de um aerador, é fornecido  $\text{O}_2$  para toda a massa líquida. Finalizando a seqüência de lagoas, o efluente é então conduzido para a lagoa de maturação, também conhecida como lagoa de polimento (CLARETO, 1997; DA LUZ, 1998; FINKLER, 2002).

Esta forma de lagoa não é profunda e, possui a finalidade de através da irradiação solar e das altas concentrações de  $\text{O}_2$ , destruir os organismos patogênicos e remover os coliformes fecais, quando comparadas as lagoas anteriores. As Figuras 8a e 8b mostram a

localização das lagoas de estabilização e, dos aquários *in situ* (LIMA, 1991; CLARETO, 1997; LAITANO, 2003).

Após a finalização do tratamento biológico através dos processos descritos, o efluente, então já tratado passa por uma desinfecção com hipoclorito de sódio em um tanque de aço, seguido de um canal de chincanas, para que haja um maior contato e homogeneização entre o percolado tratado e o desinfetante. Sendo então lançado num canal artificial, que desembocar no córrego chamado “inferninho” e, posteriormente na orla marítima.

O tanque definitivo de aço, também denominado de AQUÁRIO DE AÇO, onde se processou o experimento *in situ*, possui sistema contínuo de circulação de efluente tratado, não ficando com massa líquida estacionária.



**Figura 8** – (a) Esquema da Estação de Tratamento de Chorume do Aterro Sanitário onde foi realizada a pesquisa. (b) localização dos aquários *in situ*. Fonte: LabTox/ Vanessa Guimarães Machado.

## **4.2. PREPARAÇÃO DOS AQUÁRIOS E ACLIMATAÇÃO DOS PEIXES (*Geophagus brasiliensis*)**

### **4.2.1. PREPARO DOS AQUÁRIOS NO ATERRO SANITÁRIO (DETERMINAÇÃO DA GENOTOXICIDADE CRÔNICA)**

Na elaboração das etapas que se procederam nesta pesquisa, incluindo a preparação dos aquários, aclimatação dos peixes, transferência para o aquário final (tanque de aço) e, demais processos, os procedimentos seguiram as normas descritas na ABNT e CETESB, adaptadas as condições e a realidade do local *in situ* e do LabTox (CETESB,1986; CETESB,1987; CETESB,1988; CETESB,1992; ABNT, 2003b).

Outro item que deve ser explicitado, diz respeito às normas básicas de biossegurança, utilizadas durante a realização desta pesquisa (DA COSTA, 2000; TEIXEIRA & VALLE, 1996; VALLE, 2002).

#### **4.2.1.1 AQUÁRIOS CONTROLE**

Foram instalados no local 2 aquários de vidro com as seguinte dimensões: 30 cm x 30 cm x 30 cm. O volume útil de água utilizado foi de 21,6 l, correspondendo a uma profundidade de 24 cm.

Os aquários eram compostos de: (i) filtro de carvão ativado (só no aquário de controle), (ii) termômetro, (iii) aeradores, (iv) pedras lavadas para o fundo e (v) tampa. No período em que foram realizados os testes, não houve necessidade de aquecedores para os aquários, pois as temperaturas (monitoradas duas vezes ao dia) permaneceram dentro das permitidas para os animais.

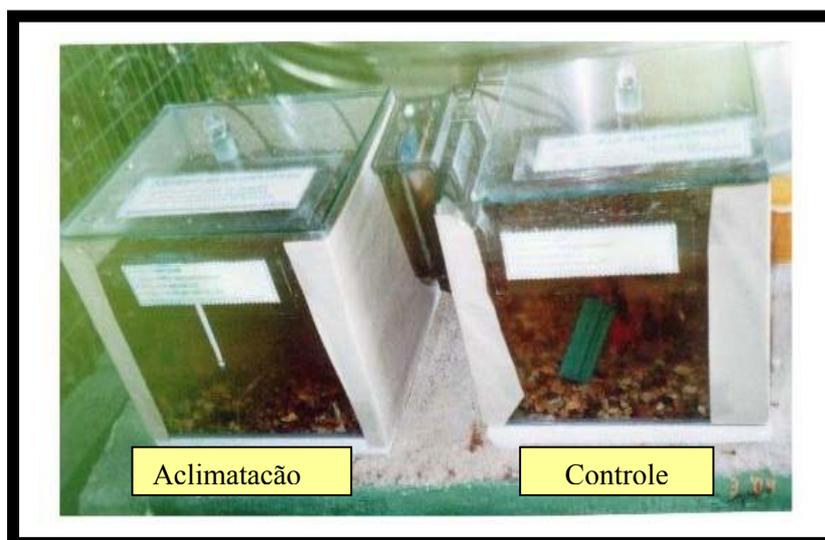
Cada aquário ficou com uma camada de aproximadamente 5,0 cm de pedras lavadas. Não foi colocado filtro no aquário de aclimatação, pois a água era renovada

diariamente conforme programação. O 1º aquário chamado de AQUÁRIO-ACLIMATAÇÃO destinou-se a adaptação dos peixes ao efluente das lagoas de estabilização, até a transferência para o aquário/tanque de aço inox definitivo (Figura 9.

Num primeiro momento, o aquário foi preenchido com água limpa proveniente de uma fonte natural, localizada no alto do morro nos arredores do aterro. Foram adicionados 10 peixes (*Geophagus brasiliensis*). O período de aclimatação durou 6 dias.

O 2º aquário denominado AQUÁRIO CONTROLE destinado à utilização de animais para controle dos testes, foi preenchido com a mesma água da fonte, utilizada no processo de enchimento do aquário de aclimatação. O aquário apresentado na figura 9 foi utilizado como aquário controle, durante o período de aclimatação dos peixes e, a realização do teste de genotoxicidade crônica de 30 dias. Para a realização dos demais experimentos crônicos com exposição de 60 e 90 dias e para os de genotoxicidade aguda, utilizou-se os peixes mantidos no aquário controle da Figura 11a.

Toda a água utilizada para a limpeza e manutenção dos aquários era oriunda desta fonte. Foram então adicionados 10 peixes (*Geophagus brasiliensis*) em cada aquário.



**Figura 9** - Aquários de Aclimatação e Controle respectivamente, localizados na área do aterro sanitário, onde foi realizado o trabalho de pesquisa. Fonte: LabTox / Vanessa Guimarães Machado.

#### 4.2.1.2 AQUÁRIO DEFINITIVO (AQUÁRIO DE AÇO)

O aquário definitivo utilizado durante a pesquisa, de propriedade da empresa responsável pelo aterro sanitário, constituía-se de um tanque de aço inox, com fundo de grade removível, instalado na saída do sistema de tratamento do chorume, recebendo continuamente o efluente da Estação de Tratamento de Efluentes – ETE. As dimensões do aquário eram de: 104 cm x 140 cm x 9 cm, a partir da grade removível, disponibilizando um volume (para utilização dos peixes) de 138,32 l (Figura 10).



**Figura 10** - Detalhe do Aquário de aço (Aquário definitivo), localizado na área do aterro sanitário, onde foi realizada a pesquisa. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.

A limpeza do aquário era realizada semanalmente, com limpeza do gradeamento, paredes e desobstrução das passagens, sem a utilização de nenhum tipo de produto químico.

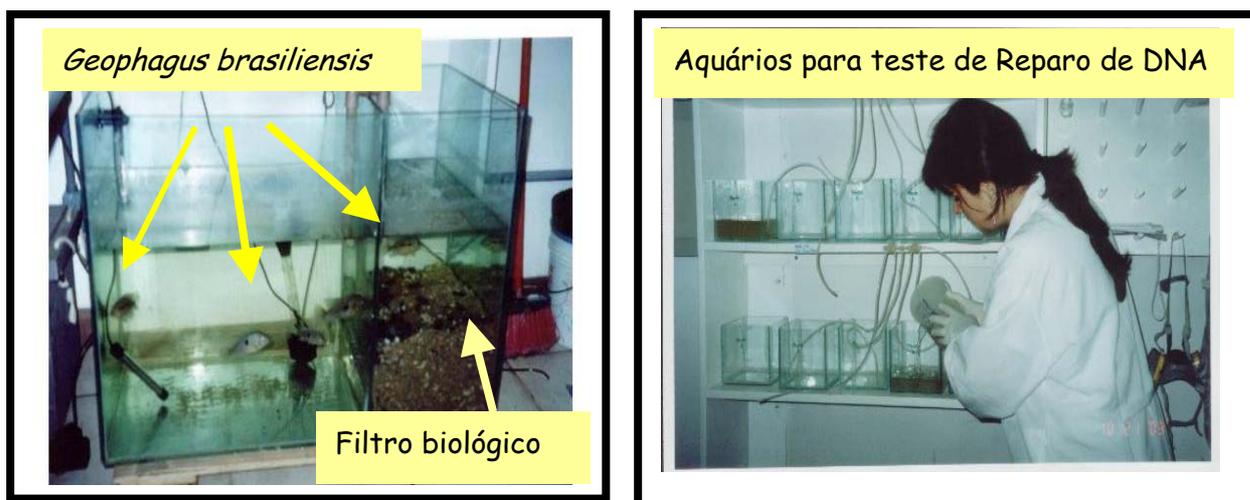
#### 4.2.2. PREPARO DOS AQUÁRIOS NO LABTOX (DETERMINAÇÃO DA GENOTOXICIDADE AGUDA E REPARO CELULAR)

Os procedimentos para o preparo do experimento seguiram as normas descritas na ABNT e CETESB, adaptadas as condições do local e do LabTox (CETESB,1987a; CETESB, 1987b; CETESB, 1988; CETESB, 1992; ABNT, 2003b), associados a procedimentos básicos de biossegurança como uso de luvas descartáveis, sapatos fechados de material impermeável e álcool 70° para assepsia das mãos (DA COSTA, 2000; FERNANDES, 2004).

Para detecção de genotoxicidade aguda com exposição de 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, os animais foram mantidos em um aquário plástico, semi coberto, com volume útil de 60 litros (referente a 60 litros de efluente tratado de chorume trazido da ETE do aterro sanitário). O LabTox cultiva os peixes *Geophagus brasiliensis*, (oriundos de uma criação particular de peixes na cidade de Criciúma-SC), a fim de serem utilizados em pesquisas. Os animais eram alimentados diariamente com ração granular apropriada.

O aquário plástico foi equipado com 2 (dois) aeradores, 2 (dois) filtros de carvão ativado, 1 (um) aquecedor e 1 (um) termômetro. A cada 24 h, eram retirados 4 (quatro) animais deste aquário, sendo que 2 (dois) animais eram transferidos para o 2 (dois) aquários com 2 (dois) litros (cada) de água limpa desclorada e aerada, (Figura 11 b), a fim de avaliar o papel desta transferência, nos mecanismos de reparo do DNA dos animais após exposição ao efluente tratado. Os outros 2 (dois) animais eram utilizados para avaliação de genotoxicidade aguda.

Para os testes de verificação do mecanismo de reparo de DNA utilizou-se aquários com estrutura de vidro, inclusive a tampa, possuindo um volume útil de 2 (dois) litros e, individualizados para cada animal. Cada aquário foi equipado com 1 (um) aerador, e a temperatura era medida diariamente.



(a)

(b)

**Figura 11** – Aquários instalados no LabTox: **(a)** aquário controle onde são criados os carás (*Geophagus brasiliensis*). **(b)** montagem dos aquários para avaliar se existe reparo nas células com dano. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.

O teste de avaliação do potencial de reparo de DNA obedeceu ao mesmo tempo aplicado aos tempos de exposição aguda, de forma que os animais expostos ao efluente por 24 h, ficaram 24 h em água limpa, tratada e aerada.

Os animais expostos por 96 h ficaram 96 h em água limpa, tratada e aerada e assim sucessivamente, sendo que a correlação entre o tempo de exposição de reparo e o tempo de exposição aguda, foi estabelecida considerando uma igualdade de tempos, como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1** – Relação entre o tempo de exposição aguda dos animais no líquido percolado do aterro sanitário e o tempo de exposição dos animais na água limpa, para verificação da existência de reparo no DNA.

TEMPO DE EXPOSIÇÃO NO LÍQUIDO PERCOLADO (h)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO NA ÁGUA LIMPA (h)
24	24
48	48
72	72
96	96
120	120

#### 4.2.3. ACLIMATAÇÃO DOS PEIXES

A aclimatação dos peixes iniciou em 12/03/2004 e foi concluída em 18/03/2004. Durante todo o período de adaptação, a água do aquário era trocada diariamente pelo efluente tratado, proveniente do aquário de aço.

No primeiro dia foram substituídos 3 l de água, sem que houvesse alteração comportamental dos animais, nos demais dias foram substituídos 4 l de água dos aquários diariamente, até o término da aclimatação.

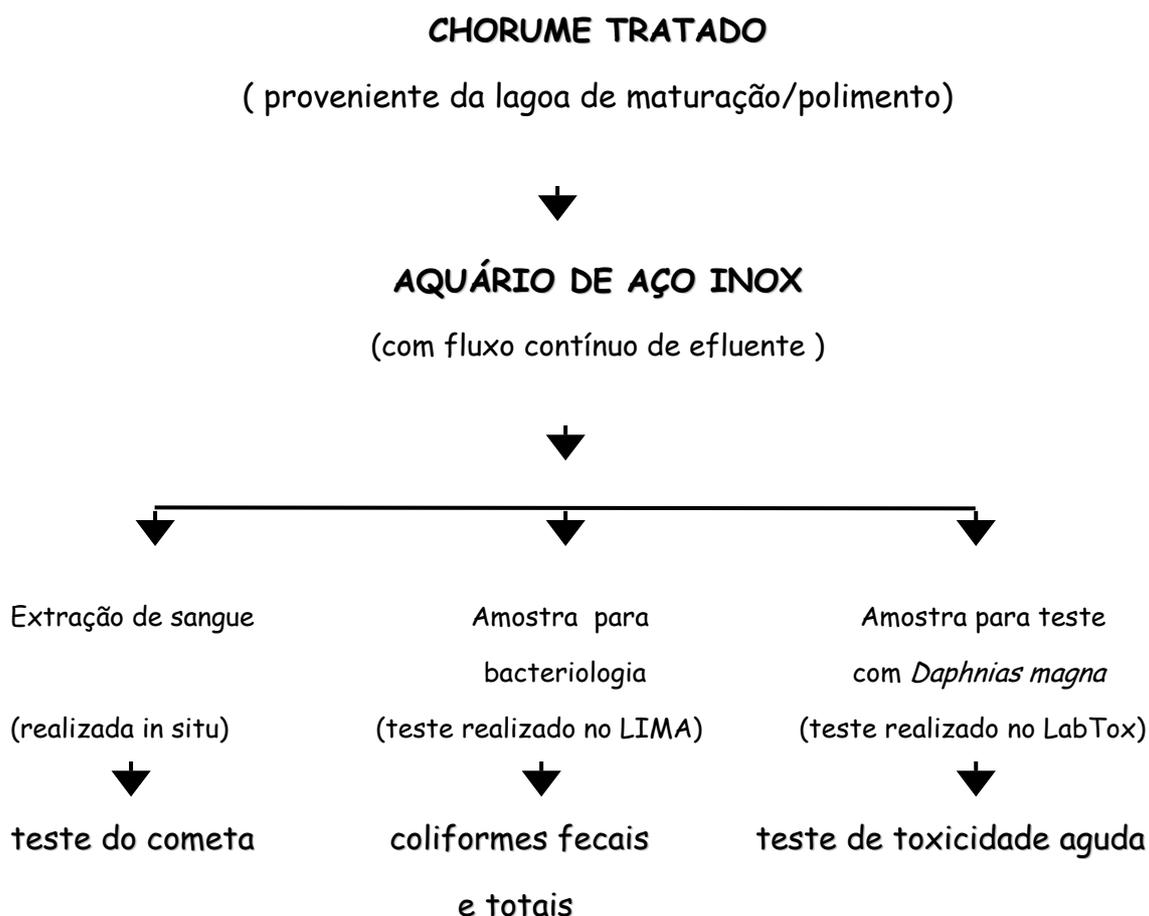
Simultaneamente ao início do período de aclimatação foi realizada um experimento colocando 3 (três) carás diretamente no tanque de aço definitivo sem terem qualquer tipo de aclimatação.

### 4.3.AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, BIOLÓGICO, TOXICOLÓGICO E GENOTOXICOLÓGICO

No experimento foram realizadas análises envolvendo parâmetros físico-químicos, biológicos, toxicológicos e genotoxicológicos. O fluxograma da Figura 12 descreve o processo de realização das análises. O experimento ocorreu em duas etapas distintas:

1º Etapa: Avaliação do potencial de Genotoxicidade Crônica e Toxicidade Aguda: Esta 1ª etapa, envolveu o processo de aclimatação dos peixes em aquário *in situ*, e a realização de análises físico-química, biológica, toxicológica aguda com *Daphnias magna* e genotoxicológica crônica com *Geophagus brasiliensis*.

2º Etapa: Avaliação do potencial de Genotoxicidade Aguda e, ocorrência de Reparo celular do DNA : Não houve aclimatação por se tratar de avaliar a toxicidade aguda e o reparo dos danos no DNA. O experimento foi realizado no Laboratório de Toxicologia Ambiental- **LabTox**, em um tanque plástico com volume de 60 l, contendo 22 peixes para o teste agudo e, aquários individuais de vidro (um peixe por aquário) com volume útil de 2,0 l, para o teste de reparo de DNA.



**Figura 12** - Fluxograma demonstrando o procedimento da coleta de amostra para a realização dos testes.

#### 4.3.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

Foram realizadas análises físico-químicas de **Oxigênio Dissolvido (OD)**, pH, condutividade, temperatura ambiente e dos aquários, no próprio laboratório instalado no aterro sanitário (Figura 13a) e somente no período de aclimação dos peixes. A metodologia utilizada para determinação dos parâmetros físico-químicos, encontra-se descrita no Standart Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA *et al.*, 1995).

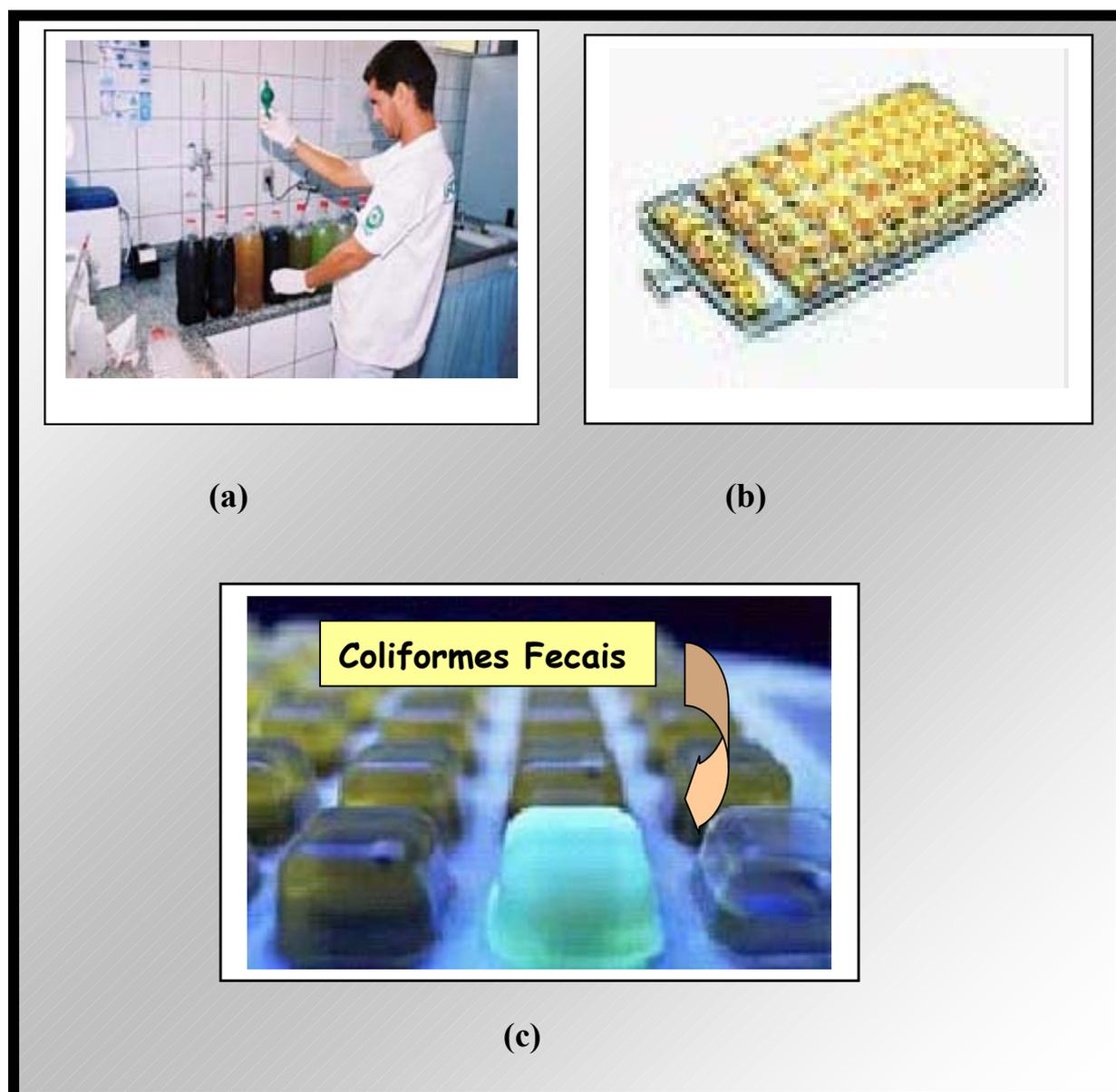
Os métodos para determinação dos parâmetros físico-químico foram:

- a) **pH:** utilizado o método potenciométrico (pHmetro marca Orion – modelo 210 );
- b) **Oxigênio Dissolvido (OD) e Temperatura Ambiente (T°):** medidos com aparelhos de bancada portátil: ORION Model 835;
- c) **Condutividade:** medida em aparelho de bancada portátil (marca Orion – modelo 115) ;
- d) **Temperatura da Amostra:** utilizado um termômetro de mercúrio de leitura direta.

Segundo dados do CONAMA (Resolução nº 020, de 18 de junho de 1986 – Art. 21) e CETESB (Decreto nº 39.551, de 11 de novembro de 1994 – Art. 18), os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos hídricos, desde que obedeçam alguns parâmetros tais como:

- i) pH entre 5 e 9;
- ii) T (temperatura): inferior a 40° C, sendo que a elevação de temperatura do corpo receptor não deverá exceder a 3° C;
- iii) OD (oxigênio Dissolvido) em qualquer amostra, não inferior a 6 mg/l O<sub>2</sub>.

As análises biológicas verificaram a quantidade de coliformes fecais e totais presentes na saída do sistema de tratamento por lagoas de estabilização, antes do sistema de desinfecção, mais especificamente no tanque de aço, onde se procedeu ao experimento. Foi utilizado o método Colilert<sup>R</sup>, para a realização das análises. A coleta das amostras procedeu de acordo com normas técnicas pré-estabelecidas (CETESB, 1987b).



**Figura 13** – (a) Realização de análises físico-químicas (pelo técnico laboratorista do aterro sanitário) **Fonte:** <http://www.an.com.br/>. (b) cartela do Kit colilert, indicando presença de coliformes totais – amarelo ouro, (c) cartela colilert indicando a presença de coliformes fecais (azul fluorescente). **Fonte:** [www.wsl.com.au/](http://www.wsl.com.au/).

### 4.3.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ATRAVÉS DO ENSAIO COM *Daphnia magna*

Os testes de toxicidade, realizados com *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustácea, Phylopoda), ocorreram seguindo critérios de normas nacionais e internacionais como a ABNT, através da NBR 12713, CETESB L.5.018, e a DIN 38412. Foram realizados 4 (quatro) testes de toxicidade simultaneamente à realização dos testes crônicos de genotoxicidade. Em estudos anteriores, o chorume tratado deste aterro sanitário não apresentou toxicidade aguda para os tempos de 24 e 48h (FINKLER, 2002).

Os testes foram realizados utilizando copos plásticos descartáveis de 25 ml (figura 14a), com 1 (uma) duplicata para cada concentração de líquido percolado tratado proveniente do tanque de aço, além do controles negativos, preparados com meio testes. Em cada copo foram colocados 5 (cinco) *daphnídeos* jovens com 24 h de vida, que não foram alimentados (com *Scenedesmus subpictatus*- figura 14b) durante às 48 h de duração dos testes de toxicidade aguda.

Os resultados obtidos utilizando *Daphnia magna* como organismo-teste, observando a imobilidade dos mesmos, após um período de exposição de 24 e 48 h, em cada concentração de líquido percolado. Com estes dados obteve-se a CE 50. Desde modo foi possível avaliar o impacto das cargas tóxicas, e propor um método para determinar o grau de toxicidade de cada amostra. Em todas as amostras analisadas observou-se os seguintes parâmetros:

- Número de organismos imóveis em cada concentração;
- Concentração mínima onde os efeitos tóxicos foram observados (expresso em Fator de Diluição);
- Concentração máxima onde os efeitos tóxicos foram observados (expresso em Fator de Diluição);
- Concentração Letal (expresso em Fator de Diluição);
- CE 50 (expresso em porcentagem).

As concentrações testadas foram 100%, 50%, 33,33%, 25,0%, 16,66%, 12,5%, 8,33%, 6,25% e controle negativo (Figura 14a).



( a )



( b )

**Figura 14** – (a) Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* realizada no LabTox, com as seguintes concentrações: 100%, 50%, 33,33%, 25,0%, 16,66%, 12,5%, 8,33%, 6,25%. (b) Fermentador com o cultivo da alga *Scenedesmus subspicatus*. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.

#### 4.3.2.1. CULTIVO DE *Daphnia magna* NO LABTOX

O cultivo de *Daphnia magna*, e de *Scenedesmus subspicatus* (alimento da *Daphnia* – Figura 14b) no Laboratório de Toxicologia Ambiental – LabTox- da Universidade Federal de Santa Catarina, é anterior à realização desta pesquisa, pois o mesmo já ocorre há cerca de 10 anos. Periodicamente são realizados, testes de sensibilidade com Dicromato de Potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), como prescreve a Norma Brasileira NBR 12.713 e DIN 38412, para avaliar a sensibilidade destes bioindicadores (NBR 12.713, 2003a; DIN 38412, 1989)

Os testes vêm demonstrando que os cultivos de *Daphnia magna* no laboratório, possui sensibilidade dentro dos valores descritos nas Normas (FINKLER, 2002; DA LUZ 1998; FRELLO, 1998; LAITANO, 2003)

### 4.3.3. AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE ATRAVÉS DO *ENSAIO DO COMETA*

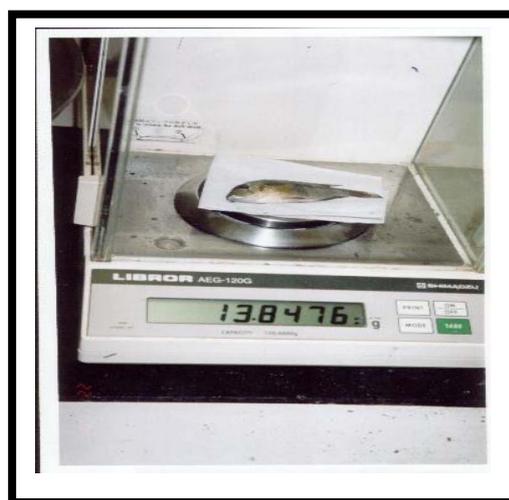
O Laboratório de Toxicologia Ambiental – LabTox- do Departamento de Engenharia sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, possui mais de 10 anos em experiências com análises de toxicidade ambiental e mutagenicidade, utilizando microcrustáceos, animais marinhos invertebrados e peixes. O Teste do Cometa ou **SCGE** (Single Cell Gel Electrophoresis), proposto por Singht *et al* (1988), foi utilizado nesta pesquisa com algumas adaptações.

#### 4.3.3.1. PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR

O potencial da atividade genotóxica do chorume tratado, foi avaliada *in vivo*, utilizando-se o sangue coletado do peixe *Geophagus brasiliensis*, exposto à este efluente, que era pesado e medido conforme demonstra as figuras 15a e 15b. Da mesma forma se procedeu para os animais utilizados no teste de avaliação do potencial de reparo do DNA dos peixes.



(a)



(b)

**Figura 15-** Dimensões do peixe *Geophagus brasiliensis*: (a) medida (b) pesagem.

**Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.

#### 4.3.3.1.1. RETIRADA DO SANGUE

Primeiramente o sangue do peixe foi coletado, através da inserção de uma agulha descartável com calibre 40x12 - 1,25mmx38mm (NIPRO) acoplada a uma seringa também descartável de volume 5 ml (INJEX) contendo cerca de 0,5 ml de anticoagulante heparina, numa região entre a cloaca e a nadadeira caudal. Para cada animal foi utilizado um conjunto de agulha e seringa descartável, a fim de que não houvesse contato e conseqüentemente contaminação do sangue de um animal com o do outro (Figura 16).

As lâminas foram preparadas imediatamente após a retirada do sangue para evitar que houvesse alguma interferência nos resultados e fossem provocados danos de oxidação ao material. O restante do sangue foi estocado e codificado em tubos tipo “ependorfs”, com volumes de 1,7 ml no freezer a -20°C.



**Figura 16** – Retirada de sangue do peixe *Geophagus brasiliensis*. Fonte: LabTox / Vanessa Guimarães Machado.

#### 4.3.3.1.2. PREPARO DOS CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS

Para o controle positivo foi utilizado o agente químico Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é conhecido por causar danos no DNA através da geração de radicais de oxigênio (AMES, 1983; ANDERSON *et al.*, 1994; FRÖNER, 2003; FERNANDES, 2004).

Segundo Dreher *apud* Fröner (2003), uma das hipóteses sugeridas para explicar o dano gênico induzido pelo  $H_2O_2$ , é a formação de radicais hidroxila ( $\bullet OH$ ), através do processo de catálise por metais de transição tipicamente  $Fe^{+2}$ , sendo esta reação denominada reação de Fenton. Halliwell *apud* Fröner (2003), levanta uma segunda hipótese, que refere-se à habilidade dos radicais ( $\bullet OH$ ) e outras formas, de provocarem estresse oxidativo e causar danos ao DNA, através da ativação de uma série de eventos metabólicos celulares, permitindo a atividade de enzimas nucleases, as quais clivam a cadeia de DNA. Ambos os mecanismos podem ocorrer simultaneamente (FRÖNER, 2003; FERNANDES, 2004).

Os controles positivos ( $H_2O_2$ ) foram preparados nas concentrações de  $100\mu M$  (controle positivo 1),  $200\mu M$  (controle positivo 2),  $500\mu M$  (controle positivo 3), e  $1000\mu M$  (controle positivo 4), a partir de uma solução “mãe” a 30% de  $H_2O_2$ . Todas as soluções foram preparadas no dia da realização do teste, tendo em vista que a evaporação é muito elevada (MACKAY, 1996; FERNANDES, 2004).

Como medida de biossegurança, a preparação destas soluções foi realizada numa capela de exaustão, com os seguintes Equipamentos de Proteção Individual (EPI's): óculos para substâncias corrosivas, respirador de carvão ativado, luvas descartáveis, jaleco de manga longa e sapatos fechados de material impermeável (TEIXEIRA & VALLE, 1996; DA COSTA, 2000).

O controle negativo consistiu apenas em células sanguíneas (não tratadas), retiradas do peixe denominado controle, que não entraram em contato com o líquido percolado do aterro sanitário. O preparo das lâminas seguiu o mesmo método já descrito anteriormente.

### 4.3.3.2. PREPARO DAS LÂMINAS

As bibliografias consultadas recomendavam, quando possível, fazer duas lâminas por amostra (duplicatas) e analisadas no mínimo 50 células por lâmina, totalizando 100 células por amostra (ALBERTINI *et al.*, 2000; GONTIJO & TICE, 2003). Neste trabalho padronizou-se a utilização de 4 (quatro) lâminas (quadruplicatas) por animal, totalizando 200 células analisadas por animal.

No teste de genotoxicidade crônico, foram utilizados 3 (três) animais (triplicatas) por vez e no teste agudo e teste de reparo, utilizou-se 2 (dois) animais (duplicatas), calculando em termos de amostras: para cada amostra de teste crônico foram analisadas 600 células e para os testes agudo e reparo, 400 células. Foram adotados duplicatas e triplicatas respectivamente por animal, para se ter uma margem de segurança maior, evitando possíveis perdas por desprendimento de agarose.

#### 4.3.3.2.1. PRÉ-COBERTURA

A etapa de pré-cobertura é o primeiro passo na preparação das lâminas para o teste. As lâminas de microscópio utilizadas são do tipo foscas em apenas uma das extremidades. As mesmas foram mergulhadas numa solução de agarose a 1,5% em PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  com ponto de fusão normal (Normal Melting Point –NMP, SIGMA), preparada a 60° C.

Após mergulhar a lâmina na solução de agarose NMP, o seu lado inferior era limpo com papel-toalha, para retirada do excesso de agarose e colocada numa superfície limpa com álcool 70° por 10 min à temperatura ambiente para solidificação da pré-camada de agarose NMP. As lâminas foram então codificadas na parte fosca.

A solução de agarose era preparada em forno de microondas, em potência máxima por 2 min, até ficar homogênea, transparente e líquida. Durante o preparo da pré-cobertura das lâminas quando a solução esfriava e iniciava o processo de polimerização, a mesma retornava ao microondas para voltar à forma líquida

#### 4.3.3.2.2. PRIMEIRA CAMADA

A primeira camada, contendo uma suspensão de sangue de peixe heparinizado e agarose com baixo ponto de fusão (**Low Melting Point –LMP**, SIGMA) a 0,5% em PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , a 37°C, foi preparada utilizando 20 $\mu\text{L}$  do sangue dos peixes em 240  $\mu\text{L}$  de agarose **LMP** à 0,5% , homogeneizado em um tubo tipo “eppendorf”, com volume de 1,7 ml, de capacidade com o auxílio de uma micropipeta, para homogeneização do sangue com a agarose.

Em seguida esta suspensão foi depositada sobre a pré-camada de 3 lâminas (triplicatas), e colocada uma lamínula de 24x60mm sobre cada lâmina, com as duas camadas anteriores de agarose.

As lâminas foram encaminhadas para o refrigerados e mantidas a 4°C, durante um período de 15 min para a solidificação (polimerização) da agarose (suspensão). A partir deste momento, as lâminas foram protegidas da luz, com papel alumínio, para prevenção de danos adicionais ao DNA. Para cada tempo de exposição aguda, foram utilizados 2 peixes e, preparada 4 lâminas por animal, totalizando 8 lâminas por tempo de exposição. Foi adotado o preparo de quadruplicatas por animal, para se ter uma margem de segurança maior, evitando possíveis perdas desprendimento de agarose.

#### 4.3.3.3. LISE CELULAR

Após a solidificação das duas camadas de agarose, as lâminas foram retiradas do refrigerador e as lamínula delicadamente removidas, deixando exposto o material. Em seguida as lâminas foram mergulhadas em cubas de vidro próprias, contendo 150mL da solução de lise gelada, composta por 2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 0,1 M EDTA, 1% sarcosinato de sódio, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, pH 10, previamente preparada e armazenada em vidro âmbar a 4°C.

Para que ocorra a lise celular, as lâminas permanecem nesta solução a 4°C por um período mínimo de 2 h e máximo de 30 dias. Padronizou-se em 24 h, o período de contato das lâminas com a solução de lise.

#### 4.3.3.4. NEUTRALIZAÇÃO I

Depois da etapa de lise celular, as lâminas foram neutralizadas, com pelo menos três lavagens de 5 min cada, em solução de neutralização, que consiste em submersão em 5mL de tampão de fosfato – PBS gelado (GONTIJO & TICE, 2003; LIMA, 2004).

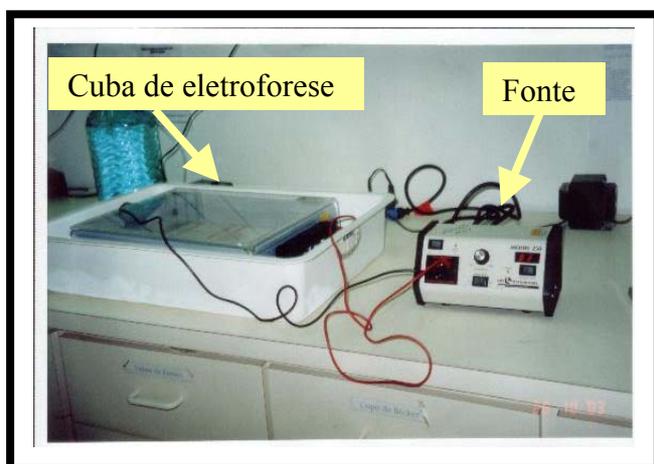
#### 4.3.3.5. TRATAMENTO ALCALINO

Durante o tratamento alcalino, ocorre o relaxamento e desespiralização dos sítios de rompimento da molécula de DNA, deixando as quebras mais evidentes (ROJAS *et al.*, 1999). A etapa de desespiralização alcalina foi realizada na cuba de eletroforese, contendo tampão de eletroforese alcalino gelado (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13). A solução tampão de eletroforese foi preparada com antecedência e armazenada por um período mínimo de 2h no refrigerador, depois foi transferida para a cuba de eletroforese, onde já estavam depositadas as lâminas.

A cuba de eletroforese foi então coberta com um plástico preto para evitar interferências geradas pela luz e então mergulhada numa cuba de gelo (GONTIJO & TICE, 2003; LIMA, 2004). O tempo de desnaturação foi otimizado utilizando 10, 15, 20, 25 e 30 min a 4°C e padronizado para a realização dos experimentos em 20 min.

#### 4.3.3.6. ELETROFORESE

Após a desespiralização, as lâminas foram submetidas à eletroforese nas seguintes condições: 300 mA, 25 V por períodos de tempo que também foram otimizados (10,15, 20, 25 e 30 min) a 4°C, e padronizado em 25 min, para a realização dos testes do experimento. A Figura 17a mostra o equipamento composto pela cuba de eletroforese e a fonte de energia.



(a)



(b)

**Figura 17** – Detalhes de duas etapas do processo dos testes. **(a)** Eletroforese: detalhe da cuba e fonte de eletroforese. **(b)** Manipulação de brometo de etídio. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.

#### 4.3.3.7. NEUTRALIZAÇÃO II

Depois das etapas de desespiralização e eletroforese, as lâminas foram neutralizadas, com pelo menos três lavagens de 5 min cada, em solução de neutralização, que consiste em submersão em 5mL de tampão Tris-HCl (0,4 M. pH 7,5). Em seguida as mesmas foram secas à temperatura ambiente (FERNANDES, 2004; GONTIJO & TICE, 2003; LIMA, 2004).

#### 4.3.3.8. FIXAÇÃO DOS COMETAS

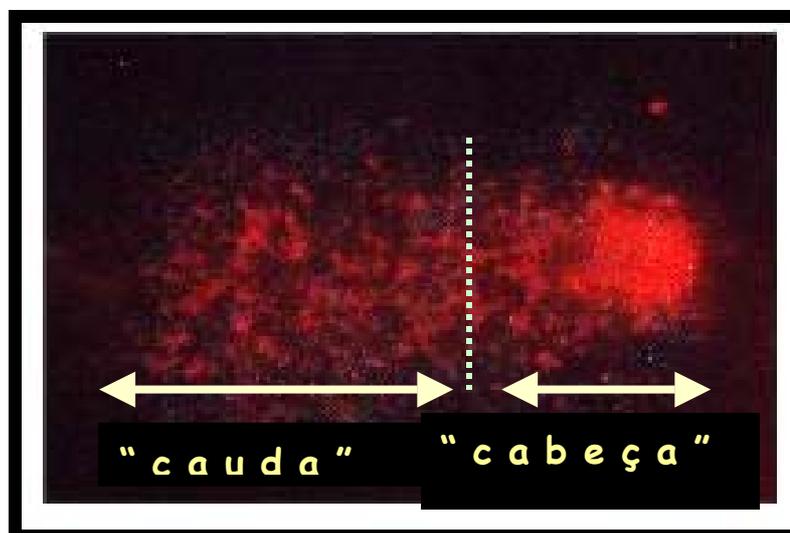
Após a neutralização com Tris-HCl (0,4 M. pH 7,5), as lâminas foram mergulhadas uma a uma em álcool absoluto, para fixação dos cometas nas lâminas, possibilitando o armazenamento dos mesmos por até 5 anos em condições especiais, a fim de que as lâminas possam ser lidas diversas vezes por períodos aleatórios (GONTIJO & TICE, 2003; LIMA, 2004; SINGH *et al.*, 1988).

#### 4.3.3.9. COLORAÇÃO

Após a etapa de fixação, cada lâmina foi corada com 20 $\mu$ L de brometo de etídio (20 $\mu$ g/mL) e cobertas com lamínulas. Por ser uma substância química altamente tóxica e mutagênica, toda a sua manipulação foi realizada em uma capela de fluxo ascendente e utilizando EPI'S (Figura 17b). O brometo de etídio é um agente intercalante de DNA que emite fluorescência quando exposto à radiação UV (FERNANDES, 2004; GONTIJO & TICE, 2003; LIMA, 2004; ÖSTLING & JOHANSON, 1987; SINGH *et al.*, 1988).

#### 4.3.3.10. ANÁLISE AO MICROSCÓPIO

As lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência (Olympus BX 40) com filtro de excitação de 515 a 560nm (verde), filtro barreira de 590nm com um aumento de 200, 400 e 1000 vezes. Foram analisadas 50 células em cada lâmina, levando em conta o tamanho da “cauda” do cometa em relação a “cabeça” (Figura 18).



**Figura 18** – Detalhes de um “cometa” classe 5 de hemócitos do peixe *Geophagus brasiliensis*, submetidos à técnica do “teste do cometa”. Fotografias retiradas com máquina digital, acoplada ao microscópio Olympus de epifluorescência BX40 (aumento x1000), com filme ASA 400-colorido **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.

#### 4.3.3.11. ANÁLISE DOS COMETAS

A análise dos cometas foi realizada visualmente, conforme classificação proposta por Kobayashi *et al* (1995), seguindo algumas modificações introduzidas por Miyamae *et al* (1998).

No microscópio de epifluorescência foram examinadas, ao acaso, 50 células, na parte central da lâmina e os danos foram classificados em função da forma e do comprimento da cauda dos cometas: **Classe 1**, sem cauda; **Classe 2**, cometas com pequenas caudas (caudas com comprimento < 25% do diâmetro da cabeça); **Classe 3**, cometas com caudas de tamanho médio (caudas com comprimento entre 25% e 100% do diâmetro da cabeça); **Classe 4**, cometas com caudas longas (caudas com comprimento maior que o diâmetro da cabeça) e **Classe 5**, cometas mal definidos e com cabeça pequena (KOBAYASHI *et al*, 1995; FRÖNER, 2003; FERNANDES, 2004).

#### 4.3.3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em cada lâmina, foram contadas 50 células para uma análise estatística detalhada, segundo a classificação dos danos conforme descrito na Tabela 2. Para esta análise estatística, foram atribuídos valores de 0-4, para os cometas classe 1- classe 5 respectivamente.

Multiplicando os valores atribuídos a cada classe de cometa, pela quantidade de cada tipo de cometa obtém-se um escore final que pode variar de 0 – 200, por lâmina, caso sejam analisadas 50 células e utilizada a classificação de cinco categorias de 0 à 4 (MIYAMAE *et al.*, 1998; COLLINS *et al.*, 1994; LIMA, 2004, FERNANDES, 2004).

O escore final de dano que representa o somatório das porcentagens de danos de cada classe multiplicados pelos respectivos escores foi comparado com o controle positivo (tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ) e com o controle negativo (não tratado) que representam os danos máximos observados e danos mínimos observados, respectivamente.

**Tabela 2** – Classificação dos Cometas baseados no tamanho da “Cauda” em relação à “Cabeça”.

<b>CLASSE DOS COMETAS</b>	<b>DANO</b>	<b>GRAU</b>	<b>ESCORE</b>
<b>1</b>	<b>Ausente</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>2</b>	<b>Pequeno</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>3</b>	<b>Médio</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>4</b>	<b>Grande</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>Máximo</b>	<b>4</b>	<b>4</b>

As diferenças, estatisticamente significativas ou não, dos tratamentos com relação aos controles negativos, positivos e reparos, entre cada experimento respectivamente, foram avaliados através do teste *t*-Student, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

O Efeito dos tratamentos nas diferentes células em relação à intensidade e frequência da formação de cometas foi analisado utilizando a análise de variância, com nível de significância de 5%.

#### 4.3.3.13. OTIMIZAÇÃO DO TESTE DO COMETA

Para a realização deste ensaio, o sangue retirado dos peixes de acordo com descrito em 4.3.3.1.1., foram transferidos para uma lâmina de microscópio previamente preparada de acordo com o item 4.3.3.3..

Foram realizados diversos experimentos buscando a padronização e otimização dos diferentes tempos de desespiralização do DNA pelo tratamento com tampão alcalino

(NaOH 10 M, EDTA 1 mM) e tempo de eletroforese (25V, 300 mA). Dependendo o tipo de amostra celular eucariótica utilizada, bem como a espécie animal em estudo, o período de descanso (desespiralização de DNA) pode variar de 10 – 60 min, bem como o tempo de eletroforese variando de 10-30 min (TICE *et al*, 2000).

A combinação realizada neste trabalho levou em conta a diversidade de tempos de desespiralização do DNA e tempo de eletroforese, descrito por diversos autores pesquisados, utilizando sangue de peixe e outros tipos celulares, com e sem a adição do agente genotóxico Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

## **5. RESULTADOS e DISCUSSÃO**

### **5.1. ACLIMATAÇÃO DOS PEIXES**

Durante o período de aclimatação não houve alterações comportamentais dos animais como mobilidade, alimentação e interação entre os mesmos. Durante o período de aclimatação os peixes foram alimentados diariamente com ração e após a transferência para o aquário definitivo (aquário de aço), a quantidade de ração foi sendo diminuída gradativamente até a supressão total, ocorrida já no aquário de aço, onde existiam os peixes da espécie *Poecilia reticulata* que se alimentavam com microorganismos presentes no chorume tratado. Este fator foi fundamental para a decisão de suspender o fornecimento suplementar de alimentos.

Não houve problemas de co-habitação entre os peixes das espécies, *Geophagus brasiliensis* (utilizado em nossa pesquisa) e *Poecilia reticulata* (espécie já adaptada ao aquário de aço onde foi realizado o experimento).

### **5.2. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E BIOLÓGICOS**

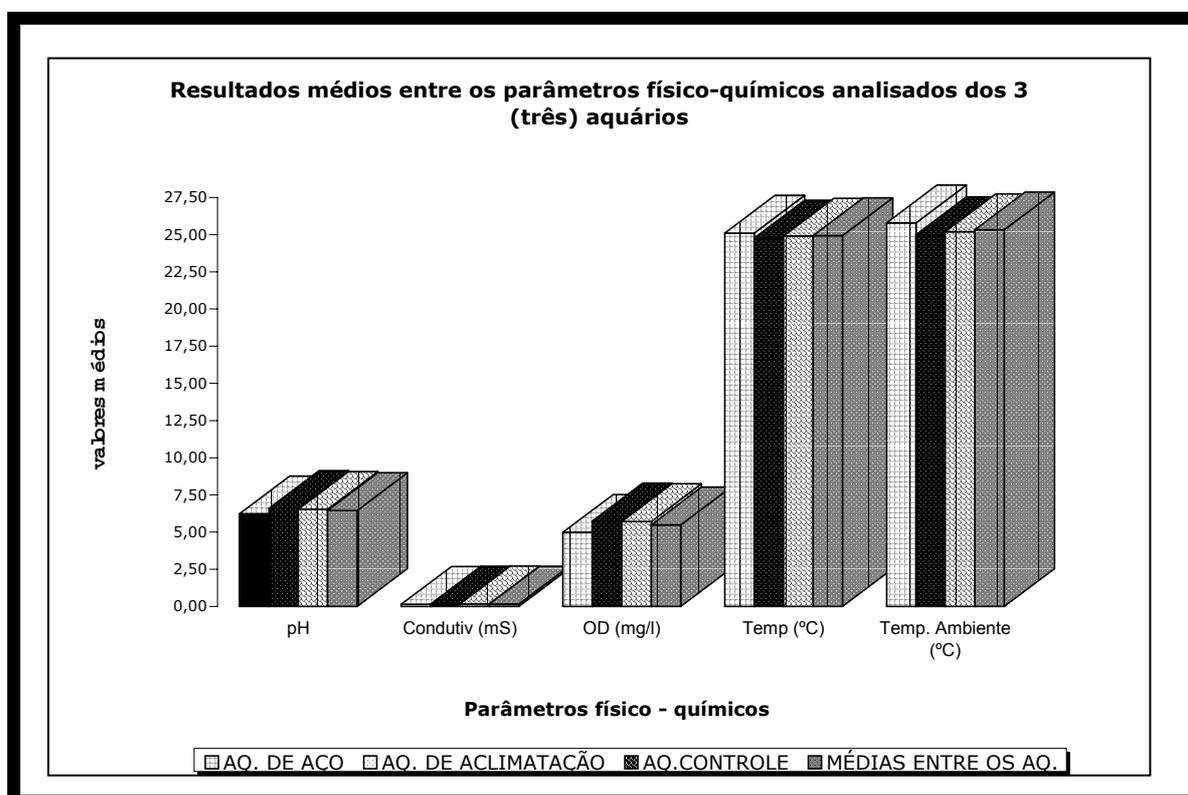
Os resultados dos parâmetros físico-químicos analisados do líquido percolado tratado antes da cloração foram os seguintes:

- Ph: intervalo compreendido entre 5,61 e 7,15;
- Condutividade: intervalo compreendido entre 0,13 e 0,16 mS;
- Oxigênio Dissolvido: intervalo compreendido entre 4,5 e 6,5 mg/l;
- Temperatura no Aquário de Aço: intervalo compreendido entre 22 e 29°C;
- Temperatura no Aquário de Controle: intervalo compreendido entre 22 e 28°C;

A Tabela 3 demonstra os resultados obtidos entre as médias aritméticas dos parâmetros analisados dos três aquários durante o período de aclimatação e, 7 (sete) dias após o término do mesmo. Os mesmos dados podem ser visualizados graficamente através da Figura 19.

**Tabela 3** – Resultado da média aritmética entre os parâmetros físico-químicos analisados simultaneamente nos três aquários durante o mesmo período.

<b>Média entre os Parâmetros Físico-Químicos analisados</b>					
	<b>pH</b>	<b>Condutiv (mS)</b>	<b>OD (mg/l)</b>	<b>Temp (°C)</b>	<b>Temp. Ambiente (°C)</b>
<b>AQ. DE AÇO</b>	<b>6,23</b>	<b>0,15</b>	<b>4,98</b>	<b>25,10</b>	<b>25,78</b>
<b>AQ. DE ACLIMATAÇÃO</b>	<b>6,60</b>	<b>0,17</b>	<b>5,75</b>	<b>24,78</b>	<b>25,00</b>
<b>AQ. CONTROLE</b>	<b>6,53</b>	<b>0,18</b>	<b>5,72</b>	<b>24,9</b>	<b>25,2</b>
<b>MÉDIAS ENTRE OS AQ.</b>	<b>6,45</b>	<b>0,17</b>	<b>5,48</b>	<b>24,93</b>	<b>25,33</b>



**Figura 19** – Resultado gráfico da média aritmética entre os parâmetros físico-químicos analisados simultaneamente nos três aquários durante o mesmo período.

De acordo com os valores estabelecidos pelo CONAMA 020/86, Resolução 357/2005 e CETESB, os parâmetros físico-químicos, analisados durante a realização desta pesquisa, encontraram-se dentro dos valores permitidos exigidos.

As variações apresentadas referem-se à heterogeneidade do efluente tratado, que oscila em função de diversos fatores, entre eles destacam-se as características dos resíduos aterrados e as alterações climáticas de temperatura e chuvas, principalmente por se tratar de um conjunto de lagoas de estabilização expostas às intempéries, como já descrito anteriormente.

**Tabela 4** – Resultados obtidos através de análises biológicas do líquido percolado tratado, durante os 4 meses de monitoramento.

	1º Coleta em 20/04/2004		2º Coleta em 20/05/2004		3º Coleta em 20/06/2004		4º Coleta em 20/07/2004	
	com cloro	sem cloro						
<b>PARÂMETROS BIOLÓGICOS</b>								
<b>COLIFORMES FECAIS (NMP/100ml)</b>	*	13,4	*	7,3	*	4,1	0,0	29,1
<b>COLIFORMES TOTAIS (NMP/100ml)</b>	*	> 2419,2	*	> 2419,2	*	> 2419,2	0,0	> 2419,2

( \* ) : Não foi realizado teste

Durante o monitoramento, o chorume tratado (efluente), apresentou alta quantidade de coliformes totais, antes da cloração, em todas as coletas realizadas os valores foram superiores a 2.419 NMP/100 ml (Tabela 4).

A quantidade de coliformes fecais presentes nas amostras antes da cloração, apresentou valores inferiores a 30,0 NMP/100 ml em cada uma das análises, constatando a eficiência do tratamento de efluentes na remoção de coliformes, utilizado neste aterro. Para fins de complementação e comparação entre os dados biológicos encontrados nas três

primeiras coletas, na quarta e última coleta realizou-se o teste quantitativo de coliformes fecais e totais também para o efluente clorado, revelando a eliminação tanto de coliformes fecais, quanto totais (Tabela 4).

### **5.3. TESTES DE TOXICIDADE E GENOTOXICIDADE**

Neste trabalho foi desenvolvida a técnica do cometa, aplicada na avaliação da mutagenicidade de líquido percolado (chorume), proveniente de aterramento sanitário urbano. Com a implantação desta técnica no LabTox, poderão ser analisados diversos compostos químicos em diferentes organismos, tornando-se mais uma ferramenta para análise e avaliação de riscos genotoxicológicos

#### **5.3.1. TESTES DE TOXICIDADE**

Para o Chorume tratado analisado nesta pesquisa, os resultados não revelaram toxicidade aguda em nenhuma das concentrações testadas, nas 48 h do teste. A quantidade de organismos imóveis encontrados nas 2ª e 4ª coletas respectivamente representa cerca de 10 % da totalidade de organismos testados.

Diversos fatores podem explicar este resultado, mas este valor apresenta-se dentro da margem de segurança. Trabalhos anteriores confirmam estes resultados como Da Luz (1998), que em seus estudos constatou uma variação na toxicidade deste efluente de não tóxico a 74,44 mg. L<sup>-1</sup> e, a eficiência de remoção de toxicidade foi na ordem de 90 %. Finkler (2002), constatou uma eficiência de 100 % no mesmo efluente, além de concluir que o efluente não apresentou toxicidade aguda (FINKLER, 2002)

### 5.3.2. TESTE DE GENOTOXICIDADE UTILIZANDO O TESTE DO COMETA

A sensibilidade do teste do cometa permite utilizá-lo como uma técnica para o estudo da genotoxicidade, já que aproximadamente 85 % dos estudos realizados nessa área encontraram resultados positivos, apesar de que mais estudos sejam necessários para a investigação da persistência e do reparo dos danos gênicos observados.

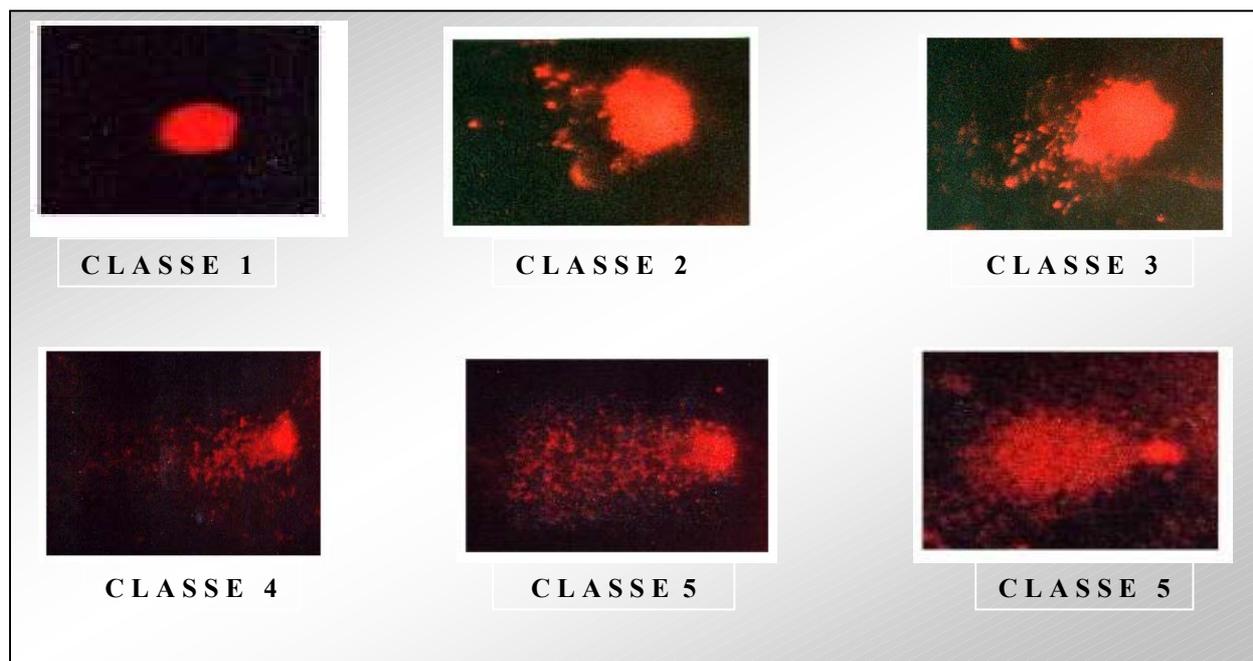
É necessário ainda investigar sua possível correlação com aberrações cromossômicas, mutações, indução da formação de micronúcleos, e mais importante, a determinação do significado biológico dos danos ao DNA provocados pelos materiais em testes (ROJAS *et al.*, 1999).

Estudos realizados, utilizando peixes como biomarcadores de contaminantes, principalmente de origem orgânica, em rios de diversas partes do mundo, vem ratificar a eficiência da utilização de testes genotoxicológicos para diagnóstico e avaliação dos meios naturais e os possíveis impactos causados por estes agentes externos introduzidos na biota (AZEVEDO & CHASIN, 2003; DA SILVA *et al.*, 2000; PRÓSPERI, 1993; De Flora *et al.*, 1993)

Theodorakis *et al.* (1999) comprovaram através de seus estudos que organismos aquáticos, respondem bem aos testes genotóxicos quando submetidos a situações diferentes das suas naturais. Em outubro de 1993 durante a Conferência sobre Ecotoxicologia Genética Molecular, realizada nos EUA, discutiu-se sobre os potenciais efeitos deletéricos da poluição ambiental nos diversos níveis do ecossistema, em virtude de ser um sistema de interações dinâmicas, principalmente no que se refere à cadeia alimentar, justificando a necessidade de utilizar animais aquáticos pertencentes a diferentes níveis tróficos para complementar as discussões (KASAMATSU *et al.*, 1996).

Os peixes são organismos aquáticos muito utilizados em pesquisas de genotoxicidade. Um exemplo é a Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), comumente utilizada em Testes do cometa, para determinação de contaminação aquática, De Flora *et al.* (1993) constataram que alterações em ambientes aquáticos naturais, podem provocar danos (quebra) no DNA destes animais, até que estes sejam aclimatados com estas

alterações. Durante a realização da quantificação e qualificação dos “cometas” observados no microscópio de epifluorescência, foram identificadas nas amostras de células tratadas com peróxido de hidrogênio, todas as 5 (cinco) classes existentes, como demonstra a Figura 20. Os “cometas” formados com os hemócitos dos peixes, apresentaram claramente a formação da “cabeça” e cauda”.



**Figura 20** – Representação do dano causado ao DNA de acordo com o tamanho das caudas dos cometas, utilizando hemócitos de peixes *Geophagus brasiliensis*. Fotografias retiradas com máquina digital, acoplada ao microscópio Olympus de epifluorescência BX40 (aumentos: x1000 e x400 respectivamente), com filme ASA 400-colorido. **Fonte:** LabTox / Vanessa Guimarães Machado.

### 5.3.2.1. OTIMIZAÇÃO DOS TEMPOS DE DESESPERALIZAÇÃO DO DNA E ELETROFORESE

As etapas do teste podem sofrer variações, conforme o objetivo do teste e o tipo de célula a ser estudada. Diversos experimentos de padronização dos respectivos tempos de desespiralização do DNA e eletroforese foram testados, até ser encontrada uma combinação favorável à estrutura em que foram realizados os experimentos e, o tipo de

organismo analisado. Todos os experimentos foram subseqüentemente realizados com a combinação de tempos selecionada. Os tempos foram escolhidos seguindo a variabilidade utilizada por alguns autores na literatura.

Diversos experimentos foram realizados buscando a otimização dos tempos de desespiralização e eletroforese, que podem ser observados através da Tabela 5, mas para a realização destes estudos padronizou-se em 20 min o tempo de desespiralização do DNA e 25 min o tempo de eletroforese.

**Tabela 5** – Otimização dos tempos de desespiralização alcalina do DNA (hemócitos) dos peixes *Geophagus brasiliensis* e Eletroforese.

Tempo de desespiralização alcalina do DNA (min)	Tempo de Eletroforese (min)
10	10
	15
	20
	25
	30
15	10
	15
	20
	25
	30
20	10
	15
	20
	25
	30
25	10
	15
	20
	25
	30
30	10
	15
	20
	25
	30

Como já descrito anteriormente, para que ocorra a lise celular, as lâminas devem permanecer nesta solução a 4°C por um período mínimo de 2 h e máximo de 30 dias, padronizou-se em 24 h este período de contato, baseado em testes preliminares onde não houve diferença significativa entre os resultados obtidos com exposição 2h e 7 dias.

### 5.3.2.2. GENOTOXICIDADE CRÔNICA

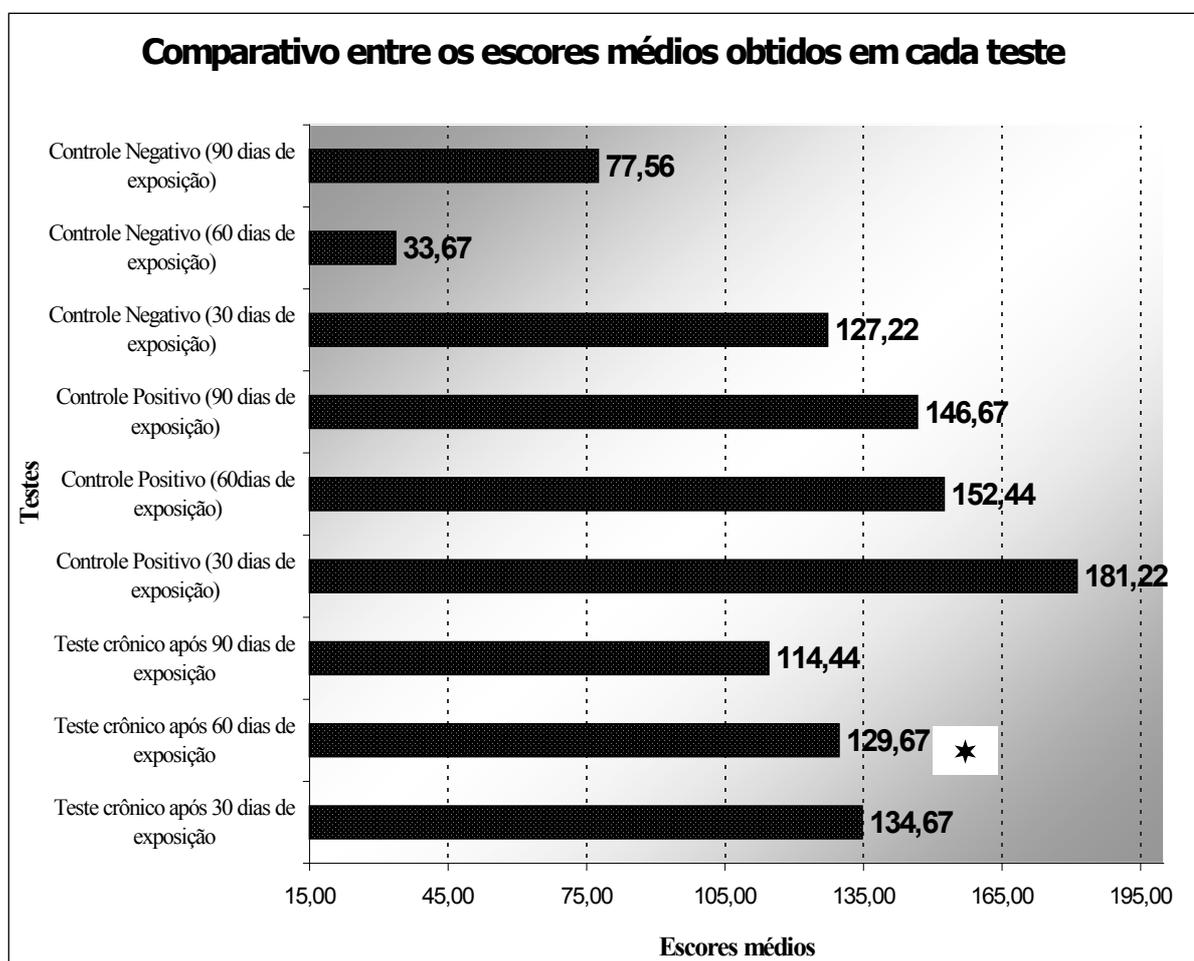
Durante a realização do teste do cometa para detecção de genotoxicidade crônica após 30 dias de exposição dos peixes ao líquido percolado tratado, observou-se que o controle negativo apresentou grandes danos no DNA semelhante aos valores obtidos nos peixes expostos ao efluente, provavelmente devido ao fato dos peixes terem desenvolvido fungos e, muitos terem morrido ao longo deste período. A média entre os escores obtidos com os peixes expostos ao efluente e, os peixes utilizados no controle negativo, foram muito semelhantes, já a média do controle positivo (Figura 21) foi superior. As hipóteses levantadas para explicar o desenvolvimento dos fungos nos animais controle:

- i. Havia muitos animais no Aquário, provocando stress entre eles;
- ii. O aquário estava localizado ao lado dos tanques de hipoclorito de sódio e, a evaporação deste produto pode ter provocado alterações metabólicas nos peixes;
- iii. Os filtros de carvão ativado estavam saturados;
- iv. Produção de aerossóis das lagoas de estabilização.

Tendo em vista a distância do aterro sanitário que, dificultava à manutenção do aquário controle, e para evitar que o experimento fosse prejudicado, pelos elevados valores de genotoxicidade apresentados, “interferindo nos resultados reais”, o aquário controle do aterro foi desativado e, utilizado o aquário de criação de peixes do LabTox.

Desta forma os controles negativos utilizados nos 2 (dois) meses subseqüentes foram provenientes do aquário do laboratório. Esta medida foi tomada como forma de garantir uma maior integridade nos resultados. DE FLORA *et al* (1993), utilizou o peixe Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), como biomarcador de genotoxicidade, para realização de testes *in situ* em um rio poluído e, como para controle negativo utilizou a mesma espécie

de peixe, mas mantida em um aquário no laboratório. Este mesmo procedimento foi realizado no LabTox.



★ Dados que apresentaram variância significativa ( $p = \text{sig} < 0,005$ ) quando comparados ao respectivo controle negativo.

**Figura 21** – Resultado dos escores médios obtidos através do teste de genotoxicidade crônica do peixe *Geophagus brasiliensis*

Após exposição de 60 dias, observou uma redução nos danos provocados pelo efluente aos peixes. Houve também um decréscimo de danos no material genético analisado dos peixes “controle negativo”, após a transferência do aquário controle do aterro sanitário para o laboratório. Os controles positivos e negativos são necessários em todos os ensaios como forma de verificar se a técnica, os procedimentos e os reagentes estão corretos. Além de auxiliarem na verificação e monitoramento das condições experimentais e, validarem os

resultados, pois os controles positivos e negativos são realizados simultaneamente com o experimento, estabelecendo padrões de classificação dos danos no DNA (RIBEIRO *et al.*, 2003; LIMA, 2004). Neste trabalho os resultados obtidos com o controle positivo apresentaram pouca variação de escores quando comparadas as três concentrações de peróxido de hidrogênio, utilizadas.

Após 90 dias de exposição, os peixes apresentaram redução de danos no DNA, quando comparados aos resultados obtidos nos meses anteriores. Os resultados demonstraram que a partir do 2 mês de exposição ao efluente, os danos provocados no DNA diminuíram, esta constatação pode ser explicada através do mecanismo de adaptação e reparação do DNA dos hemócitos do peixe *Geophagus brasiliensis* a um ambiente diferente do seu habitat natural.

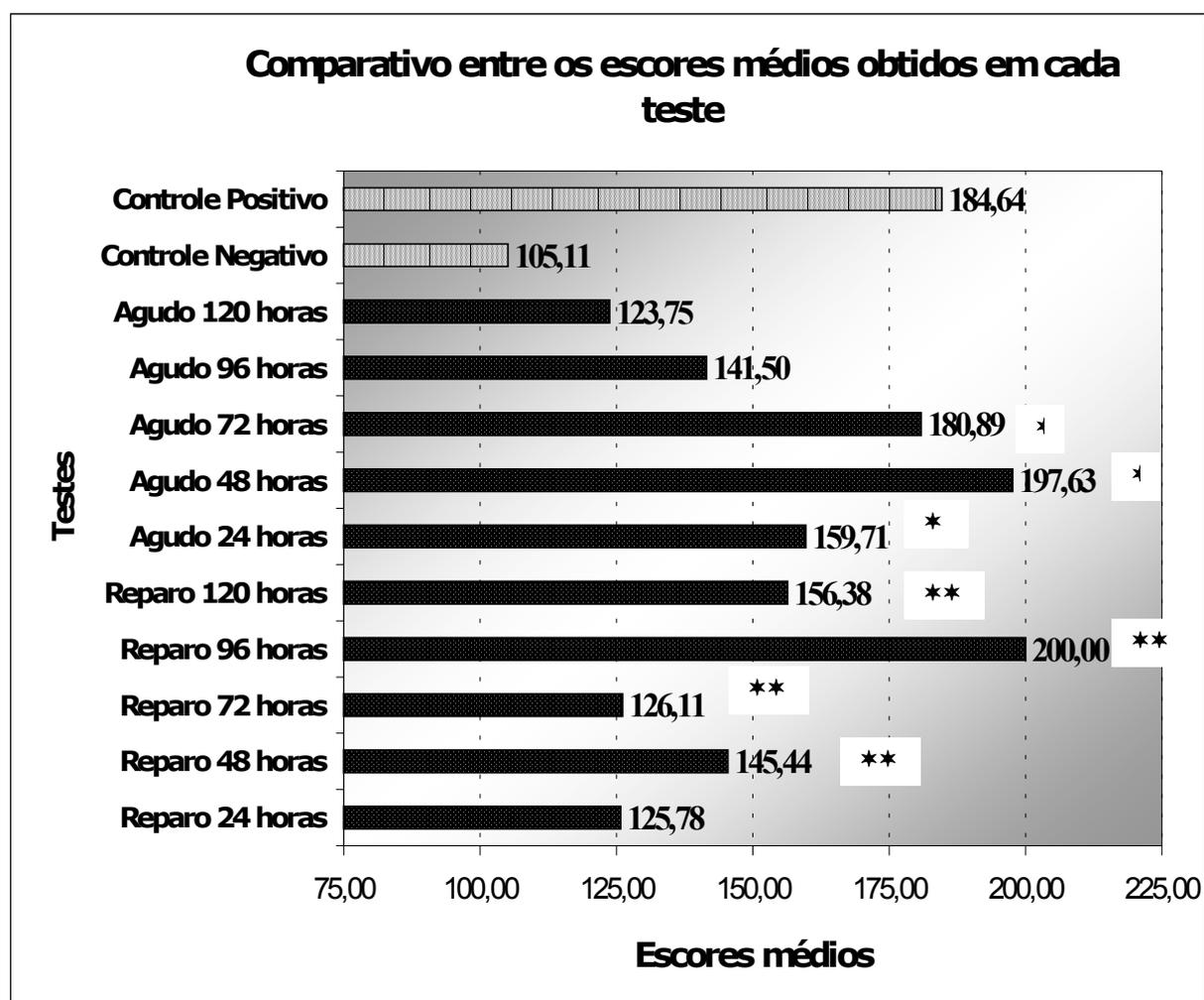
Os danos provocados pelo peróxido de hidrogênio, no controle positivo foram significativamente maiores do que os danos causados ao DNA das células do controle negativo, tendo em vista a utilização do agente químico peróxido de hidrogênio, na indução de dano.

O efluente provocou danos significativos no material genético do *Geophagus brasiliensis*, quando comparados aos respectivos controles negativos, apresentando uma diminuição gradativa na ocorrência de danos com o passar do tempo, como pode ser constatado através dos resultados apresentados na Figura 21.

A adaptação dos animais ao novo ambiente é um mecanismo biológico conhecido em que o animal, por uma questão de sobrevivência, necessita alterar seus hábitos e, adequar-se ao novo habitat, quando este novo ambiente oferece condições mínimas de sobrevivência. O mecanismo de reparo do DNA atua na tentativa de recuperar a estrutura celular, e minimizar os danos provocados provavelmente por um agente externo.

### 5.3.2.3. GENOTOXICIDADE AGUDA E REPARO DO DNA

Os testes realizados no Laboratório de Toxicologia Ambiental- LabTox, buscaram quantificar e dimensionar os danos no DNA do *Geophagus brasiliensis*, bem como seu mecanismo de reparo. Observou-se a eficiência da ação do mecanismo de reparo após a 1ª divisão celular, como pode ser constatado na Figura 22. Os danos provocados pelo peróxido de hidrogênio, no controle positivo, foram significativamente maiores do que os danos causados ao DNA das células do controle negativo.



\* Dados que apresentaram variância significativa ( $p=\text{sig}<0,005$ ) quando comparados ao respectivo controle negativo.. \*\* Dados que apresentaram variância significativa ( $p=\text{sig}<0,005$ ) quando comparados os resultados obtidos na verificação do Reparo com seu respectivo teste crônico.

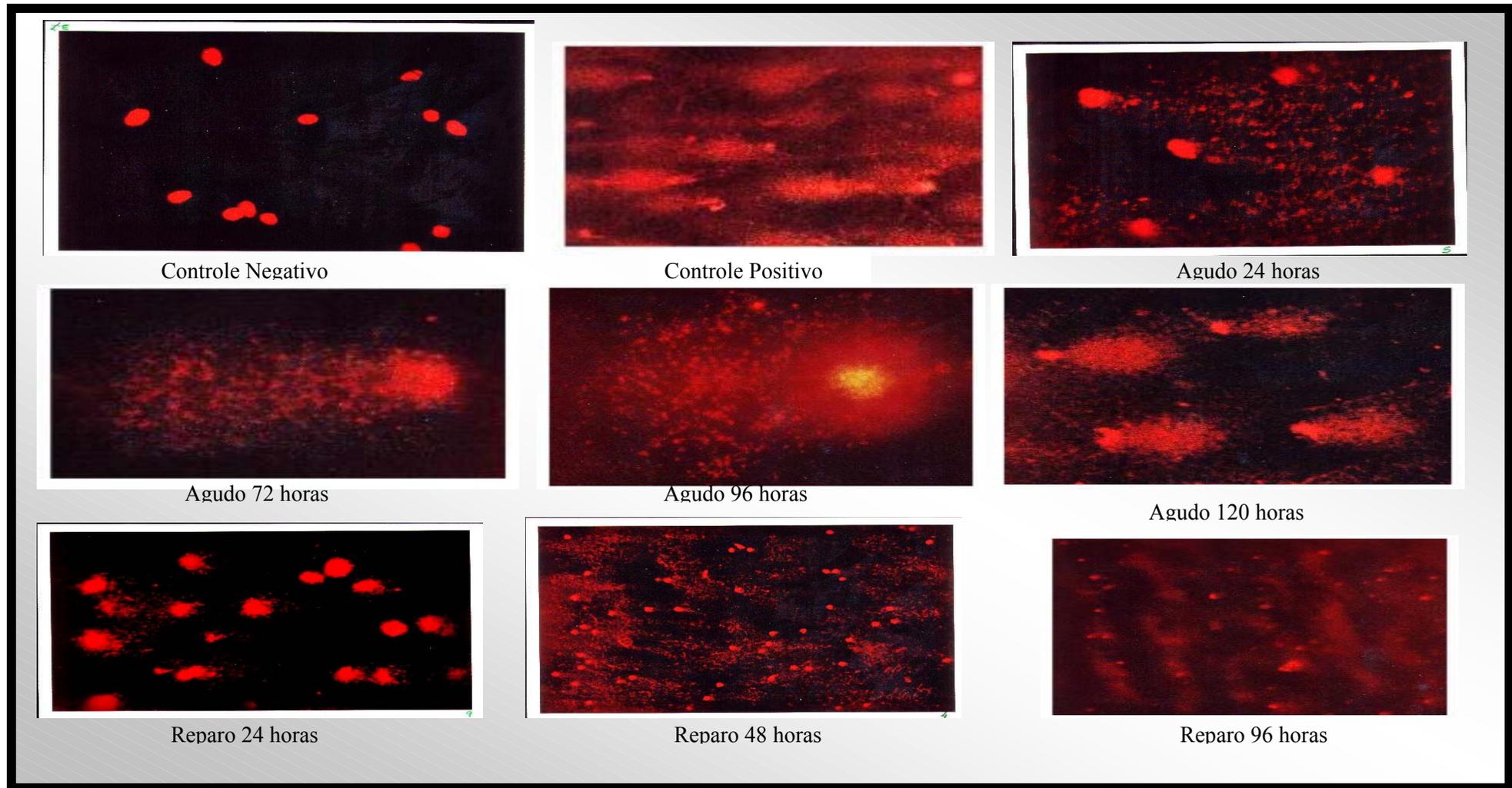
**Figura 22** – Resultado dos escores médios obtidos no teste de genotoxicidade aguda e mecanismo de reparo de DNA do peixe *Geophagus brasiliensis*.

A figura 22 apresenta o comparativo sintetizado entre as médias aritméticas dos testes de exposição aguda e reparo. Observa-se que os danos provocados com exposição de 24 horas foram menores do que a exposição de 48 e 72 horas.

O maior dano foi constatado com exposição de 48 h, e a partir desta o mesmo foi regredindo, até a exposição 120 h em que o escore referente ao dano provocado aproxima-se no escore obtido com o controle negativo, e, quando comparado ao testes de 24 h, também apresenta menor dano.

Este fato pode ser explicado através da hipótese de reparo e de adaptação dos organismos às condições adversas. Através do gráfico apresentado na Figura 22, observam-se as médias entre os escores obtidos durante o teste de exposição dos peixes à água limpa, para verificar o potencial de reparo, até o período de exposição de 72 h, o mecanismo de reparo foi eficiente, tendo em vista que os danos diminuíram, quando comparados aos respectivos danos provocados pelo teste agudo, após a transferência dos animais para aquários com água limpa, como já descritos no item de metodologia.

Os danos dos testes de reparo referente há 96 h e 120 h foram superiores aos encontrados nos respectivos testes agudos. Na Figura 21, observa-se uma diminuição gradativa nos danos genéticos após exposição contínua dos peixes no aquário de aço. Na Figura 23 estão fotografias retiradas com máquina digital, acoplada ao microscópio Olympus de epifluorescência BX40, dos resultados obtidos através dos cometas formados durante a realização do trabalho utilizando o teste do cometa.



**Figura 23** – Hemócitos do peixe *Geophagus brasiliensis*, submetidos à técnica do “teste do cometa”, formando os “cometas” referentes aos testes realizados na pesquisa. Fotografias retiradas com máquina digital, acoplada ao microscópio Olympus de epifluorescência BX40 (aumentos: x1000, x400 e x200), com filme ASA 400-colorido. **Fonte:** LABTOX / Vanessa Guimarães Machado.

Na Figura 23, pode-se verificar o reparo existente na estrutura do DNA, com tempos de 24 e 48 h, quando comparados ao mesmo tempo relacionado do teste agudo, apresentado na Figura 22. O dano encontrado no teste de reparo de 96 h foi visivelmente superior ao encontrado no teste agudo de mesmo tempo, o material genético está totalmente disperso na agarose, não podendo ser quantificado (nesta região da lâmina fotografada), pois devido ao excesso de lesões genômicas é impossível identificar a “cabeça” da “cauda” do cometa.

Os resultados da análise estatística mostraram que em quase todos os testes em maior ou menor grau, quando comparados com os controle negativos, provocaram danos significativos nas células dos peixes *Geophagus brasiliensis*. Quando realizada análise estatística entre os teste agudo e seu respectivo tempo de reparo, verificou-se que o mecanismo de reparo foi eficiente até 72 h, apresentando variações significativas na ação do mecanismo de reparo dos peixes. A partir de 96 h de reparo, os danos provocados nas células, foram superiores aos danos verificados nos testes agudos com equivalente tempo de exposição.

A análise estatística do ensaio do cometa levou em consideração a intensidade das lesões causadas no DNA pelo efluente apresentando as variâncias significativas ( $p < 0,005$ ) que ocorreram nos testes realizados. Nos testes de reparo celular, observa-se que a partir do reparo 96 h houve uma inversão na tendência de resultados sobre as lesões do DNA. Nos testes de reparo de 24, 48 e 72 h, as lesões foram significativamente menores ( $p < 0,005$ ) quando comparadas aos respectivos testes agudos, enquanto que nos reparos 96 h e 120 h as lesões provocadas foram significativamente maiores do que em relação aos testes agudos com o mesmo tempo de exposição.

Nos testes de genotoxicidade aguda realizada por De Flora *et al* (1993), em que foram utilizados além de sangue periférico (eritrócitos), tecidos de fígado e a bile, coletados em 7, 15 e 30 dias após exposição, os resultados encontrados após 30 dias de exposição indicaram alterações mutagênicas na bile dos animais e, a indução de micronúcleos no sangue periférico, mais evidenciado nas amostras coletadas em 15 e 30 dias ( $P < 0.001$ ), quando comparadas aos respectivos controles negativos. Comprovando uma das rotas de entrada dos agentes genotóxicos e, através da rota digestiva, através de

sua alimentação, além das rotas de absorção e respiratória (WURGLER & KRAMERS, 1992)

Lesões persistentes no DNA provocam um funcionamento celular incorreto e possivelmente um aumento da mutagênese devido a uma maior probabilidade de ocorrerem erros quando da replicação de um “molde” alterado. As células desenvolvem um sistema natural para reparar os danos causados no DNA (GREGUS & KLAASSEN, 1996).

Este mecanismo existe a fim de manter a integridade do genoma, um dos meios de fundamental importância está no reparo de erros de pareamento de bases (MMR, *mismatch repair*) cuja função principal é eliminar bases equivocadamente selecionadas e inserções ou deleções que surgem pelo deslizamento de polimerase durante a replicação do DNA. Originalmente identificado em bactérias (*long patch mismatch repair*), sua importância foi claramente definida no início dos anos 90 na relação com HNPCC (*hereditary nonpoliposis colorectal cancer*). Em seres humanos, pelo menos 7 (sete) diferentes proteínas codificadas pelos genes MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, MLH3, PMS1 e PMS2, estão envolvidas neste mecanismo de reparação (DE ROBERTIS, 1993; PINTO & FELZENSZWALB, 2004).

O teste do Cometa traz informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, mas não possibilita inferir a fidedignidade do processo de reparo (GONTIJO & TICE, 2004). Nascimento *et al* (2001), avaliou a capacidade de reparo dos linfócitos de pacientes com câncer, submetidos a radioterapia e, verificou que o mecanismo de reparo era muito lento, em virtude da saúde dos pacientes e, seu sistema imunológico estarem debilitados, concluí, nestes casos que o sistema de reparo está diretamente ligado a uma série de mecanismos envolvendo hábitos dos pacientes, rotinas etc. (NASCIMENTO *et al*, 2001).

Pode-se ampliar esta conclusão para os animais, tendo em vista que os animais saudáveis apresentam maior resistência a doenças e, rápida recuperação quando comparado, a animais que estejam com a saúde comprometida.

## **6. CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir, que nas condições experimentais em que foram realizados os testes, quanto aos:

### **(i) Testes de toxicidade aguda com *Daphnias magna*:**

- ✓ Não apontaram diferença estatística entre o tempo de exposição de 24 e 48 h (não sendo possível calcular a CL50 para este tipo de efluente);
- ✓ Não apontaram toxicidade aguda para 24 e 48 h de exposição.

### **(ii) Parâmetros físico-químicos (analisados nesta pesquisa):**

- ✓ Dentro dos valores permitidos exigidos pelo CONAMA (020/86 e Resolução 357/2005) e CETESB.

### **(iii) Testes de genotoxicidade com *geophagus brasiliensis*:**

- ✓ Em ambos os testes (crônicos e agudos), os hemócitos dos peixes apresentaram danos (lesões) em seu DNA;
- ✓ A análise estatística referente aos testes crônicos de genotoxicidade provocou danos significativos ( $p < 0,005$ ) ao DNA das células dos peixes, apenas no teste com exposição de 60 dias, quando comparado ao controle negativo do mesmo, nos demais tempos de exposição, não houve dano significativo.

### **(iv) Testes de genotoxicidade com o peixe *geophagus brasiliensis*:**

- ✓ A análise estatística realizada com base nos dados dos testes agudos de genotoxicidade, apenas com tempo de exposição de 24, 48, e 72 h (*quando*

*comparado ao controle negativo*), foram provocados danos significativos no material genético ( $p < 0,005$ );

- ✓ Com exposição de 96 e 120 horas, os danos provocados não foram significativos ( $p > 0,005$ );

**(v) Testes de Reparo de DNA dos hemócitos do peixe *geophagus brasiliensis*:**

- ✓ Os testes de reparo indicaram que as lesões observadas no DNA, são passíveis de serem reparadas, demonstrando que as lesões provavelmente são reversíveis;
- ✓ A análise estatística nos testes de verificação de reparo celular foram significativas (houve redução de lesões no DNA quando comparadas aos respectivos testes agudos de genotoxicidade ( $p < 0,005$ ));
- ✓ Praticamente todos os testes, com exceção dos Reparos 96 h e 120 h em que o dano no DNA foi maior no reparo quando comparado ao teste agudo do mesmo tempo;

## 7. RECOMENDAÇÕES

Para uma efetiva proteção ambiental e manutenção da vida em um corpo receptor, é extremamente necessário à observação dos efeitos deletérios causados aos organismos presentes no seu ecossistema, em consequência do lançamento de efluentes líquidos, através de testes de toxicidade e genotoxicidade, uma vez que, não é verificada uma correlação da toxicidade do composto com os parâmetros físico-químicos e biológicos.

Com base nos resultados obtidos, percebe-se a importância de se utilizar bioindicadores aquáticos, para avaliar os possíveis efeitos tóxicos que o chorume mesmo tratado, possa causar em organismos aquáticos e possivelmente em comunidades das redondezas, que utilizam deste do corpo hídrico receptor do líquido percolado.

Para isto recomenda-se em próximos trabalhos:

- Monitoramento mensal dos seguintes parâmetros: DBO, DQO, Nitrogênio Total, Amônia, pH, Coliformes Fecais e Totais, Ferro Total, Zinco, testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* e de genotoxicidade crônica e aguda com *Geophagus brasiliensis*, e com invertebrados aquáticos como por exemplo *ostras e mariscos* em sistema de fluxo contínuo por um período de, no mínimo 12 meses (1ano), a fim de identificar as possíveis correlações entre o grau de genotoxicidade com os parâmetros físico-químico e biológico;
- Realização de estudos de reparo de DNA com diferentes tempos de exposição, utilizando animais aquáticos vertebrados e invertebrados, a fim de se estudar o mecanismo de reparo de cada um desses organismos;
- Instalar gaiolas de peixes, ao longo do corpo receptor e, realizar testes mensais de genotoxicidade e mutagenicidade com estes animais, para verificar o mecanismo de ação dos efeitos tóxicos sobre estes animais;

- Instalar dispositivos de medidores de vazão na saída do tratamento de efluentes e no corpo receptor e, monitorar diariamente;
- Realizar testes de mutagenicidade, como por exemplo o teste do micronúcleo, paralelo aos testes de toxicidade e genotoxicidade com organismos aquáticos e terrestres, para obter validação dos testes.
- Realizar testes de exposição crônica de genotoxicidade, com monitoramento em intervalos semanais, durante o mesmo período em que foi realizado este estudo (90 dias), podendo observar a variação de dano semanalmente e acompanhar o processo de adaptação dos animais, verificando o tempo médio que estes animais estão totalmente adaptados ao novo ambiente;
- Realizar testes de exposição aguda ao poluente com tempos de exposição superior a 120 horas, a fim de observar se existe realmente uma curva decrescente nos escores relativos as lesões;
- Realizar testes de reparo de DNA, utilizando aquários com volumes maiores de água e uma quantidade maior de animais por teste.

## 5. BIBLIOGRAFIAS

A NOTÍCIA JORNAL. Disponível em [www.an.com.br](http://www.an.com.br). Acessado em julho de 2004

**ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NB 843:** Apresentação de projetos de aterros sanitários de resíduos sólidos urbanos. Rio de Janeiro, 1985.

\_\_\_\_\_. **NBR 12713 Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea)**, Rio de Janeiro, 2003a.

\_\_\_\_\_, NBR 00:001.44-001 (Esta Norma cancela e substitui as NBR 12714:1993 e NBR 12715:1993). **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes** Rio de Janeiro, 2003b.

AGNEZ-LIMA,L.F.; MEDEIROS, S.R.B.; MARQUES, R.C.P.; PINHEIRO, M.M.; MENCK, C.F.M. Processos de Reparo de DNA: garantindo a estabilidade do material genético. In: RIBEIRO, L.R.;SALVADORI, D.M.F.; MARQUES,E.K.(orgs). **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA.Canoas-RS. p.49-79; 2003.

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.; TICE,R.; WATERS, M.D.; AITIO, A. **IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety; *Mutation Research*; 463:111-172; 2000.**

ALBERTS, B., BRAY, D.; **Biologia Molecular da Célula**; 3a. Edição; Artes Médicas - Porto Alegre; 1997.

AMES, B.N.; **Dietary carcinogens and anticarcinogens – oxygen radicals and degenerative diseases; *Science* 221; 1256-1264; 1983.**

ANDERSON, A.; YU, T.W.; PHILLIPS, B.J.; SCHMEZER, P. **The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay**; *Mutation Research*, vol. 307: 261-271; 1994.

APHA, AWWA e WPCF. **Standart Methods for Examination of Water and Wastewater**. Washington: Joint Editorial, 1995.

AQUA ON LINE. Disponível em: <<http://www.aquaonline.com.br/peixes.html>>. Acesso em novembro de 2004.

AQUANET. Fotografia do *Geophagus brasiliensis*. Disponível em:<<http://www.aquanet.de/html>>Acesso em novembro de 2004.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M.(coord). **As bases toxicológicas da Ecotoxicologia**. Editora Intertox.São Paulo-SP. 2003. P.322.

BACCI, E. **Ecotoxicology of Organic Contaminants**. Lewis Publishers. 1993.

BAINY, A. (Comunicação verbal). Universidade Federal de Santa Catarina. UFSC. 2004.

BAPTISTA, I.E. **Avaliação da Toxicidade de Efluentes gerados em uma indústria têxtil catarinense**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 130p. 2001.

BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C. Avaliação da Toxicidade. In: OGA, S.(org). **Fundamentos da Toxicologia**. Editora Atheneu. 2º edição. São Paulo-SP.p.59-67. 2003.

BELPAEME, K.; DELBEKE, K.; ZHU, L.; KIRSCHVOLDERS, M.; **Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout, (*Salmo trutta fario*)**; *Mutagenesis*; 11: 485-492; 1996.

BRENTANO, D.M. & LOBO, E.A. **Utilização de ensaios ecotoxicológicos com *Daphnia Magna* Straus, 1820 (Cladocera, Crustacea) para avaliação de efluentes de curtume**

**da região do Vale do Rio Pardo, RS, Brasil.** In: VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2002, Vitória, Anais..., Vitória, P.193. 2002.

BRONW, KW; SCHRAB, G.E.;DONNELLY, K.C. **Acute and genetic toxicity of municipal landfill leachate.** *Texas Water Resources Institute*, Texas, 1991.

CAMERON, R.D. Toxicity of landfill leachates. **Journal WPCF**, v.52, n.4, p. 760-769.

CANAL CIÊNCIA. Disponível em:www.canalciencia.ibict.br/.Acessado em julho de 2004.

CERUTTI, P.A. **Prooxidant states and tumor promotion;** *Science*; 227, 367-381, 1985.

**CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL -.**  
**Norma CETESB L 5.018:** Água: Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, *Claus 1976* (Cladocera, Crustácea). São Paulo, 1986. 28p.

\_\_\_\_\_. **Norma CETESB L 5.019-1:** Água: Teste de toxicidade aguda com peixes – Parte: Sistema Estático. São Paulo, 1987a. 28p.

\_\_\_\_\_. **Guia de Coleta e Preservação de amostras de Água.** 1º edição. Coordenação: Edmundo Garcia Agudo (*et al.*). São Paulo, 1987b. 150p.

\_\_\_\_\_. **Treinamento Prático especializado: testes de toxicidade com organismos aquáticos de águas continentais.** São Paulo, 1988.

\_\_\_\_\_.**Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos.** Série Manuais São Paulo. 1992.

\_\_\_\_\_. **Decreto 39.551**, de 11 de novembro de 1994, Art.18. São Paulo, 1994

CHASIN, A.A.M.; PEDROSO, M.F.M. O estudo da Toxicologia In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M.(coord). **As bases toxicológicas da Ecotoxicologia.** Editora Intertox.São Paulo-SP. p.1-19. 2003.

CLARETO, C. **Tratamento biológico de líquidos percolados gerados em aterros sanitários utilizando reator anaeróbico compartimentado**. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1997.

COLLINS, A.R.; FLEMING, I.M.; GEDIK, C.M. **In vitro repair of oxidative and ultraviolet-induced DNA damage in supercoiled nucleoid DNA by human cell extract**. *Biochim. Biophys. Acta.*; 1219: 724-727. 1994.

CONAMA- CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. **Resolução 020/86**. Diário Oficial da União de 30 de julho de 1986. Seção 1, pág 1134-1135.1986.

CONASQ- COMISSÃO NACIONAL DE SEGURANÇA QUÍMICA. **Perfil Nacional da Gestão de Substâncias Químicas, 2003**. Brasília.DF.Ministério do Meio Ambiente-MMA, 208p. 2003.

COONEY, I.D. Tests in Freshwater. In: RAND, G.M. **Fundamental of Aquatic Toxicology: effects, environmet fate and r sc assessment**. Estados Unidos: edited by Gary M. Rand, cap. 2; 1995.

COOK, P.R.; BRAZELL, I.A. **Conformations constraints in nuclear DNA**. *Europenr.J.Biochemic*; 84: 465-477; 1976.

COX, J.; HESS, R.L.; BETTEGA, J.M.R.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M.**Use of the comet assay for detectin of DNA damage in oister hemocytes from *Crassostrea Gigas* exposed in vivo stressors**. *Virus reviews and Research*; vol.1; 17-22; 2001.

CURUPIRA. Disponível em: <<http://www.curupira.org.br/Noticias.html>>. Acesso em julho de 2004.

DA COSTA, M.A. F. **Qualidade em Biossegurança**. Editora Qualitymark.Rio de Janeiro, 2000.

DA LUZ, L.B. **Estudo da toxicidade dos líquidos percolados no aterro sanitário da cidade de Biguaçu** – SC. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 1998.

DA SILVA, J.; FREITAS, T.R. de; MARINHO, J.R.; SPEIT, G.; ERDTMANN, B. **An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents.** *Genetic Molecular Biologic*; vol.23, nº1:241-245; 2000.

DE FLORA, S.; BAGNASCO, M.; ZANACCHI, P. **Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea;** *Mutation Research*; 258: 285-320; 1991a.

DE FLORA, S.; VIGANÓ, L.; D'AGOSTINI, F.D.; CAMOIRANO, A.; BAGNASCO, M.; BENNICELLI, C.; MELODIA, F.; ARILLO, A. **Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water;** *Mutation Research*; 319: 167-177; 1993.

DEPLEDGE, M.H.; The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutation Research*; v.399, p. 109-122; 1998.

DE ROBERTIS, JR **Bases da Biologia Celular e Molecular** 2a. Edição Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1993.

DIN. **Norma DIN 38412.** Deutsches Institut für Normung. **Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Fishen über Verdünnungsstufen.** Teil 31. Berlin, 1989.

ELMOOR – LOREIRO, L.M.A. **Manual de identificação de cladoceros límnicos do Brasil.** Brasília: Universa. 156p. 1997.

EPA. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to Freshwater and marine organisms.** 4<sup>o</sup> edition. Cincinnati, Ohio, USA. 1993. 93p.

ERDTMANN, B. A Genotoxicidade Nossa de Todos os Dias. In: SILVA, J. DA; ERDTMANN, B.; HENRIQUES J. A. P. (orgs). **Genética Toxicológica.** Editora Alcance. Porto Alegre -RS. p.23-48. 2003.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEIL, K. L.; **The comet assay: a comprehensive review;** *Mutation Research*; 399: 87-95; 1998.

FERNANDES, A.M. **Uso do Ensaio do Cometa para Avaliar os Efeitos de Contaminantes Biológicos e Químicos em Hemócitos de Ostras Cultivadas em Santa Catarina.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 100p. 2004.

FERNÍCOLA, N.A.G.G.; BOHRER-MOREL, M.B.C.; BAINY, A.C.D. Ecotoxicologia In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M.(coord). **As bases toxicológicas da Ecotoxicologia.** Editora Intertox: São Paulo-SP, p.221-245. 2003.

FINKLER, R. **Avaliação do efeito tóxico de líquidos percolados sobre o sistema reprodutivo de *Daphnia magna*.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 105p. 2002.

FLOHR, L. **Ensaio toxicológicos com microcrustáceos como alternativa para classificação de resíduos sólidos industriais.** Monografia (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2004.

FRELLO, C.P. **Avaliação da Toxicidade aguda do pesticida Carbofuran utilizando reativos biológicos *Poecilia reticulata* e *Daphnia magna*.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 96p. 1998.

FRÖNER, C.R.A. **Avaliação da Citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum*.** .

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2003.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A.; ARAÚJO, R.P.A. & RAMOS, M.L.L.C. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo. CETESB: Série manuais.v.6, 17p. 1990.

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE,R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R.;SALVADORI, D.M.F.; MARQUES,E.K.(orgs). **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA.Canoas-RS. p.247-280. 2003.

GREGUS, Z.; KLAASSEN, C.D. Mechanisms of Toxicity – Chapter 3. In: KLAASSEN, C.D. (ORG). **CASARETT & DOULL'S TOXICOLOGY: The basic science of poisons**. Editors emeriti; McGraw-Hill Companies; 1996.

IBGE. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br.html>>. Acesso em 08 de novembro de 2004.

KAMER, I.; RINKEVICH, B. **In vitro application of the comet assay for aquatic genotoxicity: considering a primary culture versus a cell line**; *Toxicology in vitro*; 16: 177-184; 2002.

KASAMATSU, T.; KOHDA, K.; KAWAZOE, Y. **Comparison of chemically induced DNA breakage in cellular and subcellular system using the comet assay**; *Mutation Research*; Vol. 369: 1-6; 1996.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, N.; AHNSTRÖM. G.; **The comet assay: mechanisms and technical considerations**; *Mutation Research*; 363:89-96; Sweden; 1996.

KOBAYASHI, H; SUGIYAMA, C; MORIKAWA, Y; HAYASHI, M; SOFUNI, T.A; **Comparison between manual microscopic analysis and computerized image**

**análisis in the single cell gel eletrophoresis assay**; *MMS Communications*; 103-115; 1995.

KULAC. Fotografia da *Daphnia magna*. Disponível em: <<http://www.kulac.ac.be/html>>. Acesso em novembro de 2004.

LAITANO, K. dos S. **Testes de toxicidade com *Daphnia magna*: uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 85p. 2003.

LAURINI, L. **Toxicologia**, Editora Manole Ltda, 315p., São Paulo- SP, 1987.

LEE, R.F.; STEINERT, S. **Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals**; *Mutation research*; 544:43-64; 2003.

LEMOS,C.T.de; TERRA, N.R. Poluição: causas, efeitos e controle. In: SILVA,J.DA;ERDTMANN, B.; HENRIQUES J.A.P.(orgs). **Genética Toxicológica..** Editora Alcance. Porto Alegre-RS.p.117-144.2003.

LIMA, P.L.A. de. Ensaio do cometa.In:Curso de Introdução aos estudos de mutagênese e carcinogênese ambiental. SBMCTA. UFSC, Fpolis-SC, 2004.

LIMA, L.M.Q. Tratamento de lixo. 2ª edição revisada. Ed. Hemus, 1991.

LIMA, L.M.Q. Biorremediação de áreas degradadas por resíduos sólidos – a experiência do Brasil. In: Seminário de Resíduos Sólidos, 1996, Petrolina. Anais... Petrolina: Prefeitura Municipal de Petrolina, 1996.

LIXO. Disponível em: <<http://www.lixo.com.br/html>>. Acesso em novembro de 2004.

LÓPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. Mutagen cotent and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution; *Mutation Research*; v.399, p.3-15; 1998.

LU,F.C. **Basic Toxicology: fundamental, target organs, and risk assessment.** 3rd ed. Taylor & Francis publishers 1996.

MACKAY, J.M. **Dose selection *in vivo* toxicology assay.** *Environmental Molecular Mutation*, v.25, p.323-327,1996.

MITCHELMORE,C.L.; CHIPMAN, J.K. **DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring;** *Mutation Research*; 399: 135-147. 1998.

MANDELLI, S.M.DE C.; LIMA, L.M.Q.; OJIMA, M.K. **Tratamento de Resíduos Sólidos: Compêndio de Publicações.** Ed. UCS. Caxias do Sul - RS 1991

MATIAS,W.G. Material de aula: Apostila do curso de toxicologia ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC. 2003.

MATIAS,W.G. (comunicação verbal). Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC. 2004.

McKELVEY-MARTIN V.J.; GREEN M.H.L.; SCHMEZER P.; POOL-ZOBEL B.L.; DE MÉO M.P.; COLLINS A.; **The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review;** *Mutation Research*; 288: 47-63; 1993.

MIYAMAE, Y; YAMAMOTO, M; SASAKI, Y.F; KABAYASHI, H; IGARASHISOGA, M; SHIMOI, K; HAYASHI, M; **Evaluation of tissue homogenization that isolates nucleic for the *in vivo* single cell gel eletrophoresis (Comet) assay: a collaborative study by five laboratories;** *Mutation Research*; v. 418; 131-140; 1998.

MOORE, M.N. **Biomarkers of contaminant exposure and effect: a way forward in marine environmental toxicology.** *Sci.Total Environ.*;1993.

NACCI D.E.; CAYULA S.; JACKIM E.; **Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay;** *Aquatic Toxicology*; 35: 197-210; 1996.

NASCIMENTO, P.A.; DA SILVA, M.A.; OLIVEIRA, E.M.; SUZUKI, M.F.; OKAZAKI, K. **Evaluation of radioinduced damage and repair capacity in blood lymphocytes of breast cancer patients**; *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 34:165-176; 2001.

OLIVE, P.L. **Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids**; *Radiation Research*; 117: 79-92; 1989.

OGA, S. **Fundamentos da Toxicologia**. Editora Atheneu. 2º edição. São Paulo-SP. 474p 2003.

OGA, S.; DE SIQUEIRA, M.E.P.B. Introdução à Toxicologia. In: OGA, S.(org). **Fundamentos da Toxicologia**. Editora Atheneu. 2º edição. São Paulo-SP.p.3-12. 2003.

OPAS/USEPA- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD Y AGENCIA DE PROTECCIÓN AMBIENTAL DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. Taller Nacional de Introducción a la evaluación y manejo de riesgos. Brasília: OPAS/EPA.mai.1996.

OSTLING, O; JOHANSON, K. L.; **Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual cells**; *Biochem. Biophys. Res Commun*; 123: 219-298; 1984.

OSTLING, O; JOHANSON, K. L.; **Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell**; *Int. J. Radiat. Biol.*; 52:683-691; 1987.

PALMEIRA, G. Epidemiologia. In: ROZENFELD,S.(org). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Editora Fiocruz. Rio de Janeiro. p.137-194. 2000.

PANDRANGI, R. M.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M.; **Alkaline single cell gel, (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp**; *Environmental Molecular Mutagenesis*; 26: 345-356; 1995.

PINTO, L.F.R.; FELZENSZWALB, I. Genética do câncer humano. In: RIBEIRO, L.R.;SALVADORI, D.M.F.; MARQUES,E.K.(orgs). **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA.Canoas-RS. p.29-48. 2003.

PRÓSPERI, V.P. **Aplicação de testes de toxicidade com organismos marinhos para análise de efluentes industriais lançados em áreas estuarinas**. Dissertação (Mestrado).Escola de Engenharia São Carlos, USP.;.1993.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K.(orgs) **Mutagênese Ambiental**. 1º edição.Editora da ULBRA. Canoas, RS, 2003.

RIBEIRO, L.R. **A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana**. In:Curso de Introdução aos estudos de mutagênese e carcinogênese ambiental. SBMCTA. UFSC, Fpolis-SC, 2004.

ROJAS, E.; LOPEZ, M.C.; VALVERDE, M.; **Single cell gel electrophoresis: methodology and applications**; *Journal of Chromatography B*; 722, 225-254; 1999.

RYDBERG, B. & JOHANSON, K. J.; **DNA Repair Mechanism**; *Academic Press*; 465-468; NY; 1978.

SÁ, M.de C., PEPE, V.L.E. Planejamento estratégico. In: ROZENFELD,S. (org). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**.Editora Fiocruz.Rio de Janeiro. p.197 -234. 2000.

SAFFI,J.; HENRIQUES,J.A.P.Reparação de DNA em Células Eucarióticas. In: SILVA,J.DA;ERDTMANN, B.; HENRIQUES J.A.P.(orgs). **Genética Toxicológica**. Editora Alcance. Porto Alegre-RS.p.271-308.2003.

SAÚDE ANIMAL. Disponível em: <<http://www.saudeanimal.com.br/peixe.html>>. Acesso em novembro de 2004.

SILVA, J.da; DA FONSECA,M.B. Estudos Toxicológicos no Ambiente e na saúde Humana. In: SILVA,J.DA;ERDTMANN, B.; HENRIQUES J.A.P.(orgs). **Genética Toxicológica**. Editora Alcance. Porto Alegre-RS.p.71-86;2003.

SILVA, J.da; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA,J.DA;ERDTMANN, B.; HENRIQUES J.A.P.(orgs). **Genética Toxicológica**. Editora Alcance. Porto Alegre-RS.p.167-182;2003.

SILVA, C.R. **Estudo da frequência de hemócitos micronucleados, induzidos pelo ácido oadáico, em mexilhões *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 117p; 2000.

SINGH, N. P; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L.; **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells**; *Expt. Cell Res.*; 175: 184-191; 1988.

SINGH, N.P.; STEPHENS, R.E. **Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching**; *Mutation Research*; 383:167-175.1997.

SLAMENOVÁ D.; GABELOVA A.; RUZEKOVA L.; CHALUPA I.; HORVATHOVA E.; FARKASOVA T.; BOZSAKYOVA E.; STETINA R.; **Detection of MNNG-induced DNA lesions in mammalian cells; validation of comet assay against DNA unwinding technique, alkaline elution of DNA and chromosomal aberrations**; *Mutation Research*; 383; 243-353; 1997.

**SETAC - SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECOTOXICOLOGIA**-. Disponível em: [www.setacbrasil.org.br](http://www.setacbrasil.org.br) .Acessado em setembro de 2004.

STEINERT, S.A.; STREIB-MONTEE, R.; LEATHER, J.M.; CHADWICK, D.B. **DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay**; *Mutation Research*; 399:65-85.1998.

THEODORAKIS, C.W.;ELBL, T.; SHUGART, L.R. **Genetic ecotoxicology IV: survival and DNA strand breakage is dependent on genotype in radionuclide-exposed mosquitofish**; *Aquatic Toxicology*; vol. 45: 279-191; 1999.

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. (orgs.). **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1996. 362p.

TICE, R.; VAZQUEZ, M. **Protocol for the application of the alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in Mammalian cells**. 1998. Disponível em: < <http://www.kineticimaging.de/kidocs.html> >. Acesso em 28 /03/04.

TICE, R.R. **The single cell gel/ Comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells**, In: Environmental Mutagenesis (Phillis, D.H., Venitt, S., eds). Bios Scientific Publishers Ltda. Oxford. Pp.315-339. 1995.

TICE, R.R.; AGUREL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. **Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing**. *Environmental and Molecular Mutagenesis*; 35:206-221; 2000.

VALLE, S., **Biossegurança, uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo, 2002.

VENKATARAMANI, E.S.; AHLERT, R.C. & CORBO, P. **Biological treatment of landfill leachates**; *Critical Reviews in Environmental Control*; n.4, v.14: 33-76; 1984.

VERSCHAEVE, L.; GILLES, J.; **Single cell gel electroforeses assay in earthworm for the detection of genotoxic compounds in soil** Bull; *Environmental Contaminants Toxicology*; 54: 112-119; 1995.

VILLELA, I.V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H.C.; SILVEIRA, J. de D. **Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental**. In: SILVA, J. DA; ERDTMANN, B.; HENRIQUES J.A.P. (orgs). **Genética Toxicológica**. Editora Alcance. Porto Alegre-RS. p.147-163. 2003.

VILLARINI, M.; MORETTI, M.; DAMIANI, E.; GRECI, L. SANTRONI, A.M.; FEDELE, D.; FALCIONI, G. **Detection of DNA damage in stressed trout nucleated**

**erythrocytes using the comet assay: protection by nitroxide radical free; *Radic. Biol. Med.*; 24: 1310-1315; 1998.**

**WESTERFIELD S.M.; BLACK M.C.; Comparison of constant voltage and field investigation gel electrophoresis methods for measuring DNA strand breakage in freshwater bivalves; *Toxicology Methods*; 7:111-122; 1997.**

**WILSON, J. T.; PASCOE, P. L.; PARRY, J. M.; DIXON, D. R.; Evaluation of the comet assay as a method for detection of DNA damage in cells of marine invertebrate, *Mytilus edulis* L (Mollusca: Pelecypoda); *Mutation Research*; 399: 87-95; 1998.**

**WURGLER, F.E. & KRAMERS, P.G.N. Environmental effects of genotoxins (ecotogenotoxicology); *Mutagenesis*; v. 7, n. 5, p. 321-327; 1992.**

## APÊNDICE

### A) RESULTADO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA

**Tabela 6** – Análise de variância dos escores médios de danos causados ao DNA, durante cada testes respectivo.

Comparações	P= valor (sig)	P= sig <0,005 (5%)	Análise
Amostra crônico 30 dias X Controle Negativo 30 dias	0,608	0,608 > 0,005	Variância não é significativa
Amostra crônico 30 dias X Controle Positivo 30 dias	0,004	<b>0,004 &lt; 0,005</b>	<b>Variância é significativa</b>
Amostra crônico 60 dias X Controle Negativo 60 dias	0,000	<b>0,000 &lt; 0,005</b>	<b>Variância é significativa</b>
Amostra crônico 60 dias X Controle Positivo 60 dias	0,104	0,104 > 0,005	Variância não é significativa
Amostra crônico 90 dias X Controle Negativo 90 dias	0,085	0,085 > 0,005	Variância não é significativa
<b>Amostra crônico 90 dias X Controle Positivo 90 dias</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000 &lt; 0,005</b>	<b>Variância é significativa</b>
Amostra Agudo 24 horas e controle Positivo	0,036	0,036 > 0,005	Variância não é significativa
<b>Amostra Agudo 24 horas e controle Negativo</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000 &lt; 0,005</b>	<b>Variância é significativa</b>
Amostra Agudo 48 horas e controle Positivo	0,030	0,030 > 0,005	Variância não é significativa
<b>Amostra Agudo 48 horas e controle Negativo</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000 &lt; 0,005</b>	<b>Variância é significativa</b>
Amostra Agudo 72 horas e controle Positivo	0,690	0,690 < 0,005	Variância não é significativa
<b>Amostra Agudo 72 horas e controle Negativo</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000 &lt; 0,005</b>	<b>Variância é significativa</b>
Amostra Agudo 96 horas e controle Positivo	0,049	0,049 > 0,005	Variância não é significativa

Amostra Agudo 96 horas e controle Negativo	0,161 0,107	0,161 > 0,005 0,107 > 0,005	Variância não é significativa
<b>Amostra Agudo 120 horas e controle Positivo</b>	<b>0,000</b> <b>0,000</b>	<b>0,000 &lt; 0,005</b> <b>0,000 &lt; 0,005</b>	<b>Variância é significativa</b>
Amostra Agudo 120 horas e controle Negativo	0,089 0,085	0,089 > 0,005 0,085 > 0,005	Variância não é significativa
Amostra Agudo 24 horas e Reparo 24 horas	0,018 0,016	0,018 > 0,005 0,016 > 0,005	Variância não é significativa
<b>Amostra Agudo 48 horas e Reparo 48 horas</b>	<b>0,000</b> <b>0,000</b>	<b>0,000 &lt; 0,005</b> <b>0,000 &lt; 0,005</b>	<b>Variância é significativa</b>
<b>Amostra Agudo 72 horas e Reparo 72 horas</b>	<b>0,000</b> <b>0,000</b>	<b>0,000 &lt; 0,005</b> <b>0,000 &lt; 0,005</b>	<b>Variância é significativa</b>
<b>Amostra Agudo 96 horas e Reparo 96 horas</b>	<b>0,004</b> <b>0,017</b>	<b>0,004 &lt; 0,005</b> <b>0,017 &lt; 0,005</b>	<b>Variância é significativa</b>
<b>Amostra Agudo 120 horas e Reparo 120 horas</b>	<b>0,002</b> <b>0,004</b>	<b>0,002 &lt; 0,005</b> <b>0,004 &lt; 0,005</b>	<b>Variância é significativa</b>