

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Ecologia

**IMPACTO AUTOMOTIVO EM POPULAÇÕES DE
Ctenomys minutus NA PLANÍCIE COSTEIRA DO RS:
AVALIAÇÃO DO TEOR DE METAIS TÓXICOS E
MEDIÇÃO DE LIPOPEROXIDAÇÃO**

Dissertação de Mestrado

Carlos José Sarmiento Ferreira

Orientadores: Maria Teresa Raya Rodriguez
José Cláudio Fonseca Moreira

Porto Alegre, 2003

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Mayte e Zé Cláudio, pela amizade, clareza de idéias, compreensão e paciência dos últimos meses;

Ao Prof. Thales O. de Freitas, por todo seu empenho, disposição e bom humor nas coletas;

Ao PPG Ecologia pela oportunidade, pelo custeio das atividades de campo e por toda a estrutura acadêmica e técnico-administrativa.

À FAPERGS através do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico-Tecnológico-Artístico-Cultural do Estado do Rio Grande do Sul pelo custeio das atividades laboratoriais;

À CAPES pela bolsa de mestrado;

Ao Prof. Heinrich Hasenack (Henrique), por toda a ajuda no último ano deste trabalho e, principalmente, pela atitude e disposição de todos os dias, sendo sempre um referencial no meu caminho;

Aos colegas do Laboratório de Geoprocessamento, Zé Luis, Lelie, Eliseu, Eliana, Roni, Hilário, Gabriel, Márcia Júlio e William;

Aos colegas dos Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Ricardo e Evandro por toda a ajuda nos experimentos;

Ao pessoal do Laboratório de Espectrofotometria, Vera e Marcelo;

Aos colegas das saídas de campo, Vanina, Juliana, Tarik, Ana Amélia, Jaque, Miriam e Fritz;

Aos Professores, Vera, Perry, Elena e Fátima do Departamento de Bioquímica pelo esclarecimento de dúvidas e sugestões,

principalmente nas referentes à coleta, armazenamento e transporte de sangue dos animais;

Ao colega do Laboratório de Ecologia Quantitativa, Ênio e ao Professor Valério Pillar por sua ajuda na análise prévia dos resultados;

Aos amigos Duda, Nade, e Alexandre do Laboratório de Ecotoxicologia;

Aos colegas do NAE, Talita, Gilberto, às Professoras Jandira Fachel e Elsa Mundstock, pela compreensão e por toda ajuda na análise estatística e um agradecimento especial a Fernando Pulgati que, mesmo em final de curso, sempre encontrou tempo;

Aos Srs. Belmiro Weber, Zeferino Amaral e Marcelo Borsato por permitirem que as coletas fossem realizadas em sua propriedades;

À minha família e amigos, por suportarem a convivência com esta pessoa.

RESUMO

Os metais presentes no material particulado lançado pelas emissões veiculares, quando em grandes concentrações podem apresentar toxicidade aos organismos vegetais e animais. Metais de transição, são na maioria das vezes indutores da formação de radicais livres nos sistemas biológicos, causando uma consequente peroxidação de moléculas orgânicas. A peroxidação de lipídios é uma evidência da injúria causada por radicais livres. Os objetivos deste trabalho são verificar o impacto ambiental causado por tráfego automotivo com caracterização da concentração de metais tóxicos em diferentes compartimentos ambientais em áreas próximas a estradas e a sua correlação com a formação de lipoperóxidos na citada espécie. Foram capturados indivíduos de *Ctenomys minutus* (em três locais e nas quatro estações do ano) com auxílio de armadilha do tipo Oneida-Victor n° zero e anestesiados com Zoletil. De cada animal foi retirado 1 a 2 ml de sangue de cada animal para quantificação de subprodutos da lipoperoxidação. Em cada ponto de amostragem foram retiradas alíquotas de pêlos e pelotas fecais do animal, de vegetação da qual o animal se alimenta e de solo para formação de amostras compostas representativas do ponto de coleta. Foi dosada a concentração de Cd, Ni, Pb e Zn via atomização eletrotérmica em Forno de Grafite ou via atomização em Espectrofotômetro de Chama. Em relação aos aspectos ambientais, o estudo possibilitou a avaliação do grau de contaminação de metais tóxicos em compartimentos do ambiente em estudo, assim como a avaliação de alguns efeitos biológicos causados pelas emissões veiculares em *Ctenomys minutus*.

ABSTRACT

Metals present in particulate material from automobile exhaust, when in high concentration, could be toxic to plants and animals. Transition metals can often induce the formation of free radicals in biological systems, leading to peroxidation of organic molecules. Lipid peroxidation is proof that injury has been inflicted by free radicals. The present work aims to check the environmental impact caused by automobile traffic by analysing toxic metal concentration in different compartments of the environment in areas near roads and its correlation to the formation of lipoperoxides in the species in question. Individuals of *Ctenomys minutus* were captured (in three locations and throughout the year) with the use of traps type Oneida-Victor N° 0 and tranquilized with Zoletil before 1 - 2 ml of blood was taken to quantify the subproducts of lipoperoxidation. Samples of fur, droppings, soil and vegetation used by the animal as food were taken from each site in order to form a representative sample of the site. Concentrations of Cd, Ni, Pb and Zn were determined by Furnace Atomic Spectrometry or by Flame Spectrometry. Regarding environmental aspects, this study evaluated the degree of contamination by toxic metals in the study areas, as well as the evaluation of some biological effects caused by the exposure of *Ctenomys minutus* to vehicle exhaust.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Metais	3
1.2 Radicais Livres	5
1.3 Lipoperoxidação	6
1.4 Bioindicadores	8
2 OBJETIVOS.....	11
3 ÁREA DE ESTUDO E LOCAIS DE COLETA.....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Amostragem	20
4.2 Técnicas laboratoriais.....	22
4.2.1 Determinação de Metais.....	22
4.2.2 Espécies Reativas de Ácido Tiobarbitúrico (TBARs).....	23
4.2.3 Total Radical Antioxidant Potential (TRAP)	23
4.3 Métodos Estatísticos	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Metais.....	27
5.1.1 Cádmio	27
5.1.2 Chumbo	28
5.1.3 Níquel	30
5.1.4 Zinco.....	32
5.2 TBARs	38
5.3 Fluxo Veículos X Lipoperoxidação	40
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
7 CONCLUSÃO	45

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
--	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <u>Ctenomys minutus</u>	10
Figura 2: Localização da Área de Estudo.....	13
Figura 3: Aspecto Geral da Área de Estudo.....	15
Figura 4: Mapa de Uso do Solo.....	16
Figura 5: Mapa de Geologia.....	17
Figura 6: Aspecto Geral da Fazenda Maribo.....	18
Figura 7: Aspecto Geral da Fazenda Weber.....	19
Figura 8: Aspecto Geral da Fazenda Amaral.....	19
Figura 9: Gráfico dos Escores fatoriais das concentrações dos 4 metais analisados para o compartimento Solo nos três locais de coleta ao longo das estações do ano.....	35
Figura 10: Gráfico dos Escores fatoriais das concentrações dos 4 metais analisados para o compartimento Vegetação nos três locais de coleta ao longo das estações do ano.....	35
Figura 11: Gráfico do Índice de peroxidação de lipídios.....	38
Figura 12: <i>Total Antioxidant Rate</i> (TAR) nos animais em cada área nas estações do ano.....	40
Figura 13: Gráfico de Correlação entre Índice de TBARs Médio e Fluxo de Veículos.....	41

LISTA DOS QUADROS

Quadro 1: Média Diária de Veículos.....	21
Quadro 2: Concentração de Cádmio.....	28
Quadro 3: Concentração de Chumbo.....	30
Quadro 4: Concentração de Níquel.....	31
Quadro 5: Concentração de Zinco.	33
Quadro 6: Concentrações de Cd e Pb nas áreas de amostragem comparadas com as encontradas no Banhado do Taim.	34
Quadro 7: Escores fatoriais de cada Metal nos diferentes compartimentos.....	36
Quadro 8: Escores fatoriais de cada Metal nas diferentes áreas teste.	37
Quadro 9: Escores médios com os resultados da comparação múltipla do nível de peroxidação de lipídios.....	39

1 INTRODUÇÃO

A exposição às emissões provenientes dos veículos tem sido considerada preocupante pelos seus efeitos na saúde humana. Alguns estudos experimentais e evidências epidemiológicas indicam que a gasolina e o óleo diesel têm efeito mutagênico e/ou carcinogênico em animais e no homem (HADNAGY e SEEMAYER, 1988, LONNROT et al, 1996).

O aumento do tráfego automotivo correlaciona-se diretamente com a emissão de poluentes gasosos e de material particulado na atmosfera. Este impacto afeta não somente a qualidade do ambiente local, mas pode também produzir efeitos que se manifestam, dependendo de fatores meteorológicos, a grandes distâncias e a longo prazo (BRANCO, 1997).

As atividades antrópicas introduzem os metais no meio ambiente via deposição atmosférica pela queima de combustíveis fósseis e emissão de particulados e, via contaminação do solo pela lixiviação de resíduos industriais e urbanos.

Alguns metais presentes nas emissões gasosas (motores) e de material particulado (pneus e fuligem do motor), dependendo das concentrações, podem apresentar toxicidade aos organismos vegetais e animais expostos. Os diferentes compartimentos do ecossistema têm capacidade limitada para receber esses compostos sem que danos ocorram. Considerando que a vegetação tende a bioacumular metais (BROOKS et al, 1998) sem que ocorram problemas de toxicidade, é de fundamental importância realizar estudos em animais, preferencialmente em consumidores primários (SILVA et al, 1999).

Os efeitos de poluentes ambientais podem ser estimados através do uso de bioindicadores. Estes organismos refletem o estado do ambiente, podendo indicar poluição por sua presença ou ausência, frequência, distribuição, abundância, sobrevivência e respostas a determinadas condições ambientais (VARGHA et al, 2002).

Ensaio utilizando bioindicadores são de grande valia no monitoramento ambiental, permitindo a avaliação do efeito de poluentes em organismos e populações, principalmente se forem populações naturais, o que permite a avaliação do impacto na comunidade local.

Para uma avaliação ambiental, o exame dos efeitos pode ser mais significativo que o levantamento das causas permitindo, desta forma, quantificar melhor comportamentos cumulativos e sinérgicos. Processos bioquímicos podem ser usados para bioindicação, pois permitem o reconhecimento de danos causados aos bioindicadores bastante antes do dano visível. A detecção precoce das lesões bioquímicas, causadoras de subseqüentes mudanças na estrutura e fisiologia dos seres vivos, seria então parâmetro extremamente útil para avaliação do dano causado pela poluição ambiental (RAYA-RODRIGUEZ, 1986).

Os testes bioquímicos aqui propostos são recentes e não foram encontradas referências de estudos ambientais que usassem os mesmos testes para avaliação de dano.

1.1 Metais

Segundo WITTMANN (1981) sob o ponto de vista da toxicidade e abundância no meio-ambiente, os metais podem ser classificados sob três critérios:

- Não críticos como Na, K, Ca, Mg, Fe e Al;
- Tóxicos mas muito raros ou insolúveis como W, Zr, Ba e Ti;
- Muito tóxicos e relativamente acessíveis como Ni, Cu, Zn, As, Cd, Hg e Pb.

ESTEVES (1988) e GOLTERMAN (1975) ressaltam que alguns metais como Zn, Mn, Cu, Co, Mo são essenciais aos seres vivos, pois atuam como cofatores em rotas metabólicas de organismos aquáticos. Já outros metais como Hg, Pb, Cd, Cr, Ni, Ag e Sn não têm função biológica definida e são geralmente tóxicos a uma grande variedade de organismos.

Os metais, mesmo aqueles essenciais, podem, quando presentes em grandes concentrações, apresentar alta toxicidade aos organismos vegetais e animais. É incontestável que os diferentes compartimentos de ecossistemas têm capacidade limitada para receber esses metais sem que ocorram problemas de toxicidade (NRIAGU, 1988).

Os metais Pb, Cd, Zn e Ni enquadram-se na classe dos metais muito tóxicos e relativamente acessíveis (WITTMANN, 1981; RAYA-RODRIGUEZ, 1986), classificados pela EPA (Environmental Protection Agency) como categoria 1 de poluentes (elementos não voláteis, cumulativos e persistentes no meio

ambiente), sendo preferencialmente analisados em organismos vivos e no sedimento de rios e lagos.

Quase todos os metais da primeira linha do bloco D da Tabela Periódica possuem elétrons não pareados e por isso podem ser classificados como radicais livres, à exceção do Zn. Podendo assim, serem definidos também, devido ao comportamento em solução aquosa e efeitos biológicos. Alguns participam de reações biológicas extremamente importantes (Fe, Cu, Mn e Zn, por exemplo) mas, mesmo estes, quando em excesso ou sem controle na célula, são tóxicos. O número de oxidação variável dos metais de transição ajuda bastante na catalisação de reações de oxidação-redução, e por isso eles são utilizados em sítios ativos em muitas enzimas. O uso destes metais é cuidadosamente controlado para evitar a catalisação indesejada de radicais livres. Foi demonstrado que células isoladas expostas a metais e tecidos de animais contaminados por metais, apresentavam um aumento na peroxidação de lipídios.

Os metais Zn, Cd, Ni e Pb apresentam preocupações em termos ambientais e em saúde pública, pois:

-Zinco: não produz radicais livres diretamente, está envolvido em várias reações antioxidantes *in vivo* e proteção ao DNA;

-Cádmio: metal altamente tóxico e formador de radicais livres;

-Níquel: é usado como cofator por algumas enzimas e, em excesso, é carcinogênico além de intermediar a formação de radicais hidroxila;

-Chumbo: não produz radicais livres diretamente, mas aumenta a formação de radicais livres por outros metais. É neurotóxico, causa dano em hemáceas e, no sistema imune, inibe a Aminolevulinato Dehidratase que é o primeiro passo na

formação do grupamento heme (essencial para hemoglobina, mioglobina, clorofila e catalase – enzima antioxidante muito importante a qual degrada o peróxido de hidrogênio).

Uma provável maneira dos metais causarem carcinogênese é através da formação de radicais livres que causam quebras simples ou duplas no DNA. Apesar deste tipo de lesão ser rapidamente reparado, isso nem sempre ocorre na velocidade necessária ou na totalidade da lesão, podendo levar, muitas vezes à transformação celular (ROJAS et al, 1996). Cádmio e Níquel são classificados como carcinogênicos pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC). MINISSI e LOMBI (1997) também observaram um aumento na taxa de mutações em ambientes contaminados por cádmio, níquel, zinco, vanádio e cobre.

1.2 Radicais Livres

Radicalis livres são moléculas muito reativas que possuem um elétron não pareado. Este tipo de molécula é natural e constantemente produzido pela célula por uma saída da cadeia transportadora de elétrons ao nível da ubiquinona. Entre 2 e 5% dos elétrons que passam pela cadeia transportadora de elétrons são transformados em superóxido. A mais importante fonte de radicais livres (ânion superóxido e radicais hidroxila) em células aeróbicas é o oxigênio molecular. Peróxidos e metais de transição também são geradores de radicais livres hidroxila pela reação de Fenton mostrada abaixo e via cadeia de peroxidação lipídica

(HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; ZWART et al, 1999; MATÉS et al, 1999).



Reação de Fenton

1.3 Lipoperoxidação

A peroxidação de lipídios é provavelmente o processo, induzido por radicais livres, mais extensivamente estudado (ZWART et al, 1999). A lipoperoxidação é uma evidência da injúria causada pelos radicais livres nos sistemas biológicos.

Os primeiros produtos da lipoperoxidação são os chamados dienos conjugados. Estes, num meio aeróbico, tendem a reagir com o oxigênio e a oxidar outros lipídios de membrana formando outros lipoperóxidos (reação em cadeia). Estes compostos são muito instáveis e tendem a se reoxidar na presença de metais de transição, formando novas cadeias de lipoperoxidação (BIELSKI et al, 1983; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984).

Nas células, além de causarem a peroxidação de lipídios que resultam em alterações na permeabilidade de membranas, os radicais livres causam também a oxidação de proteínas (alterações na função de proteínas estruturais e atividade de enzimas). Também causam danos em ácidos nucleicos, alterando a expressão de proteínas, e lesões gênicas que podem resultar na transformação ou morte da célula (SELMAN et al, 2000).

A peroxidação de lipídios é um processo extremamente destrutivo para as células. Sua ação pode ser direta, por diminuir a fluidez da membrana, inativar proteínas integrais e influir na homeostase iônica do citosol ou indireta; por ativar proteases e endonucleases Ca^{+2} dependentes, promover efeito citostático (impedir a duplicação do DNA) ou citotóxico (através de subprodutos altamente reativos). Dependendo da extensão dos danos pode resultar em apoptose (tipo especial de morte celular onde a célula é induzida a um “suicídio”), ou pode resultar no desenvolvimento de câncer (HALLIWELL e ARUOMA,1997; ALBANO e BELLOMO, 1991; FRAGA, 1988; BENEDETTI et al, 1980; STOIAN et al, 1996, LONNROT et al, 1996).

A determinação dos danos em lipídios (formadores das membranas plasmática e carioteca, mitocôndrias e outras organelas) é de extrema importância, pois é de fácil e rápida detecção, proporcionando uma indicação precoce de uma possível injúria causada por radicais livres no indivíduo exposto ao poluente, pois permite a identificação do dano a nível molecular (bioquímico) que pode causar subseqüentes mudanças celulares, fisiológicas e em tecidos que podem resultar na morte do indivíduo (MATÉS et al, 1999).

O nível de lipoperoxidação (dano oxidativo em lipídios) será estimado pela determinação de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBA), no caso Malondialdeído que é um intermediário produzido pela lipoperoxidação. Um outro parâmetro avaliado foi a capacidade total antioxidante não enzimática, determinada por um sistema doador de radicais livres e pela capacidade de extingui-los apresentada pela amostra verificada por quimioluminescência na presença de Luminol.

1.4 Bioindicadores

Os programas de monitoramento são importantes em avaliações de Impacto Ambiental, pois:

- fornecem informações relevantes a respeito da extensão da poluição, do impacto ambiental provável e da deterioração ou da melhoria gerada numa escala

temporal e espacial;

- permitem avaliar a eficiência de ações mitigadoras adotadas com o propósito de reduzir ou eliminar a origem da contaminação;

- podem ser utilizados na avaliação de normas ou guias que estejam em vigor, elaborados com fins de proteção ambiental.

Este monitoramento pode ser realizado sob duas diferentes abordagens, monitoramento químico e monitoramento biológico ou bioindicação.

A abordagem através de um biomonitoramento surge com a grande vantagem de poder-se avaliar a ecotoxicidade conjunta de todos os constituintes nos componentes bióticos do ecossistema e seus custos são relativamente baixos, quando comparados à abordagem por químicos. O biomonitoramento, por exemplo, mede o efeito tóxico como um todo, de todas as substâncias químicas presentes no ambiente, sua biodisponibilidade e os efeitos de interação existentes.

Bioindicação é a medida das alterações em organismos ou ecossistemas provocadas por efeitos ambientais antrópicos. Bioindicadores são organismos ou comunidades que respondem à carga de poluentes ou que os acumulam, com alterações em seu metabolismo, processos fisiológicos ou modificações morfológicas.

Os Bioindicadores podem ser de dois tipos sensitivos e acumuladores. Os **sensitivos** mostram alta sensibilidade a poluentes, não só pela diminuição da sua vitalidade, como por sintomas externos característicos. Os bioindicadores **acumuladores** mostram resistência à poluentes, acumulando-os em seus tecidos sem que suas funções vitais sejam perturbadas.

A utilização de Bioindicadores em programas de monitoramento ambiental, através do **Monitoramento Passivo** utiliza organismos indicadores naturalmente presentes no ambiente em estudo.

A lista dos compostos que são considerados perigosos para o ambiente, por causarem impacto crescente nos ecossistemas, torna-se dia a dia maior, indicando toxicidades, persistências e acumulações dos mesmos. Torna-se necessário não só efetuar a avaliação da concentração destes poluentes, mas também analisar os efeitos sobre os componentes abióticos e bióticos dos ecossistemas (RAYA-RODRIGUEZ, 1986; TALMAGE e WALTON, 1991).

Um organismo bioindicador deve ser capaz de detectar muitas classes de danos, além de ser sensível ao poluente a ser analisado, de fácil acesso. Se possível, deve ocorrer naturalmente no local, ser preferencialmente mamífero e consumidor primário (SILVA et al, 1999).

Os Tuco-tucos são pequenos roedores fossoriais, do gênero *Ctenomys*, que vivem em tocas individuais no solo e nestas desenvolvem todas as atividades biológicas. A **Figura 1** apresenta um indivíduo da espécie *Ctenomys minutus* (FREITAS, 1995), que são herbívoros, tem ampla distribuição na Planície Costeira do Rio Grande do Sul e ocorrem em áreas relativamente povoadas ou de intensa atividade humana, ocorrendo inclusive próximo a rodovias. Estas características

qualificam-no para este estudo como um potencial organismo bioindicador.



Figura 1: *Ctenomys minutus*.

2 OBJETIVOS

Este trabalho pretende avaliar o impacto causado pelo tráfego na estrada RS 030 através de bioindicação ambiental, e verificar se o aumento do tráfego de veículos na estrada relaciona-se com o aumento do dano nos bioindicadores utilizados.

Objetivos específicos do trabalho:

1 Relacionar as variáveis ambientais analisadas com o dano oxidativo detectado para os diferentes locais amostrados.

2 Concentrações de metais tóxicos (Cd, Ni, Pb e Zn) em amostras de solo e vegetação dos locais utilizados pela espécie roedora;

3 Presença destes metais tóxicos em pêlos e em pelotas fecais de *Ctenomys minutus* coletados nos locais determinados;

4 Testes bioquímicos para avaliação do dano causado por radicais livres em lipídios em células sanguíneas de indivíduos da espécie *Ctenomys minutus*;

3 ÁREA DE ESTUDO E LOCAIS DE COLETA

A área de estudo deste trabalho situa-se na parte norte da Planície Costeira do Rio Grande do Sul, onde se encontra o sistema lagunar da região Osório – Tramandaí, às margens da estrada RS 030, próximo ao km 90 no município de Osório (**Figura 2**). Esta estrada é uma via de acesso à BR 101, que une o Rio Grande do Sul aos outros estados do Brasil margeando a costa atlântica. O fluxo de veículos nesta estrada é relativamente baixo de Março a Novembro, porém aumenta significativamente nos meses de Dezembro, Janeiro e Fevereiro, período de veraneio.

A área de estudo é definida como a região da planície costeira compreendida entre os paralelos 29° 45'S e 30° 15'S e os meridianos 50° 00 e 50° 30' W' correspondendo à parte norte da planície onde se localiza o sistema lagunar da região Tramandaí-Osório

A planície costeira, segundo VILLWOCK (1984), consiste de um conjunto de fácies sedimentares descontínuas no tempo e no espaço, resultantes do acúmulo de sedimentos originados por transgressões e regressões sucessivas do nível do mar com início no período Pleistocênico.

O clima da região é do tipo "**cfa**" ou subtropical úmido na classificação de Köppen, o que assegura uma distribuição de chuvas durante o ano inteiro, fator importante para o regime de águas com verão quente e inverno frio. Por estar localizado na zona subtropical sul na costa oriental da América do Sul, o clima da região é controlado por massas de origem tropical marítima (**mT**) e polar marítima (**mP**) (STRAHLER, 1977).

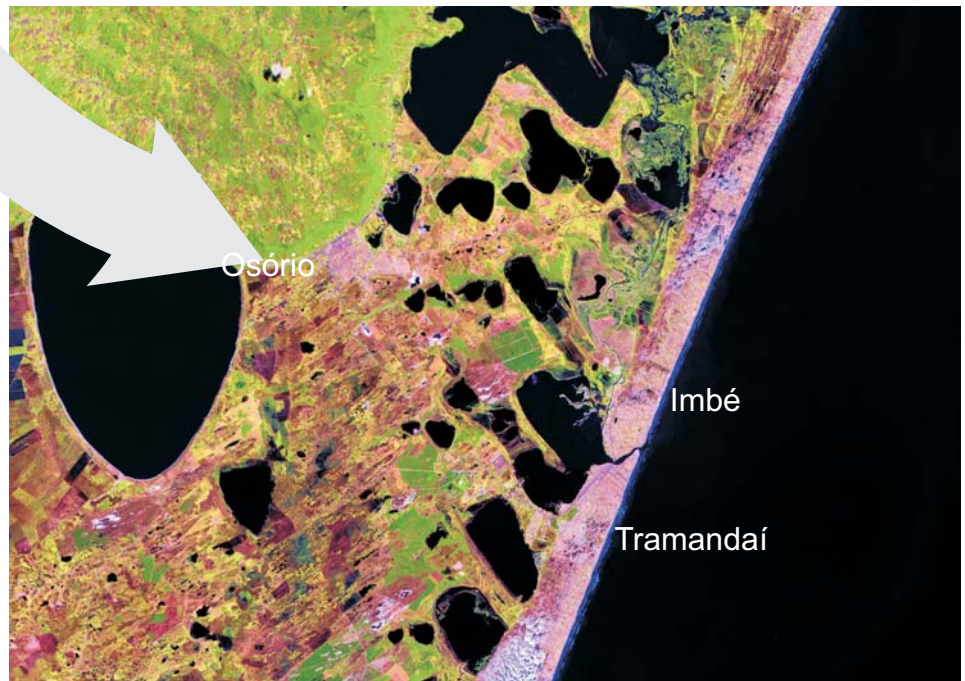


Figura 2: Localização da Área de Estudo

O clima da região é do tipo subtropical úmido e segundo HASENACK e FERRARO (1989), o vento predominante do local é de nordeste, com velocidade média anual de $5,4 \text{ m.s}^{-1}$. A temperatura média anual é de aproximadamente 20°C com umidade relativa do ar em torno de 76%. A precipitação média é de 1504 mm.

Os centros urbanos da área de estudo correspondem às cidades de Osório, ao pé da escarpa, e Cidreira, Tramandaí, Imbé e Capão da Canoa junto ao Oceano, onde a urbanização é quase contínua e com intensa atividade humana apenas nos meses de verão.

A paisagem original caracterizada por mata de restinga e campo, está profundamente alterada, dando lugar a campos de pastagens, lavouras de cultivos anuais e florestamentos com espécies exóticas (HASENACK & FERRARO, 1989).

Considerando os ventos predominantes de nordeste na região (HASENACK e FERRARO, 1989), foram escolhidas três áreas de coleta apresentadas na **Figura 3**. Todas as áreas escolhidas são utilizadas para pecuária. Assim, a cobertura vegetal, e também os animais do local (*Ctenomys minutus*) não sofrem grandes perturbações como em áreas com agricultura.

O trabalho foi realizado em três estações de amostragem, dois pontos de coleta estão próximos à cidade de Osório, margeando a RS 030. Um terceiro ponto na região foi selecionado em área afastada cerca de 2000 metros da rodovia mais próxima (Estrada do Mar) representando o local menos impactado. A posição relativa entre as áreas e as rodovias pode ser vista nas **Figuras 4 e 5** que apresentam o uso do solo e a geologia da área de estudo.



Fig. 3 - Aspecto Geral da Área de Estudo com Localização dos Locais de Coleta.
Imagem Landsat 4.

Fonte: LANDSAT T M 4



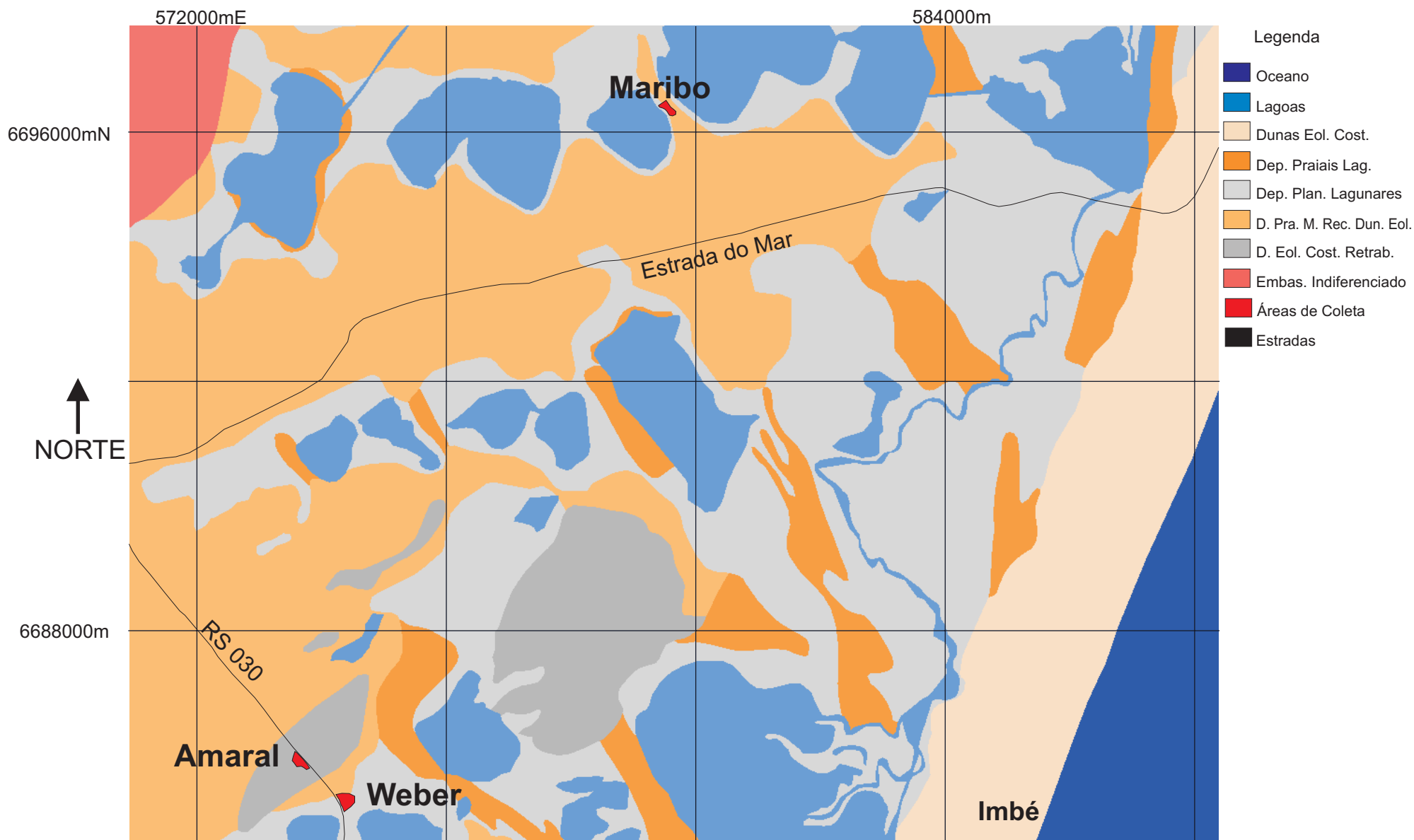


Fig. 5 - Mapa de Geologia com a Posição Relativa das Áreas de Coleta

Fonte: Centro de Estudos de Geologia Costeira e Oceânica (CECO) - Mapa Geológico, Folhas Osório e Tramandaí (1984)

O aspecto geral das estações de amostragem pode ser visualizado nas seguintes figuras, a Fazenda Maribo (**Figura 6**) considerado o ponto menos impactado; a Fazenda Weber (**Figura 7**) localizada na margem Nordeste (barlavento) e a Fazenda Amaral (**Figura 8**) na margem Sudoeste (sotavento) da rodovia RS 030 são os pontos de avaliação direta de impacto da rodovia.



Figura 6: Fazenda Maribo – aspecto geral da área de coleta.



Figura 7: Fazenda Weber – aspecto geral da área de coleta.



Figura 8: Fazenda Amaral – aspecto geral da área de coleta.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

A amostragem de bioindicadores foi realizada em cada local de coleta e em quatro estações climáticas no período entre julho de 2000 e junho de 2001. O Quadro 1 apresenta as datas das coletas e o fluxo de veículos correspondente a cada ponto de amostragem.

Foram capturados em todo o período de avaliação 108 indivíduos de *Ctenomys minutus* com auxílio de armadilha do tipo Oneida-Victor nº zero. Os animais, anestesiados com Zoletil, tiveram retirado alíquotas de pêlos para dosagem de metais. Coletou-se também 0,5 a 1,5 mL de sangue imediatamente armazenado a -40°C em gelo seco por aproximadamente seis horas. Posteriormente foram transferidos em laboratório para freezer a -70°C até os procedimentos dos testes bioquímicos.

Amostras de sangue com menos de 250 μL foram descartadas por não conterem material suficiente para todos os testes. No total, 79 amostras foram testadas e consideradas válidas para análise estatística.

Em cada local de coleta foram retiradas alíquotas de solo superficial, vegetação e pelotas fecais ao redor da toca de cada animal capturado. As alíquotas amostradas nas tocas foram misturadas para formar amostras compostas de solo superficial, vegetação e pelotas fecais representativas dos três locais de coleta em cada estação do ano. Este material foi transportado para laboratório para dosagem de metais.

Quadro 1: Fluxo de veículos: Total de veículos diários, média dos sete dias precedentes à coleta (HEUSER, 2001).

<i>Estação</i>	<i>Fazenda</i>	<i>Data Coleta</i>	<i>Veículos/dia</i>
Inverno	Maribo	17/08/2000	4900
	Weber	25/07/2000	5000
	Amaral	01/08/2000	4600
Primavera	Maribo	17/11/2000	6200
	Weber	21/11/2000	8200
	Amaral	28/11/2000	7400
Verão	Maribo	19/03/2001	6400
	Weber	13/03/2001	8300
	Amaral	06/03/2001	8900
Outono	Maribo	21/05/2001	5500
	Weber	04/06/2001	5700
	Amaral	24/05/2001	4800

4.2 Técnicas laboratoriais

4.2.1 Determinação de Metais

Para a quantificação de metais em pêlos, solo e gramíneas as amostras foram secas, pesadas e colocadas em um recipiente de teflon juntamente com 10mL de água deionizada e 5 ml de ácido nítrico 60%, para digestão. Os recipientes de teflon foram devidamente fechados e levados a um forno de micro-ondas (CEM – MDS 2000 Microwave Digestion System) por 45 minutos, com 100% da potência, até uma pressão de 120 psi (aproximadamente 8 atm). Após a digestão, as amostras foram quantitativamente filtradas para um balão volumétrico de 50 mL, o qual foi completado com água deionizada. A metodologia utilizada foi adaptada de PERKIN ELMER (1982) e ALLEN (1989).

A determinação de chumbo, níquel e cádmio, foi realizada via atomização eletrotérmica em Forno de Grafite no Espectrofotômetro de Absorção Atômica modelo SIMAA 6000 e a determinação de zinco via atomização em Chama de acetileno no modelo 3300 (PERKIN ELMER, 1982; ALLEN, 1989). As análises foram feitas no Centro de Ecologia da UFRGS.

4.2.2 Espécies Reativas de Ácido Tiobarbitúrico (TBARs)

O índice da peroxidação de lipídios usado foi a formação de TBARs durante uma reação a quente em pH ácido, a qual é amplamente adotada como um método sensível para medição da peroxidação de lipídios como descrita em, DALL PIZZOL et al (2001). Amostras de sangue (100 µL) foram homogeneizadas em 1 mL de solução tampão. O conteúdo de proteínas de cada amostra foi determinado pelo método de LOWRY (1951). Ácido tricloroacético 10% (TCA) foi adicionado a cada amostra padronizada para precipitação de proteínas. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 700 G por 10 minutos. Foram retirados 400 µL do sobrenadante aos quais adicionou-se 400µL de ácido tiobarbitúrico 0,67% (TBA). As amostras foram incubadas em banho fervente por 30 minutos. Espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARs) foram então determinadas em espectrofotômetro pela medida de absorbância a 535 nm.

4.2.3 Total Radical Antioxidant Potential (TRAP)

Para a determinação de TRAP foi usado o método da quimioluminescência (LONNROT et al, 1996), pois sabe-se que a decomposição térmica de ABAP produz radicais peroxil a uma taxa constante. As reações de radicais peroxil foram indicadas pela quimioluminescência evidenciada pelo Luminol, composto que reage com os radicais peroxil formados e emite luz detectada pelo cintilador

líquido. Para cada amostra de sangue foi determinado o teor protéico segundo método proposto por LOWRY (1951). O valor protéico permitiu assim corrigir o volume de cada amostra a ser utilizada no teste. A diminuição no número de contas foi então comparada à amostra de Trolox (análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E). O Trolox tem uma reconhecida capacidade de extinguir 2 mols de radicais peroxil para cada 1 mol de Trolox. O tempo de reação, desde a adição da amostra até sua extinção é diretamente proporcional à capacidade antioxidante da amostra de “capturar” os radicais peroxil no meio, a qual é expressa como micromols de radicais peroxil “capturados” por 1 litro de amostra.

Em ambiente escuro, adicionou-se a todos os vials (frascos) 4 mL da solução de ABAP e 10 μ L da solução de Luminol. No vial usado como controle adicionou-se 10 μ L da solução de Trolox e nos demais vials, 10 μ L de amostra. Fez-se a leitura dos vials em 6 ciclos de 10 segundos em um cintilador.

Devido a pouca quantidade de material (sangue) optou-se por agrupar as amostras de uma mesma estação do ano e de um mesmo local de coleta numa amostra composta para obtenção de um indicativo da defesa antioxidante hidrossolúvel (glutathiona oxidada/reduzida) presente no interior das células.

Os reagentes especiais utilizados neste ensaio estão descritos a seguir:

-ABAP: Dissolver 0,135g de ABAP em 50 mL de Tampão Glicina (uma solução de glicina 0,1M com pH 8,6).

-Luminol: Dissolver 17,7mg de Luminol em 2 mL de NaOH 0,1N para obter a solução estoque (50mM). Adiciona-se a 920 μ L de Tampão Glicina (glicina

0,1M com pH 8,6) 80µL da solução estoque de Luminol para obter a solução de Luminol para uso.

-**Trolox**: Para a solução estoque (3,2mM) pesar 8mg de Trolox e dissolver em 10 mL de Tampão Glicina. Para fazer solução de uso (200nM), pipetar 15µL da solução estoque em 585µL de Tampão Glicina.

Para fins de comparação e apresentação dos dados foram utilizadas as medidas de redução de quimioluminescência do primeiro ciclo de leitura, indicando o potencial antioxidante da amostra. Este valor, denominado TAR (Total Antioxidante Rate), foi usado para comparar as amostras.

As análises bioquímicas foram realizadas no Centro de Estresse Oxidativo do Departamento de Bioquímica - ICBS - UFRGS.

4.3 Métodos Estatísticos

As análises estatísticas foram realizadas no NAE - Núcleo de Assessoria em Estatística do Instituto de Matemática e Estatística da UFRGS.

Utilizou-se os programas Estatística for Windows, SPSS e SAS.

Na análise de variância ANOVA, adotou-se a abordagem de fatorial cruzado sem repetição para avaliar a presença de cada metal nos compartimentos ambientais Solo, Pelos e Pelotas Fecais.

A análise de componentes principais foi realizada utilizando-se a “carga” conjunta dos metais Cd, Ni, Pb e Zn em cada local de coleta ao longo das quatro

estações do ano. Este teste foi utilizado para avaliar possíveis diferenças da carga metálica no solo e vegetação.

A análise de correlação linear entre o fluxo de veículos e o dano bioquímico utilizou o coeficiente de Pearson.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Metais

Foram realizadas coletas no período indicado no Quadro 1 e amostrados os compartimentos ambientais dos três locais avaliados na área de estudo, resultando em 12 amostras de solo, 12 amostras de vegetação, 12 amostras de pêlos e 12 amostras de pelotas fecais, num total de 48 amostras. Em cada uma delas foram analisados os metais cádmio, chumbo, níquel e zinco.

5.1.1 Cádmio

O **Quadro 2** apresenta as concentrações de Cd nas amostras dos compartimentos ambientais. O cádmio não foi detectado nas amostras de solo do período de Outono nas fazendas Amaral e Maribo, nem na amostra de pêlos da Fazenda Maribo. O valor máximo de Cd no solo de $8,31 \mu\text{g.kg}^{-1}$, foi observado na Fazenda Weber na Primavera, porém é inferior ao valor de $350 \mu\text{g.kg}^{-1}$ indicado por BOWEN (1979) como valor basal.

Nas amostras de vegetação o valor máximo de Cd de $72,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ foi obtido na Fazenda Amaral no Outono e o valor mínimo de $9,03 \mu\text{g.kg}^{-1}$ na Fazenda Weber na Primavera. Valores habituais de Cd em plantas terrestres (ALLEN, 1989) apresentam concentrações de até $300 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Nos pêlos o maior valor encontrado

foi 50,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ na Fazenda Amaral no Inverno e nas pelotas fecais a amplitude de concentração obtida foi de 89,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ na Fazenda Maribo no Outono e 25,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ na Fazenda Weber no Inverno.

Quadro 2: Concentração de Cádmiio ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) em compartimentos ambientais de locais da Planície Costeira, RS – 2000/2001.

Estação	Local	Solo	Vegetação	Pelos	Pelotas Fecais
Inverno	Maribo	6,35	29,5	39,4	78,2
	Weber	5,91	51,3	28,2	25,4
	Amaral	6,85	14,7	50,8	75,5
Primavera	Maribo	2,84	23,4	24,8	46,1
	Weber	8,31	9,03	43,6	41,9
	Amaral	3,82	22,1	28,2	81,8
Verão	Maribo	2,10	19,9	8,96	36,1
	Weber	2,02	30,7	23,0	33,4
	Amaral	2,41	21,0	22,1	48,7
Outono	Maribo	nd	33,0	nd	89,0
	Weber	1,0	54,0	20,0	42,0
	Amaral	nd	72,0	2,00	26,0

5.1.2 Chumbo

O **Quadro 3** apresenta as concentrações de Pb nas amostras coletadas nos locais da área de estudo. A maior concentração de chumbo em solo ($4,23 \mu\text{g.g}^{-1}$) ocorreu na Fazenda Amaral no Outono e a menor ($1,26 \mu\text{g.g}^{-1}$) na Fazenda Maribo no Outono e no Verão. Para solos BOWEN (1979) considera valores

basais de chumbo até $35 \mu\text{g.g}^{-1}$.

A maior concentração de Pb na vegetação foi detectada na Fazenda Weber no Inverno ($3,38 \mu\text{g.g}^{-1}$) e a menor ($0,62 \mu\text{g.g}^{-1}$) na Fazenda Amaral no Verão. BOWEN (1979) indica concentrações de até $13 \mu\text{g.g}^{-1}$ em plantas terrestres como valores basais.

Nos pêlos a maior concentração de Pb ($7,95 \mu\text{g.g}^{-1}$) foi detectada na Fazenda Weber na Primavera e a menor ($0,32 \mu\text{g.g}^{-1}$) na Fazenda Maribo no Verão. Em pelotas fecais a maior concentração ($3,95 \mu\text{g.g}^{-1}$) ocorreu na Fazenda Amaral na Primavera e a menor ($0,39 \mu\text{g.g}^{-1}$) na Fazenda Maribo no Verão. WALDEMARIN (1999), dosou Pb em pelotas fecais de lontra em áreas de preservação obtendo valores de $0,243 \mu\text{g.g}^{-1}$. Esta concentração é inferior à obtida em pelotas fecais de *Ctenomys minutus* ($1,96 \mu\text{g.g}^{-1}$) deste trabalho, que apresentou concentrações mais elevadas.

Especificamente TALMAGE e WALTON (1991) comentam que as concentrações de chumbo em solo, vegetação, invertebrados e em alguns tecidos de mamíferos apresentam correlação com a densidade do tráfego das estradas, sendo que a concentração de Pb nos tecidos apresenta um efeito de gradiente com relação à distância da estrada.

Quadro 3: Concentração de Chumbo ($\mu\text{g.g}^{-1}$) em compartimentos ambientais de locais da Planície Costeira, RS – 2000/2001.

Estação	Local	Solo	Vegetação	Pelos	Pelotas Fecais
Inverno	Maribo	1,93	1,36	3,01	2,32
	Weber	3,09	3,38	2,16	1,65
	Amaral	3,87	2,21	1,21	2,98
Primavera	Maribo	1,75	1,73	5,60	1,96
	Weber	3,45	1,77	7,95	2,14
	Amaral	2,98	1,01	7,87	3,95
Verão	Maribo	1,26	1,44	0,32	0,39
	Weber	2,14	2,05	1,17	0,64
	Amaral	2,70	0,62	0,82	1,59
Outono	Maribo	1,26	0,78	1,22	2,11
	Weber	2,74	1,98	1,08	1,30
	Amaral	4,23	1,74	1,27	2,53

5.1.3 Níquel

O **Quadro 4** apresenta as concentrações de Ni nas amostras coletadas na área de estudo. No solo a maior concentração de Níquel ($1,67 \mu\text{g.g}^{-1}$) ocorreu no Inverno na Fazenda Amaral e no Verão na Fazenda Weber, a menor concentração ($0,16 \mu\text{g.g}^{-1}$) na Fazenda Maribo no Outono. BOWEN (1979) indica como nível basal uma concentração de até $50 \mu\text{g.g}^{-1}$ de Ni para solos e até $5 \mu\text{g.g}^{-1}$ para plantas terrestres. Na vegetação, o maior valor ($2,35 \mu\text{g.g}^{-1}$) foi encontrado na Fazenda Weber no Verão e o menor ($0,16 \mu\text{g.g}^{-1}$) na Fazenda Maribo no Outono.

Em pêlos a maior concentração de Ni obtida foi na Fazenda Weber na

primavera ($3,16 \mu\text{g.g}^{-1}$) e a menor na Fazenda Maribo no Verão ($0,32 \mu\text{g.g}^{-1}$). Nas pelotas fecais a maior concentração ocorreu na Fazenda Amaral no Inverno ($3,84 \mu\text{g.g}^{-1}$) e a menor ($0,19 \mu\text{g.g}^{-1}$) na Fazenda Maribo no Outono. Todos os valores apresentados de Ni nos compartimentos ambientais amostrados encontram-se na faixa das concentrações habitualmente presentes no ambiente.

Quadro 4: Concentração de Níquel ($\mu\text{g.g}^{-1}$) em compartimentos ambientais de locais da Planície Costeira, RS – 2000/2001.

Estação	Local	Solo	Vegetação	Pelos	Pelotas Fecais
Inverno	Maribo	0,38	0,42	1,05	0,88
	Weber	0,94	1,89	1,96	3,25
	Amaral	1,67	2,11	1,66	3,84
Primavera	Maribo	0,24	0,55	1,30	0,87
	Weber	0,98	0,62	3,16	1,66
	Amaral	1,45	1,35	1,91	2,23
Verão	Maribo	0,24	0,40	0,32	0,82
	Weber	1,67	2,35	1,50	2,08
	Amaral	1,51	1,29	0,83	2,08
Outono	Maribo	0,16	0,16	0,57	0,19
	Weber	1,18	1,06	1,36	0,93
	Amaral	1,64	1,20	1,24	1,98

5.1.4 Zinco

O **Quadro 5** apresenta as concentrações de Zn nas amostras dos compartimentos ambientais coletados. A maior concentração de zinco no solo ocorreu na Fazenda Weber no Outono ($12,6 \mu\text{g.g}^{-1}$) e a menor ($0,58 \mu\text{g.g}^{-1}$) na Fazenda Maribo na Primavera, BOWEN (1979) indica para Zn no solo concentrações de até $90 \mu\text{g.g}^{-1}$ como valor basal.

Nas amostras de vegetação a maior concentração de Zn ($122 \mu\text{g.g}^{-1}$) foi obtida na Fazenda Amaral no Outono e a menor na Fazenda Maribo também no Outono ($26,4 \mu\text{g.g}^{-1}$), BOWEN (1979) indica concentrações em plantas terrestres de até $400 \mu\text{g.g}^{-1}$ como valores basais.

Em pêlos, a maior concentração foi encontrada ($235 \mu\text{g.g}^{-1}$) na Fazenda Amaral no Verão e a menor ($1,64 \mu\text{g.g}^{-1}$) na Fazenda Weber no Outono. Em pelotas fecais, o maior valor encontrado ($301 \mu\text{g.g}^{-1}$) ocorreu na Fazenda Amaral no Verão e o menor ($45,9 \mu\text{g.g}^{-1}$) na Fazenda Amaral no Outono.

Quadro 5: Concentração de Zinco ($\mu\text{g.g}^{-1}$) em compartimentos ambientais de locais da Planície Costeira, RS – 2000/2001.

Estação	Local	Solo	Vegetação	Pelos	Pelotas Fecais
Inverno	Maribo	0,98	56,8	179	194
	Weber	2,92	54,2	144	125
	Amaral	3,92	75,6	131	152
Primavera	Maribo	0,58	54,4	163	116
	Weber	4,20	58,8	148	165
	Amaral	3,68	37,6	161	216
Verão	Maribo	2,69	54,1	212	170
	Weber	6,40	81,8	203	256
	Amaral	7,42	79,8	235	301
Outono	Maribo	1,93	26,4	222	191
	Weber	12,6	81,3	1,64	145
	Amaral	10,2	122	204	45,9

No **Quadro 6** apresentam-se as concentrações médias de Cd e Pb em pelotas fecais de *Ctenomys minutus* ao longo do período de um ano, comparado com as concentrações dos mesmos metais em fezes de *Lontra longicaudis* no Banhado do Taim, verificado no trabalho de WALDEMARIN (1999). Mesmo tratando-se de animais de diferentes habitats e nível trófico, a concentração de Pb em fezes de tuco-tucos é duas a três vezes maior que nas fezes de lontra e as concentrações de Cd cerca de cinco a onze vezes maiores. Estes incrementos nas concentrações de metais em cada área de estudo poderiam indicar uma possível influência da estrada e/ou da urbanização.

Quadro 6: Concentrações médias de Cd e Pb na área de estudo e no Banhado do Taim (WALDEMARIN, 1999).

Loca l /Metal	Cd ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
Maribo	0,062	1,69
Weber	0,036	1,43
Amaral	0,058	2,76
Taim (lontras)	0,018	0,243

As **Figuras 9 e 10** apresentam os gráficos de escores fatoriais para Solo e Vegetação. Observa-se uma tendência de baixos valores na fazenda Maribo para o conjunto integrado dos quatro metais analisados nos compartimentos Solo (**Figura 9**) e Vegetação (**Figura 10**) em relação aos valores apresentados nas fazendas Amaral e Weber.

Este comportamento evidencia estatisticamente que diferentes cargas de metais atuam no ponto controle (Maribo) e nas duas áreas marginais à estrada (Amaral e Weber). Nos compartimentos ambientais (Pêlos e Pelotas Fecais) este comportamento não foi evidenciado.

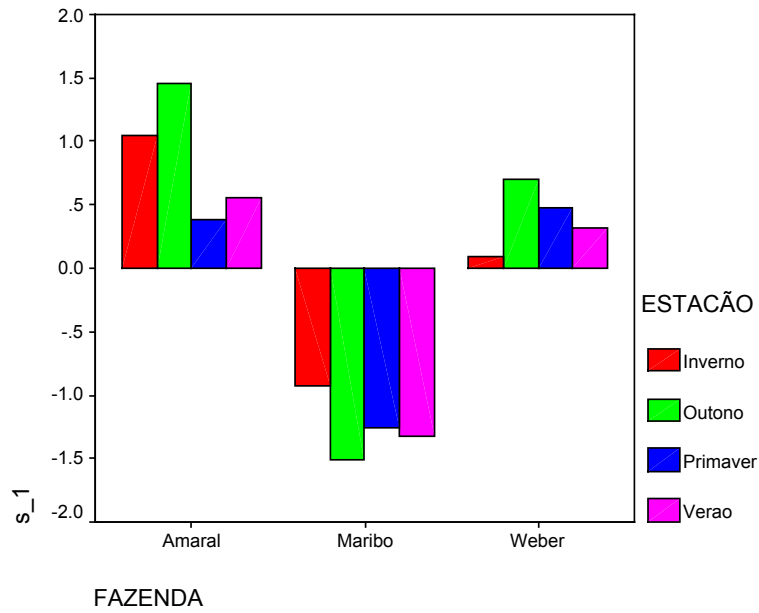


Figura 9: Escores fatoriais das concentrações dos 4 metais analisados para o compartimento Solo, nos três locais de coleta, ao longo das estações do ano.

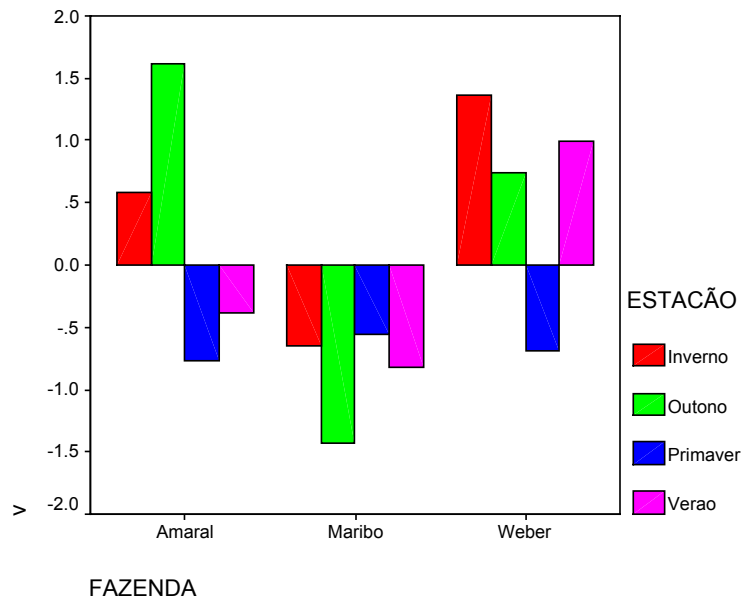


Figura 10: Escores fatoriais das concentrações dos 4 metais analisados para o compartimento Vegetação, nos três locais de coleta, ao longo das estações do ano.

Analisando-se as concentrações de cada metal isoladamente nos compartimentos ambientais em todo o período avaliado, verifica-se através da variância um comportamento diferente no período Inverno-Primavera e no período Verão-Outono, como pode ser verificado no **Quadro 7**.

Este comportamento diferenciado entre as estações climáticas Inverno-Primavera e Verão-Outono é significativo no solo para Cd e Zn e nos pelos para Cd, Ni e Zn.

Quadro 7: Escores fatoriais de cada Metal nos diferentes compartimentos ambientais.

Metal/Compartimento	Estação climática/Escore fatorial			
Cd Solo	I a	P a	---	O b
Cd Pelos	I a	---	---	O b
Ni Pelos	---	P a	V b	O b
Pb Pelos	---	P a	---	---
Pb Pelotas Fecais	---	---	V b	---
Zn Solo	I b	---	---	O a
Zn Pelos	I b	P b	V a	---

Estação: **I**=Inverno, **P**=Primavera, **V**=Verão e **O**=Outono;

Escores: **a**=alto e **b**=baixo. Para caracteres iguais na mesma linha não existe diferença significativa;

Diferença significativa entre **a** e **b** (na mesma linha) para um $\alpha=5\%$.

Analisando-se as concentrações de cada metal isoladamente nos compartimentos ambientais dos três locais avaliados, verifica-se através da variância um comportamento diferente entre o ponto controle (Maribo) sempre associado a baixos escores e as fazendas Amaral e Weber, associadas a altos escores, **Quadro 8**.

Quadro 8: Escores fatoriais de cada Metal nas diferentes áreas avaliadas.

Metal/Compartimento	Fazenda/Escore		
Ni Solo	M b	W a	A a
Ni Vegetação	M b	W a	A a
Ni Pelos	M b	W a	A ab
Pb Solo	M b	W a	A a
Pb Pelotas	M b	W b	A a
Zn Solo	M b	W a	A a

Fazenda: M=Maribo, W=Weber e A=Amaral

Escores: **a**=alto e **b**=baixo. Para caracteres iguais na mesma linha não existe diferença significante; Diferença significante entre **a** e **b** na mesma linha para um $\alpha=5\%$.

A análise estatística indicou que maiores concentrações de Pb, Ni e Zn nos diferentes compartimentos estão associadas à proximidade da estrada, sendo que Níquel (nos compartimentos Solo, Vegetação e Pelos) é o que melhor está associado à proximidade da estrada.

5.2 TBARs

O gráfico do índice de peroxidação de lipídios (nmol TBA/mg de proteína) sazonal, apresentado na **Figura 11**, sugere uma diferença entre a estação do Verão em relação às demais. Já o resultado da análise multivariada, apresentado no **Quadro 9**, indica não existir diferença significativa entre os locais de coleta dentro de uma mesma estação. Quando se compara dano em um mesmo local de coleta nas diferentes estações, o Verão mostra-se significativamente diferente das demais estações, com exceção do Inverno na Fazenda Maribo, e o Inverno neste mesmo local não apresentou diferença significativa entre a Primavera e ao Outono.

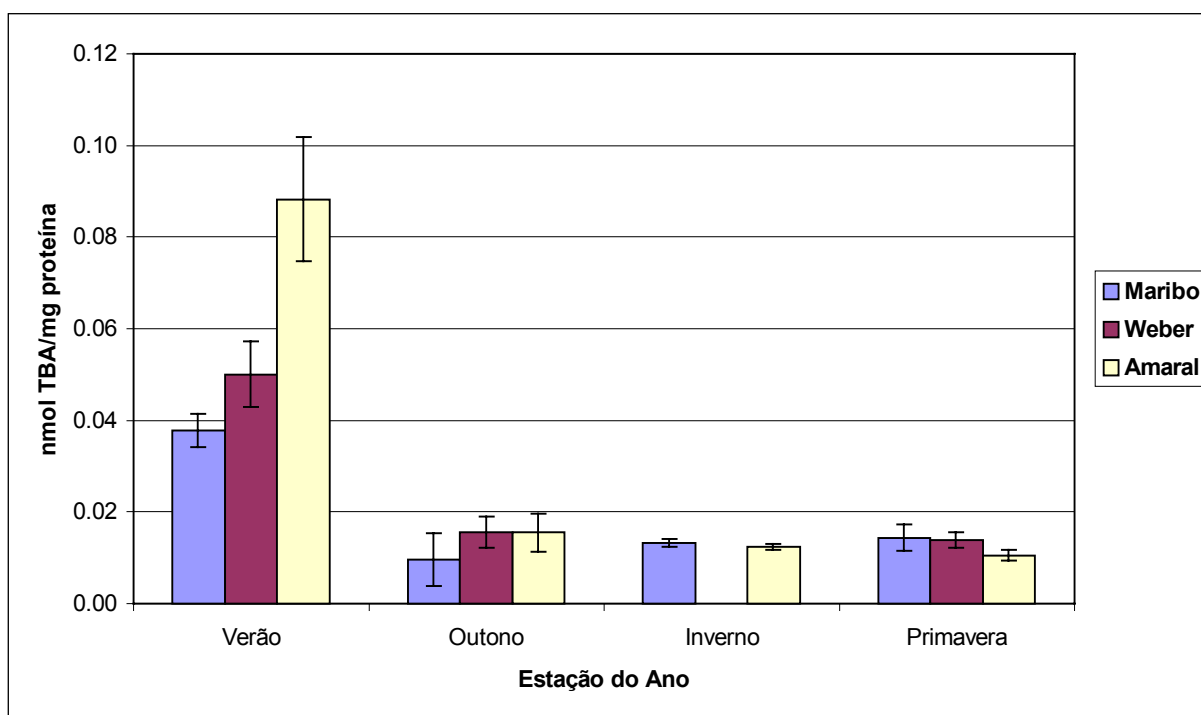


Figura 11: Índice de peroxidação de lipídios (nmol TBA.mg proteína⁻¹), em sangue de *Ctenomys minutus*, por estação do ano, nas áreas teste.

EPM = Erro Padrão Médio.

Quadro 9: Escores médios com os resultados da comparação múltipla do nível de peroxidação de lipídios, por estação do ano, no sangue de *Ctenomys minutus* nas diferentes áreas teste.

FAZENDAS	ESTAÇÕES			
	VERÃO	OUTONO	INVERNO	PRIMAVERA
MARIBO	61,75 a A	15,90 a B	35,75 a AB	27,21 a B
WEBER	65,50 a A	31,56 a B	NA	33,50 a B
AMARAL	73,57 a A	32,10 a B	30,20 a B	22,33 a B

Os Ranks seguidos pela mesma letra não diferem significativamente com um $\alpha=0,05$

- i) Letras minúsculas consideram linhas dentro das colunas (a).
- ii) Letras maiúsculas consideram colunas dentro das linhas (A).
- iii) Tabela de comparação múltipla de Kruskal Wallis Rank Test, $\alpha=0,05$ e $p < 0,0001$ (DANIEL, 1978).

Com relação aos dados obtidos pelo método de TRAP (**Figura 12**), estes não evidenciaram diferenças. Isto se deve, provavelmente, à não ocorrência de alteração nos sistemas de defesa antioxidante hidrosolúveis (glutathione oxidada/reduzida) presentes no interior das células.

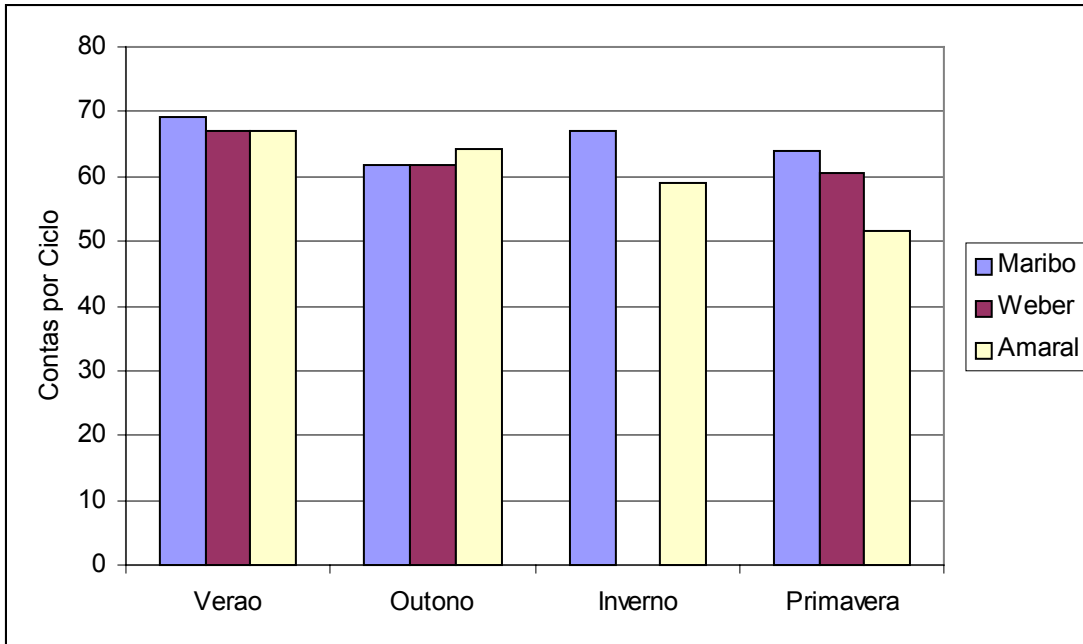


Figura 12: Total Antioxidant Rate (TAR) nos animais em cada área, por estações do ano.

5.3 Fluxo Veículos X Lipoperoxidação

A **Figura 13** apresenta a correlação linear existente entre a variável independente fluxo de veículos nas quatro estações do ano avaliadas e a variável dependente dano oxidativo TBARs.

O coeficiente de Pearson (r) considerando todo o período avaliado apresenta o valor de 0,667, indicando uma correlação positiva, ou seja, quanto maior o fluxo de veículos maior o dano oxidativo. Já para a situação de Verão o coeficiente de Pearson (r) apresenta o valor de 0,836, indicando ser este o período de correlação entre o dano oxidativo e o fluxo de veículos, pois para as demais estações a correlação é nula. Os níveis de lipoperoxidação podem ser correlacionados à carga poluente relativa à época de maior fluxo de veículos

anterior à semana da coleta.

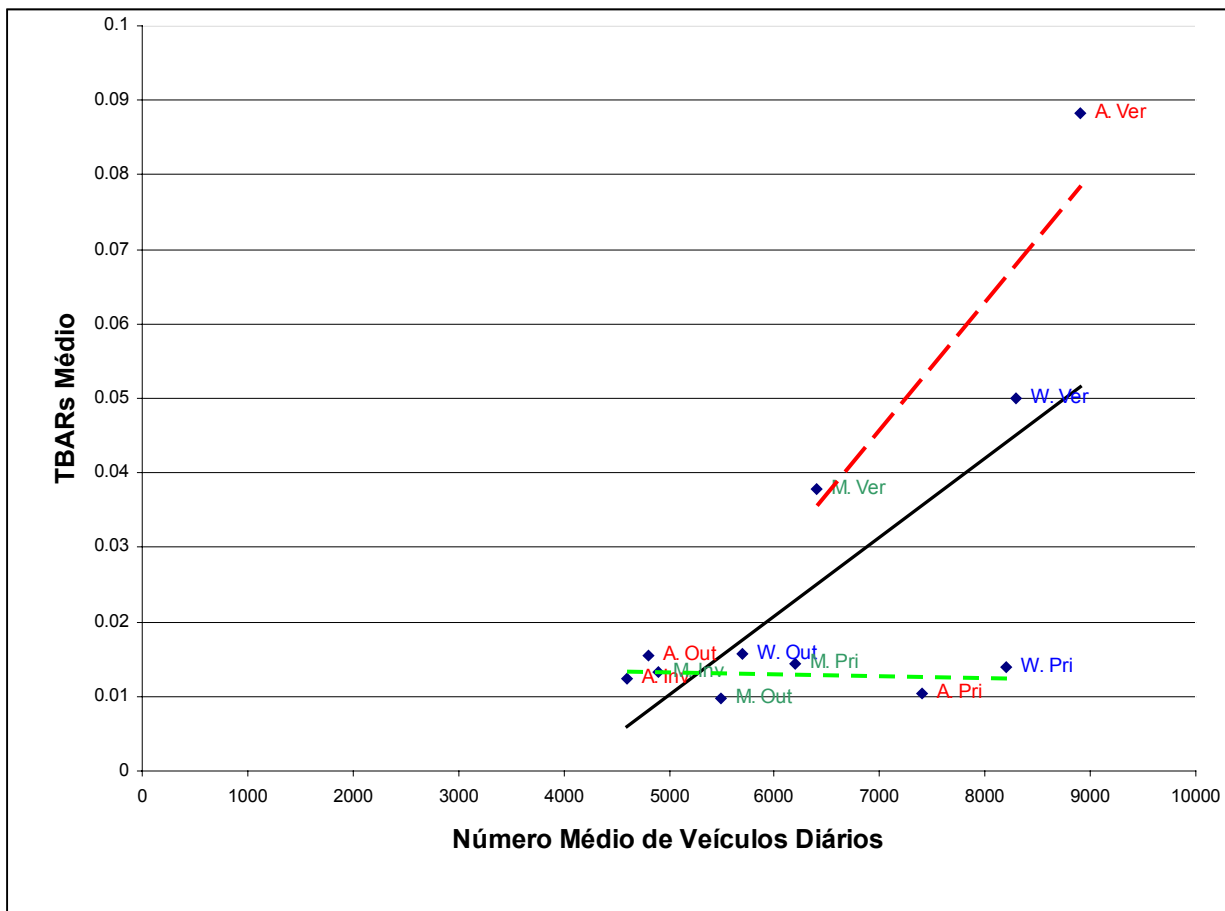


Figura 13: Gráfico de Correlação:

—	Coefficiente de Pearson considerando todas as estações	$r = 0,667$ e $\alpha = 0,05$
- - -	Coefficiente de Pearson apenas para o Verão	$r = 0,836$
- - -	Coefficiente de Pearson exceto Verão	$r = -0,136$

Para os pontos Weber e Amaral no período da Primavera cabe ressaltar que a amostragem foi realizada no final do mês de Novembro, época que se inicia o aumento do fluxo de veículos e que o ambiente provavelmente ainda tinha uma capacidade de assimilar e dispersar a carga poluente não evidenciando dano oxidativo em lipídios.

Desta forma, pelo exposto, os níveis aumentados de lipoperóxidos medidos

no sangue de *Ctenomys minutus* e expressos por TBARs (**Figura 11**), sugerem ser este um potencial e promissor parâmetro de bioindicação ambiental.

Como há diferença nos níveis de TBARs e sabendo-se que existe apenas um desbalanço no sistemas glutaciona dependentes, considera-se que os danos nestes animais ocorrem principalmente nas membranas celulares.

6 Considerações Finais

Baseados nos resultados obtidos, concluímos que:

1 A quantificação e análise da concentração dos metais nos compartimentos ambientais, principalmente em Pêlos, ao longo do ano sugerem que existem dois momentos diferenciados em relação à presença de Cd, Ni e Zn nos compartimentos amostrados: Inverno/Primavera e Verão/Outono;

2 A quantificação e análise dos metais nos compartimentos ambientais das três áreas, mostra claramente que existe diferença significativa entre os locais mais próximos à estrada (Amaral e Weber) em relação à área controle (Maribo) mais distante da mesma;

3 O compartimento ambiental Solo mostrou diferenças significativas entre as três áreas avaliadas (distância da estrada), para os metais Pb, Ni e Zn;

4 Os compartimentos Solo e Vegetação indicaram que a área Maribo apresenta tendência diferenciada em relação às outras duas áreas, quando avaliado o conjunto da carga de metais presentes;

5 Com relação ao teste bioquímico para TBARs, existe uma tendência diferente entre as áreas avaliadas. No Verão, observamos um comportamento

diferenciado com relação à proximidade da estrada, tendo os animais das áreas mais próximas à estrada um maior nível de dano;

6 O teste bioquímico para TBARs, indicou forte diferença sazonal, sendo que no Verão o índice de dano obtido foi maior nas três áreas avaliadas;

7 As avaliações bioquímicas empregadas foram mais sensíveis que a quantificação de metais para indicar dano recente nos tuco-tucos, salientando as diferenças entre as três áreas avaliadas com diferente impacto de tráfego.

7 Conclusão

Ctenomys minutus, mostrou-se como um bom indicador da qualidade ambiental, salientando que alguns ajustes à metodologia dos testes bioquímicos são necessários.

Os testes bioquímicos mostraram-se bastante eficientes, os resultados podem ser conhecidos em poucas horas, com maior clareza e com um custo inferior à análise de metais e podem ser usados como um teste adicional na avaliação de impacto ambiental.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANO, E., BELLOMO, G. *Biochimica et Biophysica Acta* 1091, 310-316. 1991.
- ALLEN, S.E. *Chemical Analysis of Ecological Materials*. 2. ed. London: Blacwel Scientific Publications, 1989. 368 p.
- BENEDETTI, A., COMPORTI, M., ESTERBAUER, H. *Biochimica et Biophysica Acta* 620, 281-296. 1980.
- BIELSKI, B. H., ARUDI, R. L., SUTHERLAND, M. W. *The Journal of Biological Chemistry* 258, 4759-4761. 1983.
- BOWEN, H. J. M. *Environmental Chemistry of the Elements*. London. 1979.
- BRANCO, S. *Poluição do Ar*. São Paulo. Ed. Moderna. 1997.
- BROOKS, R.R., CHAMBERS, M.F., NICKS, L.J., ROBINSON, B.H. *Phytomining. Trends in Plant Science*, 3: 359-361. 1998.
- DALL PIZZOL, F. *Estresse Oxidativo e Suplementação com Retinol em Células de Sertoli Cultivadas*. Tese de Doutorado. UFRGS. 2001.
- DANIEL, W.W. *Applied Nonparametric Statistics*. Boston: Houghton Mifflin. 1978.
- ESTEVEZ, F. A. *Fundamentos de Limnologia*. Rio de Janeiro, Interciência. 1988.
- FRAGA, C. G. *Biochem. J.* 252, 893-896. 1988.
- FREITAS, T. R. O. Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 30: 53-59. 1995.
- GOLTERMAN, H. L. *Physiological Limnology – Na Approach to the Physiology of Lake Ecosystems*. Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Company. 1975.
- HADNAGY, W.; SEEMAYER, N.H. Citotoxic and Genotoxic effects of extract of particulate emission from a gasoline-powered engine. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 12: 385-396. 1988.
- HALLIWELL, B., ARUOMA, O. *DNA and Free Radicals*, ed. Ellis Horwood 1997.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. *Biochem. J.* 219, 1-14. 1984.

- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. Third edition. Oxford Science Publications. 1999.
- HASENACK, H., FERRARO, L.W. Considerações sobre o clima da região de Tramandaí, RS. *Pesquisas* 22. 53-70. 1989.
- HEUSER, V. D. Avaliação da Genotoxicidade Induzida por Emissões de Veículos Automotores – *Ctenomys minutus* como Bioindicador. Dissertação de Mestrado. UFRGS. 2001.
- LONNROT, K., METSA-KETELA, T., MOLNAR, G., AHONEN, J., LATVALA, M., PELTOLA, J., PIETILA, T. and ALHO, H. The Effect of Ascorbate and Ubiquinone Supplementation on Plasma and CSF Total Antioxidant Capacity. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(2), 211-217. 1996.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, A. L. and RANDALL, R. J. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275. 1951.
- MATÉS, J.M., PÉREZ-GÓMEZ, C. and DE CASTRO, I.G. *Clinical Biochemistry*, 32(8):595-603. 1999.
- MINISSI, S.; LOMBI, E. Heavy Metal Content and Mutagenic Activity, Evaluated by *Vicia faba* Micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutation Res.* 393: 17-21. 1997.
- NRIAGU, J. O. A Silent Epidemic of Environmental Metal Poisoning? *Environmental Pollution*, v.50 p.139-161. 1988.
- PERKIN-ELMER. *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy*. nº. 332. West Germany, 1982.
- RAYA-RODRIGUEZ, M. T. Efeito de Metais Pesados em Plantas: □- Aminolevulinato Deidratase em *Ricinus comunis*. Dissertação de Mestrado. UFRGS. 1986.
- ROJAS, E.; VALVERDE, M.; SORDO, M.; ALTAMIRANO-LOZANO, M.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Single gel cells electrophoresis assay in the evaluation of metal carcinogenicity. In: *Metals Ions in Biology and Medicine*. COLLERY, P., CORBELLA, J., DOMINGO, J. L., ETIENNE, J-C., LLOBET, J. M. eds.). John Libbey Eurotext, Spain, pp. 375-377. 1996.
- SELMAN, C; McLAREN, J. S.; HIMANKA, M. J.; SPEAKMAN, J. R. Effect of long-term cold exposure on antioxidant enzyme activities in a small mammal. *Free Radicals and Medicine*. 28: 1279-1285. 2000.
- SILVA, J. Biomonitoramento de Regiões Mineradoras de Carvão do Rio Grande do Sul - Avaliação da Genotoxicidade Através de Roedores Nativos. Tese de Doutorado. UFRGS. 1999.
- STOIAN, I., OROS, A., MOLDOVEANU, E. *Biochemical and Molecular Medicine* 59, 93-97. 1996.

- STRAHLER, A. N.** Geografia Física. Barcelona, Omega. 1977.
- TALMAGE, S.S and WALTON, B.T.,** Small Mammals as Monitors of Environmental Contaminants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* 119: 47-145. 1991
- VARGHA, B., ÖTVÖS, E. and TUBA, Z.** Investigations on Ecological Effects of Heavy Metal Pollution in Hungary by Moss-Dwelling Water Bears (*Tartigrada*), as Bioindicators. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.* 9: 141-146. 2002.
- VILLWOCK, J.A.** Geology of the coastal province of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. A synthesis. Porto Alegre. *Pesquisas,* 16: 5-49. 1984.
- WALDEMARIN, H. F.** Análise da Contaminação da Lontra (*Lontra Longicaudis*) por Metais Pesados em uma Unidade de Conservação e uma Área com Forte Influência Antrópica. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ecologia, UFRGS. 1999.
- WITTMANN, G. T. W.** Toxic Metals. In: FORSTNER, U. WITTMANN, G. T. W. *Metal Pollution in the aquatic environment.* Second edition. Berlin, Springer-Verlag, Cap. B. 1981.
- ZWART, L. L.; MEERMAN, J. N. H.; COMMANDEUR, J. M. N.; VERMEULEN, N. P. E.** Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radicals and Medicine.* 26: 202-226. 1999.