



MARCEL JOSÉ PALMIERI

**ANÁLISE COMPARATIVA DO EFEITO
CITOTÓXICO DO *SPENT POT LINER (SPL)* E
SEUS PRINCIPAIS COMPONENTES
FRACIONAIS EM CÉLULAS VEGETAIS E
HUMANAS**

LAVRAS-MG

2012

MARCEL JOSÉ PALMIERI

**ANÁLISE COMPARATIVA DO EFEITO CITOTÓXICO DO *SPENT POT
LINER (SPL)* E SEUS PRINCIPAIS COMPONENTES FRACIONAIS EM
CÉLULAS VEGETAIS E HUMANAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Citogenética para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Lisete Chamma Davide

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Palmieri, Marcel José.

Análise comparativa do efeito citotóxico do Spent Pot Liner (SPL) e seus principais componentes fracionais em células vegetais e humanas / Marcel José Palmieri. – Lavras : UFLA, 2012.

118 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Lisete Chamma Davide.

Bibliografia.

1. Citogenética. 2. Toxicidade. 3. Resíduo químico. 4. Poluição.
5. Ensaio cometa. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 574.87322

MARCEL JOSÉ PALMIERI

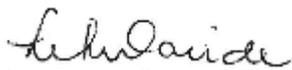
**ANÁLISE COMPARATIVA DO EFEITO CITOTÓXICO DO *SPENT POT
LINER (SPL)* E SEUS PRINCIPAIS COMPONENTES FRACIONAIS EM
CÉLULAS VEGETAIS E HUMANAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Citogenética para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2012.

Dra. Silvana Marcussi

Dra. Vânia Helena Techio


Dra. Lisete Chamma Davide
Orientadora

LAVRAS - MG

2012

Dedico este trabalho ao meu irmão Breno e aos meus pais José Antônio e Maria José que estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando durante toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

A todo pessoal do laboratório de Citogenética da UFLA com quem a conversa sempre torna um dia de trabalho mais prazeroso.

Aos meus professores sempre pacientes e dispostos a me ensinar.

A minha orientadora Lisete, a quem tenho profunda admiração e respeito.

A minha coorientadora Larissa, que me ensinou, de fato, o significado do que é ser um Citogeneticista.

Às professoras Giovana e Vânia, que mesmo não sendo oficialmente minhas orientadoras me orientam mesmo assim, sempre aptas a ajudar.

À Iara, técnica do laboratório, que sempre sabe onde as coisas que preciso estão guardadas.

À Jaqueline Luber e Gabriela Lima, que me ajudaram deveras e foram fundamentais na conclusão deste trabalho.

À professora Silvana Marcussi e toda equipe do Laboratório de Bioquímica da UFLA, que me abriram as portas e ofereceram ajuda permitindo que eu desempenhasse meu trabalho.

Ao Pós-graduando Felipe Moreira, a professora Zuy Magriotis e toda equipe do Laboratório de Resíduos da UFLA, que foram extremamente prestativos.

À secretária da genética, Helô, que está sempre pronta para ajudar os Pós-Graduandos perdidos.

A minha família que sempre me apoia incondicionalmente em minhas decisões.

À instituição CAPES pela bolsa de estudo que financiou meu mestrado.

À Universidade Federal de Lavras, instituição que me acolhe já há seis anos.

RESUMO

O *SPL* é um resíduo tóxico da produção de alumínio formado por uma mistura de substâncias, e tem como seus principais componentes: sais de fluoreto e cianeto e o alumínio. Mundialmente é produzido cerca de 1 milhão de toneladas desse resíduo por ano. Ele representa, portanto, um grave risco ambiental. Testes biológicos e químicos são excelentes ferramentas para estudar os mecanismos de toxicidade de resíduos químicos sólidos. Dentro desse contexto o presente trabalho visou compreender os mecanismos de toxicidade do *SPL* através de sua prospecção química e estudo comparativo da ação dos seus principais componentes fracionais. Observou-se que os principais componentes do *SPL* são encontrados no resíduo em concentrações muito elevadas. O alumínio está relacionado fortemente com a capacidade do resíduo de provocar retardamento e inibição no enraizamento de vegetais, o cianeto mostrou grande capacidade de induzir alterações cromossômicas e o fluoreto provoca alta taxa de quebras no material genético induzindo morte celular. A toxicidade do *SPL* como um todo, no entanto, não pode ser atribuída a nenhum desses compostos separadamente e deve ser vista como o resultado da ação sinérgica deles.

Palavras-chave: *SPL*. Toxicidade. Citogenética. Resíduo Químico.

ABSTRACT

SPL is a toxic waste from the aluminum production, its formed by a mixture of substances and has as its main chemical components fluoride and cyanide salts and aluminum. Every year around 1 million tons of *SPL* are produced worldwide. This waste represents, therefore, a serious environmental risk. Biological and chemical assays are excellent to study the toxicity of chemical solid wastes. With this in mind the present study aimed to understand the toxicity of *SPL* through its chemical prospection and comparative analysis of its main components. It was observed that the main components of *SPL* are found on very high concentrations. The aluminum is strongly related with the root growth and seed germination inhibitory capacity of the waste. Cyanide displayed a high capacity of chromosome aberration induction and fluoride provoked a very high rate of DNA damage inducing cell death. However, the *SPL* toxicity as whole can't be assigned to any of its components individually, this toxicity is the result of the synergistic action of all the *SPL*'s components.

Keywords: *SPL*. Toxicity. Cytogenetic. Chemical Residue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 *Scores* de dano baseados no tamanho da cauda do cometa observado em hemócitos de *Biomphalaria glabrata*..... 31

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- Figura 1 Difratoograma do *SPL*. Eixo X – ângulo de incidência. Eixo Y- Intensidade de difração..... 55
- Figura 2 termograma do *SPL* com sua respectiva curva termogravimétrica (curva superior) e derivada termogravimétrica (curva inferior)..... 56
- Figura 3 Espectro de FTIR do *SPL*..... 57
- Figura 4 Espectro de FTIR do lixiviado do *SPL*..... 59
- Figura 5 Curva de regressão linear para os valores médios de comprimento das raízes germinadas..... 62

ARTIGO 2

- Figura 1 Alterações cromossômicas encontradas nos diversos tratamentos... 88

ARTIGO 3

- Figura 1 Exemplos de cometas observados. 110

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1 Análise do Lixiviado do *SPL*..... 58

Tabela 2 Ensaio de Germinação e Crescimento Radicular 61

ARTIGO 2

Tabela 1 Unidades (mg/L) de Fluoreto Cianeto e Alumínio Presentes nas
Concentração de *SPL* testadas 84

Tabela 2 Índice Mitótico (IM) médio e média por lâmina do número de
Alterações Cromossômicas (AC) e Núcleos Condensados (NC)
para cada tratamento..... 86

Tabela 3 Porcentagem das alterações observadas em relação ao total de
alterações encontradas para cada elemento testado 87

ARTIGO 3

Tabela 1 Dano observado em linfócitos humanos após os diferentes
tratamentos 109

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	SPL e seus Principais Componentes	15
2.2	Importância dos Estudos de Toxicidade	19
2.3	Bioensaios em Vegetais Superiores	20
2.4	Testes de Germinação e Crescimento Radicular	23
2.5	Avaliações Citogenéticas Clássicas	25
2.6	Ensaio Cometa	29
	REFERÊNCIAS	32
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	45
	ARTIGO 1 Prospecção do potencial toxicológico do <i>Spent Pot Liner (SPL)</i>	45
1	INTRODUÇÃO	48
2	MATERIAL E METODOS	51
2.1	Análises Químicas	51
2.1.1	Difração de raios-X	51
2.1.2	Análise Térmica	51
2.1.3	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	52
2.1.4	Lixiviação	52
2.2	Análise Fitotóxica	53
2.2.1	Preparação das soluções	53
2.2.2	Ensaio de germinação e crescimento radicular	53
3	RESULTADOS	55
3.1	Prospecção Química	55
3.1.1	Difração de Raios-X	55
3.1.2	Análise Térmica	56
3.1.3	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	57
3.1.4	Lixiviação	58
3.2	Ensaio de Germinação e Crescimento Radicular	59
4	DISCUSSÃO	63
5	CONCLUSÃO	69

REFERÊNCIAS	70
ARTIGO 2 Avaliação citotóxica comparativa dos principais componentes químicos do <i>Spent Pot Liner (SPL)</i>.....	76
1 INTRODUÇÃO	79
2 MATERIAL E MÉTODOS	81
2.1 Análise de Composição Química de Soluções do <i>SPL</i> para os seus Principais Componentes.....	81
2.1.1 Preparação das Soluções.....	81
2.1.2 Análise de Composição Química das Soluções de <i>SPL</i> para Fluoreto, Cianeto e Alumínio	82
2.2 Análise de Ciclo Celular	82
2.2.1 Tratamento das Raízes.....	82
2.2.2 Análise de Citotoxicidade.....	83
3 RESULTADOS	84
3.1 Análise de Composição Química das Soluções de <i>SPL</i> para Fuoreto, Cianeto e Alumínio.....	84
3.2 Análises de Ciclo Celular	85
4 DISCUSSÃO	89
5 CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS	95
ARTIGO 3 Danos ao DNA de linfócitos humanos devido à ação do <i>Spent Pot Liner (SPL)</i> e seus principais componentes	100
1 INTRODUÇÃO	103
2 MATERIAL E MÉTODOS	105
2.1 Preparação das Soluções	105
2.2 Ensaio Cometa	105
2.2.1 Preparo da Solução de Lise.....	105
2.2.2 Preparo da Solução de Neutralização	106
2.2.3 Preparo da Solução de Eletroforese.....	106
2.2.4 Preparo das Lâminas.....	106
2.2.5 Eletroforese	107
2.2.6 Coloração e Avaliação das Lâminas	107
2.2.7 Análises Estatísticas.....	108
3 RESULTADOS	109
4 DISCUSSÃO	111
5 CONCLUSÃO.....	114
REFERÊNCIAS	115

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Quantidades massivas de poluentes são lançadas no ambiente todos os anos, dentre eles dá-se destaque aos resíduos industriais. Apesar das indústrias serem indispensáveis para o desenvolvimento da economia mundial, elas tem grande potencial para gerar resíduos perigosos. Em geral esses resíduos contêm misturas complexas de químicos que contaminam o solo e as fontes de água potável (CHANDRA et al., 2005; DEWHURST et al., 2002; MUMTAZ, 1995), comprometendo a saúde humana por induzir alterações genéticas (RANK; NIELSEN, 1994).

A grande diversidade das atividades industriais ocasiona, durante o processo produtivo, a geração de resíduos sólidos, líquidos e gasosos, os quais podem contaminar o solo, a água e o ar. Há resíduos pouco expressivos, no que diz respeito à toxicidade, e outros que podem ser nocivos e perigosos para o ambiente. Esses resíduos são os mais variáveis possíveis, incluindo substâncias simples ou compostas formadas pela mistura de várias substâncias tóxicas, apresentando complexos mecanismos de ação. Um exemplo é o *SPL (Spent Pot Liner)*, um resíduo sólido da indústria do alumínio gerado durante o processo de eletrólise que ocorre nas cubas de redução da alumina (SILVEIRA et al., 2003). Esse resíduo é formado por uma mistura de substâncias dentre as quais, sais de cianeto, fluoreto e alumínio são considerados os mais nocivos e de maior potencial poluidor (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008; SILVEIRA et al., 2003). Essas substâncias são todas comprovadamente tóxicas, podendo ocasionar uma série de distúrbios tanto em humanos e animais como em vegetais (BARBIER; MENDOZA; RASO, 2010; TASSIST et al., 2010; ZIMMERMAN et al., 2007).

O *SPL* consiste de tijolos refratários e catodos carbonáceos que se encontram esgotados em sua função nas cubas. No Brasil é considerado um problema ambiental devido à produção de cerca de 20.000 toneladas para cada 1000 toneladas de alumínio primário produzidas por ano no país, isto é, especialmente preocupante quando considera-se que desde os anos 90 o Brasil produz mais de 1 milhão de toneladas de alumínio primário por ano e em 2007 essa produção chegou a 1,6 milhão de toneladas (BRASIL, 2009). O *SPL* é um resíduo classificado como tóxico pela *USEPA (United States Environmental Protection Agency)* (SILVEIRA et al., 2003). Além disso, o *SPL* pode se lixiviar e contaminar corpos d'água e plantações representando, portanto um risco para os humanos, além de poder contaminar ecossistemas representando um grave risco ecológico (CHANDRA et al., 2005).

Existe uma série de trabalhos abordando a toxicidade do *SPL*, no entanto a maneira como os diversos componentes deste interagem e contribuem para os mecanismos de toxicidade do composto nunca foi elucidada. O objetivo deste trabalho é analisar comparativamente os efeitos citotóxicos dos principais componentes do *SPL* através de diversos bioensaios.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *SPL* e seus Principais Componentes

O *Spent Pot Liner (SPL)* é um resíduo sólido da produção de alumínio formado por uma série de substância que se acumula nas cubas de redução da alumina durante os processos de purificação e refino da bauxita (SILVEIRA et al., 2002). Estimas-se que cerca de 1 milhão de toneladas desse resíduo seja produzido anualmente no mundo (LISBONA; STEEL, 2008).

Esse composto é comprovadamente tóxico, provocando redução significativa no índice mitótico, no crescimento radicular e retardo no enraizamento de sementes de modelos vegetais testados (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008; ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010). Além disso, foram observadas anormalidades no ciclo celular e na alta frequência de núcleos condensados, este último é um dos principais marcadores citológicos de morte celular programada (DANON et al., 2000). Outras características de morte celular programada como fragmentação do DNA, condensação da cromatina e distúrbios enzimáticos foram demonstradas (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008; ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011).

Entre os diversos compostos que constituem o *SPL*, três são apontados como os principais agentes de sua toxicidade, sais de cianeto, fluoreto e o alumínio (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008; SILVEIRA et al., 2003).

O alumínio (Al^{3+}) é conhecido por afetar diversos processos fisiológicos e celulares nas plantas, suas ligações são fortes e difíceis de serem desfeitas (CHAPUIS; FAVIER, 1999). Ele pode se acumular nas células e formar depósitos volumosos incompatíveis com o desempenho das funções básicas celulares (GALE, 1986).

O efeito primário do alumínio é a inibição do crescimento radicular, que pode estar relacionada com a interrupção da divisão celular quando alocado no simplasto, principalmente na região meristemática (FRANTZIOS; GALATIS; APOSTOLAKOS, 2001; KOLLMEIER; FELLE; HORST, 2000; MATSUMOTO, 2000). A exposição prolongada das células ao alumínio provoca danos ao núcleo, afetando a composição do DNA, estrutura da cromatina e suas funções (SILVA et al., 2000). Além disso, o alumínio provoca danos na morfologia da raiz, afetando o desenvolvimento de pelos absorventes e, conseqüentemente, a aquisição de água e sais minerais para nutrição da planta (BARCELO; POSCHENRIEDER, 2002; CIAMPOROVA, 2002). Não obstante, a severidade da toxidez do alumínio dependerá da espécie vegetal, das condições de crescimento das mesmas, da concentração de alumínio e da duração da exposição (KOCHIAN; PIÑEROS; HOEKENGA, 2005).

Efeitos danosos do alumínio foram identificados em espécies vegetais cultivadas como feijão, arroz, trigo e milho, onde foi observada redução nas taxas de crescimento e de frutificação de culturas desenvolvidas em meio contendo esse metal. Em plantas aquáticas a presença de 0.005-0.01% de sais de alumínio provoca enfraquecimento e problemas de assimilação de nutrientes (TASSIST et al., 2010). Em humanos, intoxicação com alumínio pode estar associada à doença de *Alzheimer* e também a duas outras síndromes neurodegenerativas graves, *Parkinson* e esclerose amiotrófica lateral (CHAPUIS; FAVIER, 1999; GARRUNTO; YANAGIHARA; GAJDUSEK, 1990).

O íon fluoreto é derivado do elemento flúor, um gás que não ocorre em sua forma livre na natureza. Esse íon é abundante no ambiente existindo em combinação com diversos outros elementos, normalmente constituindo minerais em rochas e solos. O fluoreto está, portanto, associado à atividade vulcânica (BARBIER; MENDOZA; RASO, 2010).

Fontes de fluoreto incluem alimentos, água fluorada, pastas de dente entre outros. Para os humanos a principal fonte de ingestão de fluoreto é através de lençóis subterrâneos de água contaminados por depósitos geológicos. Exposição excessiva e prolongada ao fluoreto pode levar a um problema sério conhecido como fluorose. Os principais sintomas da fluorose são manchas dentárias e deformidades esqueléticas. Isso ocorre devido à ação desse íon sobre as células ósseas (osteoblastos e osteoclastos). Adicionalmente, já foi relatada a ação do fluoreto sobre células de tecidos moles, como nos rins, sistema nervoso e gônadas (NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC, 2006).

O mecanismo de ação tóxica do fluoreto nos vegetais não é conhecido (FRANZARING; KLUMPP; FANGMEIER, 2007), no entanto, ele pode ser acumulado nestes causando danos que vão desde alterações metabólicas, lesões foliares, redução no crescimento e desenvolvimento, até prejuízos no ecossistema como um todo. Nas folhas, por onde é absorvido da atmosfera pelas plantas, pode ser observada a necrose como principal sintoma de toxidez ao flúor (ABDALLAH et al., 2006).

O cianeto é um contaminante comum do solo e em geral é encontrado associado com gás manufacturado, plantas condutoras de elétrons e em minas de metais preciosos, sendo conhecido por ser tóxico a todos os organismos. Nos locais onde é encontrado, ele está associado a compostos férricos, apesar destas formas serem menos tóxicas do que o cianeto livre (CN^-), ele ainda é perigoso, pois pode ser liberado desses compostos por fotólise (MEEUSSEN; KEIZER; DEHAAN, 1992; ZIMMERMAN et al., 2007).

Cianeto em algumas formas é uma toxina muito poderosa e de ação rápida, e quando combinado com compostos orgânicos e metais pode formar sais e compostos simples ou complexos. As formas mais comuns do cianeto são cianeto de potássio, cianeto de hidrogênio e cianeto de sódio. Todas as formas de cianeto podem ser tóxicas em altas concentrações, mas o cianeto de

hidrogênio é a mais perigosa, sendo inclusive altamente inflamável quando exposto ao calor, chamas ou agentes oxidantes (DASH; GHAUR; BALOMAJUMDER, 2009).

O cianeto faz parte de diversos caminhos metabólicos de plantas. Estudos sugerem que plantas vasculares possuem enzimas que degradam substâncias tóxicas, possibilitando que elas metabolizem o cianeto livre em solução a fim de remediar contaminações por cianeto (EBBS et al., 2003; YU; GU, 2007; YU; TRAPPS; ZHOU, 2005).

Em humanos, a exposição em curto prazo a compostos cianídricos pode causar tremores, dificuldades respiratórias e diversos outros sintomas neurológicos. Já a exposição por períodos prolongados é mais perigosa podendo causar perda de peso, danificação de células nervosas, problemas tireoidianos podendo levar à morte. Irritações e feridas podem ser causadas por contato direto com líquidos contendo cianeto em solução (DASH; GHAUR; BALOMAJUMDER, 2009).

A relação que essas substâncias possuem com o solo e com os organismos interessa muito no que se refere ao comportamento do *SPL*. Existe um risco real delas lixiviarem e contaminarem fontes de água potável, plantações e uma diversidade de ecossistemas (CHANDRA et al., 2005). O *SPL* representa, portanto, uma ameaça para a saúde humana e a ecologia de maneira geral. Existe a possibilidade de se reciclar o *SPL*, um exemplo é através da sua reutilização como matéria-prima na indústria de cimento. No entanto, sua alta toxicidade faz com que as indústrias devam utilizar esse material em seus produtos, logo se faz necessário que técnicas mais viáveis de se lidar com o *SPL* sejam desenvolvidas (SILVEIRA et al., 2002).

2.2 Importância dos Estudos de Toxicidade

Dejetos sólidos constituem um problema emergente e importante, cuja produção mundial por pessoa por dia estimada varia de 0,5 até 4,5 kg (BAKARE; MOSURO; OSIBANJO, 2005). Além desses dejetos deve-se considerar também a produção industrial de resíduos sólidos, como o *SPL*, para poder-se notar a real magnitude do problema. Aterros sanitários e incineradores são, até hoje, a maneira mais comum de se lidar com essa situação havendo uma predominância grande de aterros, principalmente em se tratando de dejetos urbanos (EL-FADEL; FINDIKAKIS; LECKIE, 1997).

O lixo mantido em aterros pode sofrer lixiviação devido à ação de água da chuva ou de percolação. A composição do lixiviado pode variar ao longo de um aterro e entre aterros dependendo do grau de degradação dos resíduos lá contidos e da natureza destes (KJELDSEN et al., 2002).

Devido ao potencial tóxico apresentado por esses lixiviados nos últimos 20 anos tem se desenvolvido e se tornado cada vez mais importantes técnicas para avaliação dos efeitos ecotoxicológicos e toxicológicos destes (BADERNA et al., 2011). Essas técnicas envolvem testes tanto biológicos quanto à determinação da composição química do lixiviado e do resíduo do qual este se origina para que se possa ter uma real dimensão dos riscos apresentados ao ambiente.

No Brasil as normas federais classificam um composto quanto à sua toxicidade com base nos seus constituintes químicos e em testes de solubilidade e de lixiviação (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT, 2004). Os Estados Unidos seguem um método de classificação semelhante ao brasileiro, enquanto a União Europeia adota uma série de diretrizes muito mais complexas, incluindo o potencial ecotoxicológico do

composto, o que não é levado em conta pelos outros dois países citados, para determinação de risco tóxico de um composto (ON ORGANIC..., 1991).

2.3 Bioensaios em Vegetais Superiores

Dentre os danos causados por agentes químicos, efeitos genotóxicos e mutagênicos são os mais problemáticos, devido à sua capacidade de induzir defeitos genéticos que podem ser prejudiciais à saúde. Esse tipo de defeito se torna ainda mais preocupante quando se considera que ele pode ser transmitido, hereditariamente, para gerações futuras. Em função disso, é preciso avaliar a toxicidade de produtos que são lançados no ambiente, e para tanto, se fazem necessários testes eficientes e confiáveis. De acordo com Grant (1994), testes biológicos para toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para avaliação de reações de organismos vivos à poluição ambiental.

Os vegetais constituem um importante sistema bioindicador de poluição, pois permitem avaliar os efeitos de tóxicos e agentes mutagênicos presentes em seu ambiente natural (SANDALIO et al., 2001). Ademais, os bioensaios vegetais detectam danos genéticos, respondendo em nível de DNA, cromossômico e genômico (MALUSZYNSKA; JUCHIMIUK, 2005).

Já há muito tempo as plantas têm sido utilizadas como indicadores de toxicidade em eucariotos superiores. Sistemas vegetais quando sobre ação tóxica apresentam uma série de alterações que podem ser analisadas, como alterações na estrutura cromossômica, variações na ploidia e danos à estrutura da molécula de DNA (KUMARI et al., 2011).

Leme e Marin-Morales (2009) definem os vegetais superiores como ótimos modelos genéticos para avaliar poluentes ambientais. Eles apresentam alta sensibilidade a agentes mutagênicos em diversos ambientes e permitem a análise simultânea de vários mecanismos de ação, englobando desde mutações

pontuais até aberrações cromossômicas em células de diferentes órgãos e tecidos, como pólen, raiz e folhas.

Grant (1994) destaca também a alta sensibilidade dos bioensaios com esses organismos e adiciona que eles raramente dão resultados falsos e são, portanto, muito confiáveis e ótimos candidatos para programas de monitoramento de genotoxicidade. Fiskesjö (1985) também aponta vantagens para esse sistema de teste. O autor afirma que esses bioensaios são muito baratos, além disso, os cromossomos de vegetais superiores são grandes e de fácil visualização sendo, portanto, muito bons para análises citológicas. Esses bioensaios têm boa correlação com outros modelos inclusive modelos animais, o que permite que os resultados sejam extrapolados para seres humanos e animais de maneira geral.

São vários os vegetais utilizados como modelo, *Lactuca sativa*, *Zea mays*, *Tradescantia* e *Vicia faba* são alguns exemplos. No entanto o modelo mais amplamente empregado é o *Allium cepa* (cebola). A cebola mostrou-se um ótimo bioindicador para evidenciar o efeito tóxico do SPL (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008). Adicionalmente, estudos que compararam o teste do *Allium* com modelos animais mostraram que o *Allium* apresenta sensibilidade similar aos testes realizados em linfócitos humanos (FISKEJÖ, 1985), além de ter alta correlação com ensaios em roedores, sendo mais sensível que o teste de Ames (RANK; NIELSEN, 1994). Ademais, estudos de sensibilidade com plantas mostraram que *Allium cepa* é mais sensível que outras espécies, como por exemplo, *Vicia faba* (MA et al., 1995; MIGID; AZAB; IBRAHIM, 2007).

Esse vegetal é um dos organismos pioneiros usado para detectar o efeito de químicos nos cromossomos através de estudos citogenéticos. O teste foi desenvolvido por Levan em 1978 e tem sido recomendado pela *Environmental Protection Agency (US EPA)* na avaliação de toxicidade e genotoxicidade de efluentes industriais (FISKEJÖ, 1993; GRANT, 1994; MITTEREGGER et al.,

2007). Consiste em um teste simples, rápido e sensível, amplamente utilizado no biomonitoramento de contaminantes ambientais (KEIGHTLEY et al., 1996; KUPIDŁOWSKA et al., 1994; MAJEWSKA et al., 2003; PODBIELKOWSKA et al., 1995; PODBIELKOWSKA; WALEZA; ZOBEL, 1981), além de permitir a investigação dos mecanismos envolvidos na resposta das células radiculares à tratamentos com resíduos tóxicos complexos (KURÁS et al., 2006).

Desse modo, o *Allium cepa* é um ótimo modelo para estudos de citotoxicidade, pois: a) o material de propágulo pode ser adquirido durante o ano todo; b) as células meristemáticas são homogêneas e c) seus cromossomos ($2n=2x=16$) são longos, visíveis e coram facilmente, permitindo a análise de alterações cromossômicas (DEMARINI, 1991; FISKESJÖ, 1993; LEME; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008).

Alguns trabalhos recentes que fazem uso do bioensaio são: Andrade, Campos e Davide (2008), Caritá e Marin-Morales (2008), Saxena, Gupta e Murthy (2010), Yildiz et al. (2009), entre outros. Nesses trabalhos foi avaliada a citogenotoxicidade de resíduos industriais, pesticidas e produtos químicos.

Outro bioindicador muito utilizado em testes de toxicidade é a alface (*Lactuca sativa*), comumente empregada em estudos de alelopatia (CAMPOS et al., 2008). Devido à sua rápida germinação é muito útil quando empregada em ensaio de germinação e crescimento radicular, sendo muito eficiente para indicar efeitos tóxicos de poluentes encontrados em solos (VALERIO; GARCIA; PEINADO, 2007).

Segundo Campos et al. (2008), o uso da alface como modelo para bioensaios citogenéticos é bastante plausível, uma vez que a alface apresenta grande número de sementes, grande área de contato com as soluções dos reagentes testados, alta sensibilidade e cromossomos grandes.

Bioensaios utilizando-se da alface como modelo são considerados eficientes para avaliar potenciais riscos ambientais de compostos tóxicos

(GOPALAN, 1999). A alface está entre os dez modelos vegetais considerados adequados pela Agência de Proteção Ambiental Norte Americana para avaliação dos impactos ecológicos de substâncias tóxicas (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – US EPA, 1996). Outras organizações como a ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARDIZATION, 1995) também consideram a *Lactuca sativa* como modelo para testes de toxicidade.

Um trabalho recente de Andrade, Davide e Gedraite (2010) faz uso da *Lactuca sativa* em bioensaios citogenéticos e de germinação de sementes a fim de avaliar os efeitos tóxicos do SPL. Neste trabalho foi comprovada a eficiência desse vegetal para ensaios de toxicidade provando a alta sensibilidade desse bem como sua aplicabilidade em testes de germinação e crescimento radicular associado ao teste de citogenética. O índice mitótico observado nos testes citogenéticos refletiu a frequência de células em divisão se mostrando um parâmetro importante na determinação da razão de crescimento radicular.

2.4 Testes de Germinação e Crescimento Radicular

Consiste em expor sementes de um modelo vegetal, comumente a alface (*Lactuca sativa*) como visto nos trabalhos de Charles et al. (2011), Koo et al. (2011) e Young et al. (2012), a um determinado agente tóxico e avaliar tanto a presença ou não de germinação como a elongação radicular. É considerado um dos testes toxicológicos mais simples para o biomonitoramento ambiental e foi desenvolvido com o intuito de avaliar o efeito de amostras de líquidos contaminados no crescimento e germinação de sementes (ARAÚJO et al., 2001; WANG; KETURI, 1990; WANG; WILLIANS, 1990).

Ensaios dessa linha com plantas vasculares são particularmente interessantes por permitirem a avaliação de efeitos adversos de um composto

tóxico na germinação e crescimento radicular ainda nas fases iniciais de desenvolvimento da semente, o que torna o processo consideravelmente mais simples e rápido (DUTKA, 1989; LEWIS, 1995). Gopalan (1999) e Valerio, Garcia e Peinado (2007) descrevem os bioensaios de germinação e crescimento radiculares como sendo simples, rápidos, confiáveis e muito baratos por não necessitarem de equipamentos de alta tecnologia.

Esse tipo de teste tem aplicação e se mostra efetivo para avaliar desde a toxicidade de resíduos inorgânicos (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010) ou orgânicos (YOUNG et al., 2012) até o efeito inibitório de radiações ionizantes (BARROS et al., 2002) e, portanto, é de grande valia sua aplicação, principalmente quando feita conjuntamente com testes citogenéticos, o que permite uma melhor e mais ampla exploração dos dados obtidos, exemplo disso pode ser observado no trabalho de Andrade, Davide e Gedraite (2010).

Esses testes são especialmente funcionais quando aplicados como indicadores de fitotoxicidade de elementos que possam ser potenciais contaminantes de solos (VALERIO; GARCIA; PEINADO, 2007), como é o caso do *SPL*.

Um parâmetro importante de se determinar com base no ensaio de crescimento radicular é o IC_{50} (Inibição de Crescimento 50%), que corresponde à concentração do agente testado em que o tamanho das raízes do modelo vegetal é 50% menor que o das raízes do tratamento controle (LIN; XING, 2007). Do ponto de vista citogenético essa concentração é altamente representativa, pois refletirá, com clareza, os efeitos tóxicos do agente testado sem que a inibição seja severa demais, o que resultaria em raízes muito frágeis e/ou pequenas demais para a montagem de lâminas para avaliação de ciclo celular.

2.5 Avaliações Citogenéticas Clássicas

A citogenética combina duas ciências separadas – citologia e genética. Ela estuda a estrutura, o número, os movimentos e a função dos cromossomos, bem como as variações dessas propriedades, relacionando todos esses fatores com a transmissão, recombinação e expressão dos genes. Também estão no escopo da citogenética pesquisas sobre a biodiversidade, estudos de melhoramento genético de plantas e animais, e até estudos de fertilidade, tanto humana como animal. Desde seu estabelecimento essa ciência se aperfeiçoou e passou a lançar mão de novas técnicas e tecnologias e é hoje de grande importância dando respaldo para diversas outras áreas dentro da genética. Uma de suas aplicações mais proeminentes é em estudos de avaliação de toxicidade de diversos compostos através da análise de ciclo celular de organismos modelo (SUMNER, 2003).

A avaliação do ciclo celular é uma ferramenta básica na citogenética que permite ao pesquisador ter acesso a uma série de informações importantes sobre a estrutura organizacional dos cromossomos de um organismo e como estes se comportam durante as diversas fases da divisão celular (GRANT, 1994).

No âmbito dos bioensaios de toxicidade essa avaliação pode detectar alterações no ciclo celular padrão devido tanto à detecção de anormalidades no índice de divisão celular, quanto pela presença de aberrações cromossômicas ou nucleares como visto nos trabalhos de Andrade, Campos e Davide (2008), Andrade, Davide e Gedraite (2010), Klančnik et al. (2011) e Kumari et al. (2011).

As aberrações cromossômicas são ótimos indicadores da presença de toxicidade. Segundo Russel (2002) aberrações cromossômicas são caracterizadas como mudanças tanto na estrutura cromossômica quanto no número cromossômico, que podem ocorrer espontaneamente ou como resultado da

exposição a agentes físicos ou químicos. Alterações cromossômicas são reconhecidas como importantes consequências de ações genotóxicas de agentes químicos (NATARAJAN, 2002).

Estudos de aberrações cromossômicas têm sido amplamente empregados, não apenas para avaliar o efeito genotóxico de diversos agentes, mas também para avaliar seus mecanismos de ação (LEME; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008). Segundo Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2007) um dos métodos mais antigos usados para avaliar efeitos mutagênicos é o teste de aberrações cromossômicas. Esse teste permite a identificação de quase todas as alterações na estrutura do cariótipo, escapando apenas aquelas não visíveis ao microscópio (MARCANO et al., 2004).

As alterações decorrentes do efeito de agentes químicos e físicos no ciclo celular são resultantes de diferentes mecanismos, envolvendo ação clastogênica e aneugênica (LEME; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008). Substâncias clastogênicas induzem quebras cromossômicas, enquanto aquelas classificadas como aneugênicas inativam a estrutura celular, como por exemplo, o aparato do fuso, levando a perdas cromossômicas (FENECH, 2000). Dessa forma, o descontrole na divisão celular pode levar a ocorrência de alterações no ciclo celular, tendo como consequência a formação de células poliploides e a eliminação do material genético resultando na formação de anomalias nucleares (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007).

Análises experimentais mostram que quebras na dupla fita de DNA é a principal lesão responsável pela formação de aberrações cromossômicas (BRYANT, 1998; NATARAJAN; OBE, 1978; OBE; JOHANNES; SCHULTE-FROHLINDE, 1992). Essas quebras ocorrem espontaneamente em frequências significativas, através de uma variedade de processos celulares e podem ser diretamente induzidas por uma série de agentes químicos ou físicos (OBE; JOHANNES; SCHULTE-FROHLINDE, 1992; PFEIFFER; GOEDECKE; OBE,

2000). As quebras no DNA podem gerar alterações estruturais cromossômicas. Alguns exemplos são: a) deficiências: perda de um segmento cromossômico; b) duplicações: segmento cromossômico é duplicado; c) inversões: envolve duas quebras cromossômicas e a reinserção do fragmento no mesmo cromossomo em sentido invertido; e d) translocações: troca de partes entre cromossomos não homólogos (SUMNER, 2003).

Já os efeitos sobre o fuso mitótico podem causar alterações no número de cromossomos, pois afetarão a segregação dos mesmos na divisão celular. Essas alterações numéricas podem ser classificadas em dois tipos: 1) Euploidias: mudanças em todo o conjunto de cromossomos e 2) Aneuploidias: mudanças em partes do conjunto cromossômico, sendo consequência da segregação anormal dos cromossomos que pode ocorrer tanto naturalmente como pela ação de agentes aneugênicos (ALBERTINI et al., 2000). Muitas dessas aberrações são irreversíveis e altamente danosas às células fazendo com que estas entrem em um processo de morte celular.

A avaliação de anormalidades nucleares conjuntamente com a avaliação de aberrações cromossômicas tem se mostrado como uma boa maneira de tornar os estudos da toxicidade de agentes químicos ainda mais precisos em relação aos seus efeitos no DNA dos organismos testes (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

De acordo com Leme, Angelis e Marin-Morales (2008), anormalidades nucleares podem surgir como consequência de aberrações cromossômicas. Essas anormalidades são caracterizadas por alterações morfológicas no núcleo interfásico e são resultados da ação tóxica de algum agente (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

O micronúcleo é provavelmente a alteração nuclear mais bem estudada, sendo um excelente indicador de toxicidade, como visto nos trabalhos de Andrade, Davide e Gedraite (2010), Caritá e Marin-Morales (2008), Hoshina e Marin-

Morales (2009), entre outros. Os micronúcleos podem ser definidos como estruturas no citoplasma contendo cromatina envolvida por uma membrana sem que haja nenhuma ligação aparente ou visível com o núcleo principal da célula (MA et al., 1995). Eles são formados pela exclusão de cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos durante a divisão celular e, portanto, sua presença indica que o agente possui atividade aneugênica ou clastogênica, uma vez que micronúcleos derivados de fragmentos cromossômicos indicam ação clastogênica, enquanto aqueles provenientes de cromossomos que tenham sido perdidos inteiros indicam ação aneugênica (FENECH, 2000; FENECH; CROTT, 2002). Micronúcleos resultam de danos não reparados ou reparados erroneamente nas células parentais durante a divisão celular, sendo facilmente observados nas células filhas como uma estrutura similar ao núcleo principal, mas de tamanho reduzido. Podem ser identificados citogeneticamente através de uma variedade de corantes de DNA e sua frequência pode ser quantificada com o uso de microscópio (MA et al., 1995).

Outros exemplos de tipos de aberrações nucleares são os brotamentos nucleares, que podem surgir devido à eliminação do excesso de material genético decorrente de um processo de poliploidização celular, os núcleos lobados e as células polinucleadas, ambos consequência de anáfases multipolares (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Segundo Leme, Angelis e Marin-Morales (2008) a presença destas duas últimas anomalias pode ser um indicador da ocorrência de morte celular.

A presença de células em processo de morte celular é outro forte indicador de ocorrência de toxicidade. Em organismos multicelulares as células se autodestroem quando sofrem danos ou como parte de seu desenvolvimento normal. Células podem tanto ser destruídas acidentalmente - “assassinadas” através de um processo conhecido como necrose celular – ou se autodestruir usando um mecanismo ativo, processo conhecido como morte celular

programada (MCP), uma espécie de “suicídio” celular, a fim de eliminar células danificadas (DANON et al., 2000).

Gichner et al. (2005) diferenciam a MCP da necrose afirmando que a MCP tem um importante papel na diferenciação de tecidos e envelhecimento podendo ocorrer também como um mecanismo de defesa em resposta a danos celulares causados por exposição a agentes tóxicos, por exemplo, ao passo que a necrose representa uma morte celular induzida, não programada e normalmente é decorrente de danos mecânicos na célula.

As principais evidências citológicas da MCP em vegetais são a condensação cromatídica e a fragmentação nuclear e celular (DANON et al., 2000). Um critério molecular que evidencia a MCP é a segmentação do DNA (*DNA laddering*) que dá à molécula um aspecto semelhante a uma escada, quando é feito a eletroforese em gel de agarose (DOORN; WOULTERING, 2005, 2010; GICHNER et al., 2005).

2.6 Ensaio Cometa

Outra técnica muito útil para detecção de danos no DNA é o ensaio cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis* – Eletroforese de Gel de Célula Única), ele é um teste altamente sensível que tem sido utilizado para detectar um amplo espectro de danos no material genético (YILDIZ et al., 2009).

O ensaio tem sua origem no trabalho de Rydberg e Johanson em 1978. Ele consiste em obter núcleos das raízes expostas ao agente tóxico que serão montados em uma lâmina contendo gel de agarose e posteriormente submetidos à eletroforese. Os núcleos correm no gel e formam figuras semelhantes a cometas (logo o nome da técnica) quando observados em microscopia de fluorescência (RITTER; KNEBEL, 2009).

O dano ao material genético é determinado pela distância de migração do DNA, bem como pela espessura e comprimento da cauda do cometa (SINGH et al., 1988). A intensidade da fluorescência da cauda pode ser levada em consideração também na avaliação do grau de danificação ao DNA (YILDIZ et al., 2009). A Figura 1 ilustra um exemplo de *scores* de cometas variando de 0 a 3 com base no tamanho da calda observada.

Essa técnica vem sendo utilizada em vários trabalhos, em sua maioria é aplicada em modelos animais utilizando-se principalmente linfócitos como modelo, como observado no trabalho de Kaur et al. (2010) e Marcussi et al. (2011). Existem também, embora menos comuns, trabalhos bem sucedidos utilizando o ensaio cometa em modelos vegetais como visto nos trabalhos de Menke et al. (2001) e Yildiz et al. (2009).

Ritter e Knebel (2009) destacam a crescente importância que esse teste vem tendo nos estudos de toxicidade e ressaltam a necessidade de se conseguir métodos mais automatizados de montagem e avaliação da técnica, uma vez que esta, atualmente, é de montagem manual e se baseia em classificação visual dos danos observados. Esse tipo de classificação pode gerar distorções nos resultados dependendo do critério empregado pelo pesquisador. Métodos de avaliação automatizados eliminariam esse problema.

Azqueta et al. (2011) chamam atenção para o fato deste ensaio ser rápido, econômico e de alta especificidade e sensibilidade. No entanto o autor alerta para a necessidade de uma padronização nos protocolos do ensaio uma vez que ocorre muita variação de laboratório para laboratório.

A gama de substâncias que o ensaio cometa permite avaliar é muito ampla, indo desde a avaliação do potencial antígenotóxico de plantas medicinais (KAUR et al., 2010) até o efeito de peçonha de serpentes (MARCUSSE et al., 2011) o que mostra que é um teste de grande utilidade em estudos de prospecção toxicológica.

Hartmann et al. (2003) mostraram que existe uma boa correlação entre os testes de avaliação de aberrações cromossômicas e o ensaio cometa, esses resultados foram de acordo com o que Giannotti et al. (2002) já haviam observado em seu trabalho.

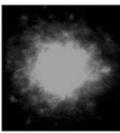
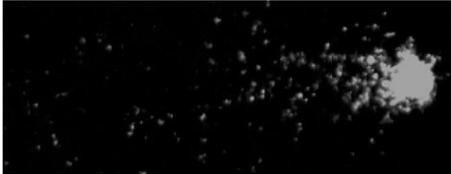
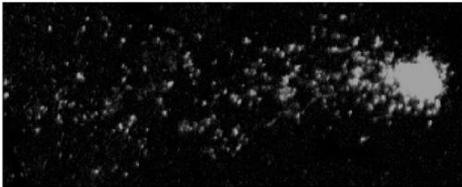
Observed DNA damage	DNA migration	Damage classes
	No migration	0
	Low	1
	Intermediate	2
	High	3

Figura 1 Scores de dano baseados no tamanho da cauda do cometa observado em hemócitos de *Biomphalaria glabrata*

Fonte: (GRAZEFEE et al., 2008)

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, F. B. et al. Survival strategies of pomegranate and almond trees in a fluoride polluted area. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 329, n. 3, p. 200-207, Mar. 2006.

ALBERTINI, R. J. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, n. 463, p. 111-172, Jan. 2000.

ANDRADE, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Cytogenetic alterations induced by SPL (Spent Pot Liner) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, n. 71, p. 706-710, Feb. 2008.

ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, n. 73, p. 626-631, Jan. 2010.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Spent Pot Liner (SPL) Induced DNA Damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, n. 74, p. 822-828, Jan. 2011.

ARAÚJO, A. S. F. et al. Evaluation of toxicity of textile sludge compost on seed germination and root elongation of soybean and wheat. **Revista Ecosistema**, Espírito Santo do Pinhal, v. 26, n. 1, p. 117-119, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004**: resíduos sólidos: classificação. Rio de Janeiro, 2004.

AZQUETA, A. et al. Towards a more reliable comet assay: optimizing agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 724, p. 41-45, 2011.

BADERNA, D. et al. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. **Environmental Research**, San Diego, n. 111, p. 603-613, Feb. 2011.

BAKARE, A. A.; MOSURO, A. A.; OSIBANJO, O. An in vivo evaluation of induction of abnormal sperm morphology in mice by landfill leachates. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 582, p. 28-34, Apr. 2005.

BARBIER, O.; MENDOZA, L. A.; RASO, L. M. D. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, n. 188, p. 319-333, Aug. 2010.

BARCELO, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: review. **Environmental Experimental Botany**, New York, v. 48, n. 1, p. 75-92, July 2002.

BARROS, A. C. et al. Identification of irradiated wheat by germination test, DNA comet assay and electron spin resonance. **Radiation Physics and Chemistry**, Philadelphia, v. 63, p. 423-425, Mar. 2002.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Projeto estatal**: projeto de assistência técnica ao setor de energia. Brasília, 2009.

BRYANT, P. E. Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 404, n. 1/2, p. 107-111, 1998.

CAMPOS, J. M. S. et al. Mutagenic effects due to allelopathic action of fern (Gleicheniaceae) extracts. **Allelopathy Journal**, New York, v. 22, p. 143-152, July 2008.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberration in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, Oxford, v. 72, p. 722-725, Apr. 2008.

CHANDRA, S. et al. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 347, n. 1/3, p. 46-52, July 2005.

CHAPUIS, P.; FAVIER, A. Trace elements in nutrition and therapeutic. **Medicine International**, Praga, v. 112, p. 131-137, Dec. 1999.

CHARLES, J. et al. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, p. 2057-2064, Aug. 2011.

CIAMPOROVA, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 45, n. 2, p. 161-171, 2002.

DANON, A. et al. Review plant programmed cell death: a common way to die. **Nature**, New York, v. 38, p. 647-655, Sept. 2000.

DASH, R. R.; GHOUR, A.; BALOMAJUMDER, C. Cyanide in industrial wastewaters and its removal: a review on biotreatment. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 163, n. 34, p. 1-11, 2009.

DEMARINI, D. M. Environmental mutagens/complex mixtures. In: LI, A. P.; HEFLICH, R. H. **Genetic toxicology**. Cleveland: CRC, 1991. p. 290-318.

DEWHURST, R. E. et al. The comparison of rapid bioassays for the assessment of urban ground water quality. **Chemosphere**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 547-554, May 2002.

DOORN, W. G. V.; WOULTERING, E. J. Many ways to exit? Cell death categories in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 117-122, 2005.

DOORN, W. G. V.; WOULTERING, E. J. What about the role of autophagy in PCD? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, n. 7, p. 361-362, 2010.

DUTKA, B. J. Short-term root elongation toxicity bioassay. Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. **National Water Research Institute (NWRI)**, Burlingon, v. 1, p. 31-52, July 1989.

EBBS, S. et al. Transport and metabolism of free cyanide and iron cyanide complexes by willow. **Plant Cell Environment**, Chicago, v. 26, n. 9, p. 1467-1478, Sept. 2003.

EL-FADEL, M.; FINDIKAKIS, A. N.; LECKIE, J. O. Environmental impacts of solid waste landfilling. **Journal of Environmental Management**, London, v. 50, n. 25, p. 1-25, 1997.

FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 504, p. 131-136, June 2002.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, p. 81-95, Apr. 2000.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to triXuralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 88, n. 36, p. 252-259, 2007.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Lund, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FISKESJÖ, G. The Allium test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 8, n. 3, p. 291-298, Aug. 1993.

FRANTZIOS, G.; GALATIS, B.; APOSTOLAKOS, P. Aluminum effects on microtubule organization in dividing root tip cells of *Triticum turgidum*: II. cytokinetic cells. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, n. 1114, p. 157-170, June 2001.

FRANZARING, J.; KLUMPP, A.; FANGMEIER, A. Active biomonitoring of airborne fluoride near an HF producing factory using standardised grass cultures. **Atmospheric Environment**, London, v. 41, n. 23, p. 4828-4840, July 2007.

GALE, P. The toxicity of aluminum. **Research** 17, Oxford, v. 12, n. 42, p. 766-775, 1986.

GARRUNTO, R. M.; YANAGIHARA, R.; GAJDUSEK, D. C. Models of environmentally induced neurological disease: epidemiology and etiology amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia in the Western Pacific. **Environmental Geochemistry Health**, Berlin, v. 12, n. 25, p. 137-151, 1990.

GIANNOTTI, E. et al. A comparison of the in vitro Comet assay with the in vitro chromosome aberration assay using whole human blood or Chinese hamster lung cells: validation study using a range of novel pharmaceuticals. **Mutagenesis**, Quebec, v. 17, n. 32, p. 163-170, 2002.

GICHNER, T. et al. Evaluation of the nuclear DNA Diffusion Assay to detect apoptosis and necrosis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 586, p. 38-46, Oct. 2005.

GOPALAN, H. N. B. Ecosystem health and human wellbeing: the mission of the international programme plant bioassays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 426, p. 99-102, May 1999.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassay for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 310, n. 2, p. 175-185, Oct. 1994.

GRAZEFKE, V. S. et al. Establishment of the comet assay on the freshwater snail *Bionphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutation Research**, Amsterdam, v. 684, p. 58-63, Aug. 2008.

HARTMANM, A. et al. Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 536, p. 27-38, Mar. 2003.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleous and chromossoome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 72, n. 17, p. 2090-2095, 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Soil quality**: determination of the effects of pollutants on soil flora: part 2: effects of chemicals on the emergence of higher plants. New York, 1995. 21 p.

KAUR, P. et al. Modulatory role of alizarin from *Rubia cordifolia* L. against genotoxicity of mutagens. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, p. 320-325, Feb. 2010.

KEIGHTLEY, A. M. et al. Coumarin and its 4- and 7- substituted derivatives as retardants of mitoses in *Allium* root promeristem. **International Journal of Pharmacognosy**, Lisse, v. 34, n. 2, p. 105-113, 1996.

KJELDSSEN, P. et al. Present and long-term composition of MSW landfill leachate: a review. **Environmental Science Technology**, London, v. 32, p. 297-336, Sept. 2002.

KLANCNIK, K. et al. Use of modified *Allium* test with nanoTiO₂. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, p. 85-92, Apr. 2011.

KOCHIAN, L.; PIÑEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, The Hague, v. 274, n. 1/2, p. 175-195, July 2005.

KOLLMEIER, M.; FELLE, H. H.; HORST, W. J. Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin involved in inhibition of root elongation by aluminum? **Plant Physiology**, Boston, v. 122, n. 3, p. 945-956, Mar. 2000.

KOO, N. et al. Using response surface methodology to assess the effects of iron and spent mushroom substrate on arsenic phytotoxicity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 192, p. 381-387, May 2011.

KUMARI, M. et al. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 190, p. 613-621, Oct. 2011.

KUPIDŁOWSKA, E. et al. The effect of coumarins on root elongation and ultrastructure of meristematic cell protoplasts. **Annals of Botany**, London, v. 73, n. 5, p. 525-530, May 1994.

KURÁS, M. et al. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 107, n. 2, p. 211-221, Sept. 2006.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 88, n. 4, p. 214-219, July 2008.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 682, p. 71-81, July 2009.

LEWIS, M. A. Algae and vascular plant tests. In: RAND, G. (Ed.). **Aquatic toxicology**: effects, environmental fate and risk assessment. London: Taylor & Francis, 1995. p. 135-169.

LIN, D.; XING, B. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. **Environmental Pollution**, Vienna, v. 150, p. 243-250, Mar. 2007.

LISBONA, D. F.; STEEL, K. M. Recovery of fluoride values from spent pot-lining: precipitation of an aluminium hydroxyfluoride hydrate product. **Separation and Purification Technology**, Boston, v. 61, p. 182-192, Feb. 2008.

MAJEWSKA, A. et al. Antimitotic effect, G2/M accumulation, chromosomal and ultrastructure changes in meristematic cells of *Allium cepa* L. root tips treated with the extract from *Rhodiola rosea* roots. **Caryologia**, Firenze, v. 56, n. 3, p. 337-351, July 2003.

MALUSZYNSKA, J.; JUCHIMIUK, J. Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. **Plant Genotoxicity**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 177-184, June 2005.

MARCANO, L. et al. Citotoxicity and mode of action of maleic hysrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, San Diego, v. 94, p. 221-226, June 2004.

MARCUSSI, S. et al. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 724, p. 59-63, May 2011.

MA, T. H. et al. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 334, n. 2, p. 185-195, Apr. 1995.

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International Review of Cytology**, New York, v. 200, n. 1, p. 1-46, 2000.

MEEUSSEN, J. C. L.; KEIZER, M. G.; DEHAAN, F. A. M. Chemical stability and decomposition rate of iron cyanide complexes in soil solutions. **Environmental Science Technology**, London, v. 26, n. 3, p. 511-516, Mar. 1992.

MENKE, M. et al. DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 493, p. 87-93, Mar. 2001.

MIGID, H. M. A.; AZAB, Y. A.; IBRAHIM, W. M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 66, n. 1, p. 57-64, Jan. 2007.

MITTEREGGER, J. H. et al. Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries. **Chemosphere**, Oxford, v. 67, n. 6, p. 1211-1217, Apr. 2007.

MUMTAZ, M. M. Risk assessment of chemical mixtures from a public health perspective. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 15, n. 82/83, p. 527-532, Dec. 1995.

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 504, n. 1/2, p. 3-16, July 2002.

NATARAJAN, A. T.; OBE, G. Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations: part 1: utilization of neurospora endonuclease for the study of aberration production in G2 stage of cell cycle. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 52, n. 1, p. 137-149, June 1978.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Fluoride in drinking-water: a scientific review of EPA's standards.** New York: National Academic, 2006. 530 p.

OBE, G.; JOHANNES, C.; SCHULTE-FROHLINDE, D. DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. **Mutagenesis**, Quebec, v. 7, n. 1, p. 3-12, 1992.

ON organic production of agricultural products and indications referring thereto on agricultural products and foodstuffs. **Council Regulation (EEC)**, [S.l.], n. 2092, 24 June 1991. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/consleg/1991/R/01991R2092-20070101-en.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2011.

PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; OBE, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, Quebec, v. 15, n. 4, p. 289-302, 2000.

PODBIELKOWSKA, M. et al. Effect of coumarin and its derivatives on mitosis and ultrastructure of meristematic cells. **International Journal of Pharmacognosy**, Lisse, v. 33, n. 1, p. 7-15, Mar. 1995.

PODBIELKOWSKA, M.; WALEZA, M.; ZOBEL, A. M. Influence of methotrexate on respiration and ultrastructure of meristematic cells from *Allium cepa* roots. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Warszawa, v. 50, p. 563-566, Mar. 1981.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 312, n. 1, p. 17-24, Feb. 1994.

RITTER, D.; KNEBEL, J. Genotoxicity testing in-vitro: development of a higher throughput method based on the comet assay. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 23, p. 1570-1575, Oct. 2009.

RUSSEL, P. J. Chromosomal mutation. In: CUMMINGS, B. (Ed.). **Genetics**. Oxford: Pearson Education, 2002. p. 595-621.

SANDALIO, L. M. del. et al. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 364, p. 2115-2126, Nov. 2001.

SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K.; MURTHY, R. C. Carbofuran induced cytogenetic effects in root meristem cells of *Allium cepa* and *Allium sativum*: a spectroscopic approach for chromosome damage. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 35, n. 96, p. 93-100, 2010.

SILVA, I. et al. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. **Plant Physiology**, Boston, v. 123, n. 2, p. 543-552, June 2000.

SILVEIRA, B. I. et al. Characterization of inorganic fraction of spent pot Liners: evaluation of the cyanides and fluorides content. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 89, p. 177-183, Feb. 2002.

SILVEIRA, B. I. et al. Effectiveness of cement-based for stabilization and solidification of spent pot Liner inorganic fraction. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 98, n. 1/3, p. 183-190, Mar. 2003.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 175, p. 184-194, Apr. 1988.

SUMNER, A. T. **Chromosomes organization and function**. North Berwick, Reino Unido: Blackwell, 2003. 287 p.

TASSIST, A. et al. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on aluminum biosorption by a micelial biomass (*Streptomyces rimosus*). **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 183, p. 35-43, July 2010.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ecological effects test guidelines (OPPTS 850.4200)**: seed germination/root elongation toxicity test. New York, 1996. 8 p.

VALERIO, M. E.; GARCIA, J. F.; PEINADO, F. M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Science Total Environment**, Berlin, v. 378, p. 63-66, Nov. 2007.

WANG, W.; KETURI, P. H. G. Comparative seed germination tests using ten plant species for toxicity assessment of metals engraving effluent sample. **Water, Air, Soil, Pollutant**, New York, v. 52, p. 369-376, Sept. 1990.

WANG, W.; WILLIAMS, J. M. The use of phytotoxicity tests (common duckweed, cabbage, and millet) for determining effluent toxicity. **Environmental Monitoring Assessment**, Vienna, v. 14, p. 45-58, Mar. 1990.

YILDIZ, M. et al. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, Oxford, v. 75, p. 934-938, Feb. 2009.

YOUNG, B. J. et al. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 76, p. 182-186, Jan. 2012.

YU, X. Z.; GU, J. D. Differences in Michaelis-Menten kinetics for different cultivars of maize during cyanide removal. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 67, n. 2, p. 254-259, June 2007.

YU, X. Z.; TRAPPS, S.; ZHOU, P. H. Phytotoxicity of cyanide to weeping willow trees. **Environmental Science Pollution Research**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 109-113, 2005.

ZIMMERMAN, A. et al. Influence of a soil enzyme on iron-cyanide complex speciation and mineral adsorption. **Chemosphere**, Oxford, v. 70, n. 6, p. 1044-1051, 2007.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 Prospecção do potencial toxicológico do *Spent Pot Liner* (SPL)

PALMIERI¹, M. J.; MOREIRA², F.; ANDRADE-VIEIRA³, L.F.;
DAVIDE, L.C. ¹

¹Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

²Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras (UFLA), CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

³Departamento de Biologia, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), CEP 29500-000, Alegre, ES, Brasil

Autor Correspondente: Tel: (35) 3829-1356

Endereço de e-mail: lisete.ufla@gmail.com (L.C.Davide)

RESUMO

O *SPL* (*Spent Pot Liner*) é um resíduo sólido resultante da produção de alumínio formado por uma mistura de substâncias consideradas tóxicas e com grande potencial poluidor. O presente trabalho estudou por meios de ensaios biológicos e químicos, o potencial tóxico desse resíduo, bem como sua composição química básica. Foi empregado um teste de germinação e crescimento radicular utilizando-se *Lactuca sativa* como modelo. Como consequência do tratamento das sementes ao *SPL* foi observada uma inibição na germinação seguida de redução no comprimento das raízes. Adicionalmente foi estabelecida a concentração de 26,5 g/L de *SPL* como sendo a IC_{50} (Inibição de Crescimento em 50%). Os testes de prospecção químicos conduzidos foram: análise de difração de raios-X, análises térmicas, análise de espectroscopia de FITR e ensaio de lixiviação. Foi constatado que o *SPL* é composto por óxidos de ferro e de alumínio e sais de fluoreto, além de possuir traços de zinco, cromo e manganês em seu lixiviado. Foram encontradas concentrações oito vezes maiores de ferro do que o permitido pela legislação brasileira. Esses dados comprovam a toxicidade e ecotoxicidade do *SPL* e alertam para os riscos potenciais dele para o meio ambiente e para o bem-estar humano.

Palavras-chave: *SPL*. Toxicidade. Germinação e crescimento radicular. IC_{50} . Prospecção química. *Lactuca sativa*.

ABSTRACT

SPL (Spent Pot Liner) is a residue from the aluminum production. The present work evaluated by means of biological and chemical essays the toxicological potential of this compound as well as its basic chemical composition. A germination and root growth test was employed utilizing *Lactuca sativa* as a model. It was established that SPL has an inhibitory effect on root growth and that it impairs germination of seeds., Additionally the concentration of 26,5 g/l of SPL were determined as the IC₅₀ (Inhibition Concentration of 50%). The chemical prospection analyses conducted on this work were: X-ray diffraction, thermal analysis, FITR spectroscopy ad leachate composition analysis. They showed that the SPL is composed by iron and aluminum oxides and fluoride salts as well as having traces of zinc, chromium and magnesium in its solution. Iron was also found in concentrations eight times bigger than the ones allowed by the Brazilians legislations. These data prove not only the toxicity but also the ecotoxicity of the SPL and cast a warning on its potential risks to the environment and the human wellbeing.

Keywords: SPL. Toxicity. Root growth and germination. IC₅₀. Chemical prospection. *Lactuca sativa*.

1 INTRODUÇÃO

O processo de purificação e refino do alumínio produz um resíduo constituído de uma mistura de substâncias, dentre elas sais de cianeto fluoreto e alumínio, altamente tóxico, o *Spent Pot Liner (SPL)* (SILVEIRA 2003; ANDRADE et al., 2008).

A ABNT (Associação Brasileira de Normas técnicas) classifica um composto como tóxico baseando-se em sua composição química e em testes de solubilidade e de lixiviação (ABNT, 2004), no entanto não exige testes que determinem o potencial ecotoxicológico do composto, o que faz com que os efeitos do composto em sistemas biológicos não sejam levados em conta.

Dentre os testes com modelos biológicos encontra-se o ensaio de germinação e crescimento radicular. Ensaio dessa linha com plantas vasculares são particularmente interessantes por permitirem a avaliação de efeitos adversos de um composto tóxico na germinação e crescimento radicular ainda nas fases iniciais de desenvolvimento da semente (DUTKA, 1989; LEWIS, 1995). Gopalan (1999) e Valerio e et al. (2007) descrevem os bioensaios de germinação e crescimento radiculares como sendo simples, rápidos, confiáveis e muito baratos por não necessitarem de equipamentos de alta tecnologia. Além disso, a raiz é o primeiro órgão vegetal a entrar em contato com a solução ou substrato contendo a substância a ser analisada, logo alguns autores recomendam a condução do teste de germinação e avaliação de crescimento radicular para verificar a possível fitotoxicidade de substâncias (VALERIO et al., 2007).

No que diz respeito à prospecção química existe uma pletera de possíveis ensaios a se conduzir. Um dos mais fundamentais e básicos desses ensaios é a análise de difração de raios-X, uma técnica usada para elucidação química da estrutura de compostos cristalinos (TOMAINO, 1994). De acordo com Srodon et al. (2001), a difração de raios-X é a melhor técnica para

identificação de minerais em substâncias granulares como rochas, solos e poeira de construções.

Outra técnica possível de se empregar é a análise espectroscópica de infravermelho. Técnicas espectroscópicas de maneira geral são ótimas para identificação de um composto ou para a análise de composição de uma dada amostra. A espectroscopia de infravermelho é comprovadamente eficaz no estudo da elucidação química da estrutura de minerais (FROST et al., 2006 e 2007). Ela é de rápida execução e não destrutiva, sendo indicada para análise de composição de misturas complexas (WANG et al., 2011).

As análises térmicas também são de grande utilidade. A Federação Internacional de Análises Térmicas e Calorimetria (*ICTAC* – sigla em inglês) define análises térmicas como sendo um conjunto de técnicas em que uma propriedade física ou química de uma amostra é monitorada através do tempo mantendo-se a temperatura da amostra e a atmosfera onde o ensaio acontece controlados (LANGIER-KÚZNIROWA, 2002).

Lixiviação é o processo de extração de uma substância presente em componentes sólidos através da sua dissolução em um líquido. Os ensaios de lixiviação são utilizados para determinar ou avaliar a estabilidade química dos resíduos, quando em contato com soluções aquosas, permitindo assim verificar o grau de mobilidade de contaminantes. (VIJAY & SIHORWALA, 2003). Destarte, a partir das técnicas descritas é possível avaliar a composição do lixiviado do *SPL*.

Todas essas técnicas quando empregadas conjuntamente fornecem uma ótima base de dados para se avaliar os riscos e o potencial tóxico de um composto tanto de maneira teórica, com as análises químicas, como também de uma maneira mais prática avaliando as reações de sistemas biológicos, através dos bioensaios.

Com isso em mente, este trabalho visa, por meio de ensaios de prospecção química, elucidar a constituição do *SPL* e a fração deste que se encontra em seu lixiviado e, adicionalmente, lançar mão do bioensaio de germinação e crescimento radicular para avaliar o seu potencial ecotoxicológico.

2 MATERIAL E METODOS

2.1 Análises Químicas

Foi utilizado 1Kg de *SPL* bruto (assim como o descartado pelas indústrias de alumínio) em pó para as análises. Os gráficos foram interpretados usando os softwares *Mercury*® e *Crystallographica*®.

2.1.1 Difração de raios-X

As análises de difração de raios-X (XRD) foram realizadas em um aparelho 60 *Faxitron* HP, modelo 43855AX com intensidade de radiação de 35 KV, 25 mA de corrente e angulação de 4 a 100° 2 θ a uma taxa de 0,01° 2 θ s⁻¹ e tempo de permanência do detector de 0,5s °2 θ conforme protocolo estabelecido pelo Centro de Análise e Prospecção Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1.2 Análise Térmica

O *SPL* sólido foi aquecido numa faixa de temperatura de 30°C a 900°C, sob fluxo de N₂ e de 900°C a 1100°C e de ar sintético, com taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹. As análises foram realizadas em um analisador termomecânico *Shimadzu* DTG-60AH do Centro de Análise e Prospecção Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1.3 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras sólidas foram caracterizadas utilizando a espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando pastilha de KBr (300 mg de KBr para 3 mg de amostra) com faixa de varredura compreendida entre 4.000 e 400 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

As análises de FTIR das amostras líquidas foram realizadas utilizando a reflectância atenuada (ATR) adicionando duas gotas da amostra, previamente homogeneizada, sobre a superfície do cristal reflectante na faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

As análises foram realizadas no Centro de Análise e Prospecção Química da Universidade Federal de Lavras, utilizando o equipamento DIGILAB EXCALIBUL, série FTS 3000

2.1.4 Lixiviação

Para a realização da metodologia de lixiviação foi seguido o procedimento referente a normativa NBR 10.005.

Pesou-se 1,000 g de *SPL*, mantendo-se o pH=5, utilizando ácido acético (H_3CCOOH) 2 mol L^{-1} , por 24 horas de contato sob agitação do tipo “*jar test*” em uma proporção de solvente de 16:1. Após o tempo de contato a solução foi filtrada em papel de filtro com membrana com poros de 0,45 mm conforme protocolo estabelecido pelo Centro de Análise e Prospecção Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

A determinação dos elementos no extrato lixiviado foi realizada em um equipamento de absorção atômica Spectra AA 110 Varian localizado no

Laboratório de Análise Foliar do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras.

2.2 Análise Fitotóxica

Utilizou-se semente de *Lactuca sativa* da variedade Crespa Grand Rapids como modelo para avaliar o efeito inibitório do SPL sobre o crescimento e desenvolvimento radicular.

2.2.1 Preparação das soluções

Seis concentrações de *SPL* (1,5,10,20,40 e 80 g/L de *SPL*) foram utilizadas no estudo. As soluções foram preparadas dissolvendo o *SPL* em CaCl_2 a 0,01M (ANDRADE et al., 2008,2010). O CaCl_2 0,01M foi utilizado para simular o efeito das forças iônicas presentes naturalmente no solo durante a lixiviação desse material (ANDRADE et al. 2008). Além disso, CaCl_2 não apresenta efeitos tóxicos não comprometendo, portanto, os testes (FERRETI et al., 2008).

As soluções foram agitadas a 180 rpm por 12h, posteriormente deixadas em repouso por mais 12h. O procedimento foi repetido 3 vezes até completar um total de 72h. Após estas 72h, o sobrenadante foi coletado e filtrado.

Como controle negativo foi utilizado água destilada e uma concentração CaCl_2 a 0,01M puro.

2.2.2 Ensaio de germinação e crescimento radicular

O experimento foi montado em DIC (delineamento inteiramente casualizado) contendo doze placas de petri de cada tratamento. Cada placa

continha trinta sementes de *Lactuca sativa* var. *Crespa Grand Rapidis* colocadas sobre papel de germinação com 5ml de solução de *SPL*. As placas foram cobertas com papel alumínio a fim de evitar influencia da luz (NARWAL et al., 2009). As placas de petri com os tratamentos foram mantidas por 96 horas em uma BOD a 24 graus *Celsius*.

Nos períodos de 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas, após exposição ao *SPL*, foi contado o número de sementes germinadas e posteriormente calculou-se o índice de velocidade de germinação (IVG) $[(N_1 \times 1) + (N_2 - N_1) \times 1/2 + (N_3 - N_2) \times 1/3 + \dots + (N_y - N_{y-1}) \times 1/y]$, onde N_y representa o número de sementes germinadas em um dado período e y representa o número total de períodos de avaliação, nesse caso 5] e a porcentagem de sementes germinadas (total de sementes germinadas/total de sementes do tratamento x 100).

Após um período de 96 horas, as raízes foram medidas utilizando um paquímetro digital. As médias dos comprimentos obtidos foram utilizadas para obtenção de uma curva de regressão linear (concentração de *SPL* x crescimento).

Com base na curva de regressão foi determinado o IC_{50} , concentração na qual ocorre 50% de inibição no crescimento radicular.

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o *software* livre “R” (R Development Core Team, 2011) e o teste de média empregado foi o Teste de *Kruskal Wallis*.

3 RESULTADOS

3.1 Prospecção Química

Várias metodologias foram empregadas para avaliar a composição e estrutura química do SPL

3.1.1 Difração de Raios-X

A figura 1 representa o difratograma do *SPL* na forma sólida obtido a partir da análise de difração de raio-X. Foi possível observar que o *SPL* é composto por óxido de ferro presente na forma goethita (\square -FeOOH) e óxido de alumínio.

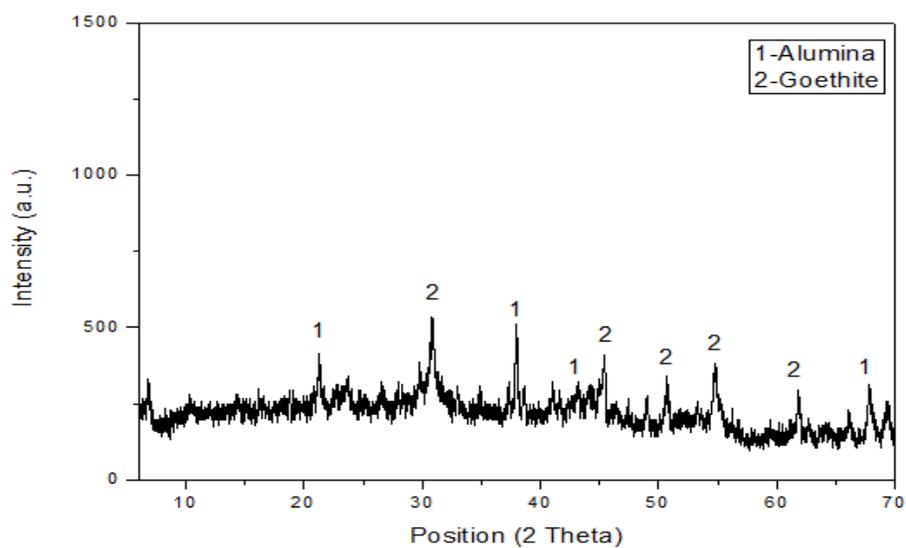


Figura 1 Difratograma do *SPL*. Eixo X – ângulo de incidência. Eixo Y- Intensidade de difração

3.1.2 Análise Térmica

A Figura 2 demonstra o termograma do *SPL* com sua respectiva curva e derivada termogravimétrica. Foi observado que o *SPL* possui um caráter inorgânico uma vez que apresenta estabilidade térmica e teor de cinzas de 71%.

Pela análise da TGA (análise termogravimétrica) e DTA (derivada termogravimétrica) ficam evidenciados três picos de perda de massa (Figura 3): (1) o pico em 250°C, endotérmico, correspondente a perda de água de hidratação e a perda da hidroxila estrutural; (2) o pico em torno de 600°C e (3) o ombro entre 700 e 900°C. Estes dois últimos picos correspondem ao colapso das estruturas minerais presentes no *SPL*, levando a um aumento de entropia (grau de desordem do sistema) e a consequente liberação de energia (pico exotérmico).

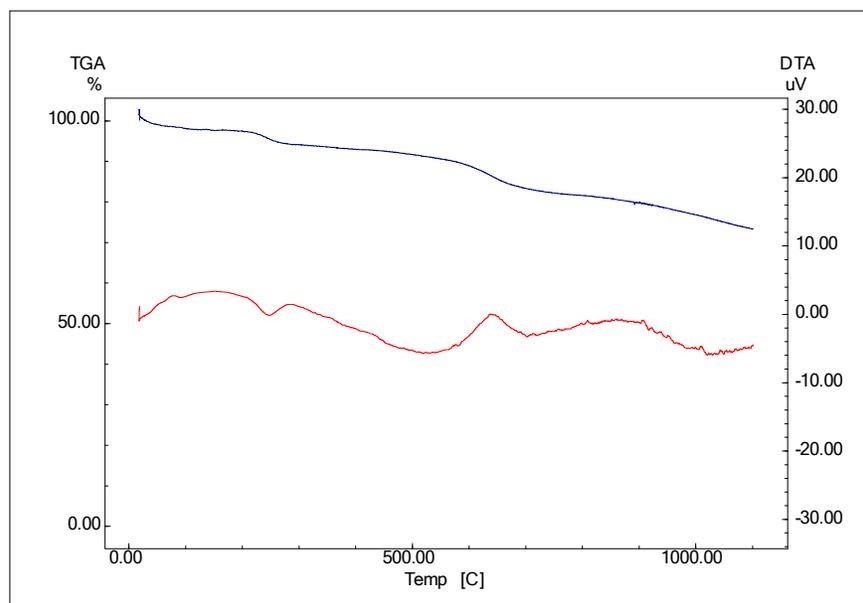


Figura 2 termograma do *SPL* com sua respectiva curva termogravimétrica (curva superior) e derivada termogravimétrica (curva inferior)

3.1.3 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 3 representa o espectro de FTIR do *SPL*. Pela análise dessa figura é possível notar uma banda entre 3600 e 3400 cm^{-1} correspondente ao estiramento O-H resultante da goethita. O pico pouco intenso em 2050 cm^{-1} corresponde à presença de compostos nitrogenados, entretanto sua baixa intensidade mostra sua pequena presença no *SPL*. O pico em 1000 cm^{-1} corresponde à presença de silicatos e a deformação angular O-H. A forte absorbância entre 900 e 500 cm^{-1} se deve a presença de compostos halogenados como flúor.

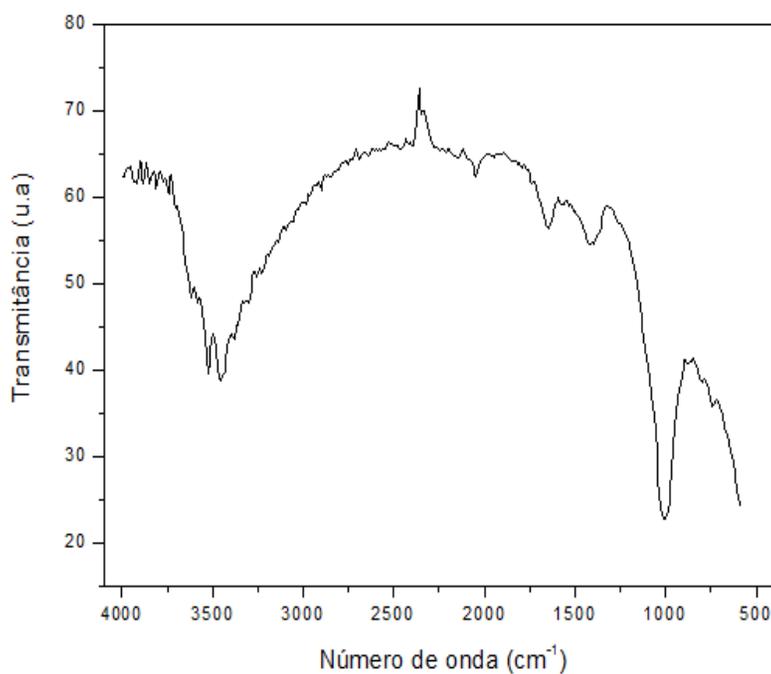


Figura 3 Espectro de FTIR do *SPL*

3.1.4 Lixiviação

O pH constatado para o lixiviado foi de 9,85 lixiviado e mostra o caráter básico do *SPL*. Além disso, foi possível notar que o lixiviado do *SPL* apresentou traços de zinco, cromo e manganês, além de apresentar uma concentração bastante elevada de ferro. A Tabela 1 corresponde à concentração de diferentes metais no lixiviado do *SPL*.

A Figura 4 corresponde à análise do espectro de FTIR do lixiviado do *SPL*. Pela observação dessa figura se nota uma banda intensa entre 3600 e 3300 cm^{-1} correspondente ao estiramento O-H. Os picos em 1650 e correspondem a grupamentos orgânicos, sendo o primeiro correspondente a ligação C=C, e o segundo correspondente a deformação angular $-\text{CH}_2-$. A forte absorbância entre 900 e 500 cm^{-1} se deve a presença de compostos halogenados como flúor.

Pela avaliação da Tabela 1 e da Figura 4, conjuntamente, é possível afirmar que os compostos lixiviados do *SPL* são os óxidos de ferro, alguns grupamentos orgânicos e os sais de flúor.

Tabela 1 Análise do Lixiviado do *SPL*

pH	Fe(mg/L)	Zn(mg/L)	Mn(mg/L)	Cu(mg/L)	Cr(mg/L)
9,85	120	0,0888	0,11	0	0,25

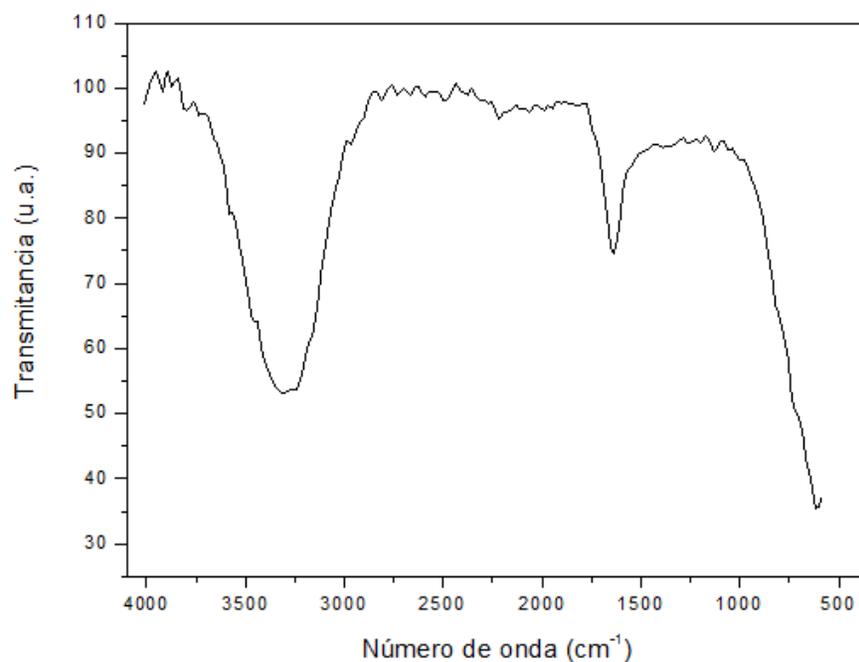


Figura 4 Espectro de FTIR do lixiviado do *SPL*

3.2 Ensaio de Germinação e Crescimento Radicular

A Tabela 1 elucida as porcentagens médias de sementes germinadas e os índices médios de velocidade de germinação para cada tratamento de *SPL* testado.

Foram observadas reduções significativas em relação ao controle no total de sementes germinadas a partir do tratamento de 10% *SPL*, sendo que na maior concentração testada (80% *SPL*) houve uma redução de 85,74% no número total de sementes germinadas. Para os tratamentos de 1% e 5% não houve redução na germinação de sementes em relação ao controle.

Adicionalmente observou-se que o *SPL* reduziu a velocidade de germinação das sementes. Redução significativa foi observada a partir do

tratamento de 5% *SPL*. No tratamento de 80% *SPL* essa redução no IVG foi de 89,65%. De maneira geral notou-se uma relação direta entre redução de velocidade de germinação e redução na porcentagem total de sementes germinadas.

A Tabela 1 torna claro o comprimento médio das raízes observado para cada um dos tratamentos. Foi observada uma queda progressiva no comprimento das raízes chegando a uma redução total no tamanho médio de aproximadamente 98,37%.

A Figura 1 ilustra a curva de regressão obtida com os valores médios do crescimento radicular. Através dessa curva foi possível definir o ponto onde há 50% de inibição no crescimento radicular, o que representa o IC_{50} . Tal ponto foi determinado como sendo correspondente a uma concentração de aproximadamente 26,5 g/L de *SPL*. O R^2 da curva obtida foi igual a 0,9937 mostrando que ela foi altamente representativa e que os valores obtidos através de estimativas baseadas nela são consideravelmente confiáveis.

Tabela 2 Ensaio de Germinação e Crescimento Radicular

Tratamentos	Porcentagem de Sementes Germinadas	IVG
Água	97,01 ± 0,78	19,20 ± 0,28
CaCl ₂ (0,01M)	97,39 ± 0,99	19,33 ± 0,16
1g/L <i>SPL</i>	96,10 ± 0,08	17 ± 0,33
5g/L <i>SPL</i>	96,74 ± 0,56	14,33 ± 0,51 *
10g/L <i>SPL</i>	93,75 ± 0,69 *	10,66 ± 1,22 *
20g/L <i>SPL</i>	85,14 ± 1,75 *	8,66 ± 1,27 *
40g/L <i>SPL</i>	78,35 ± 3,62 *	5 ± 0,33 *
80g/L <i>SPL</i>	13,88 ± 1,15 *	2 ± 0,02 *

Valores médios seguidos dos desvios padrões das porcentagens de sementes germinadas bem como dos índices de velocidade de germinação para os tratamentos testados. Valores seguidos por * diferem significativamente do controle.

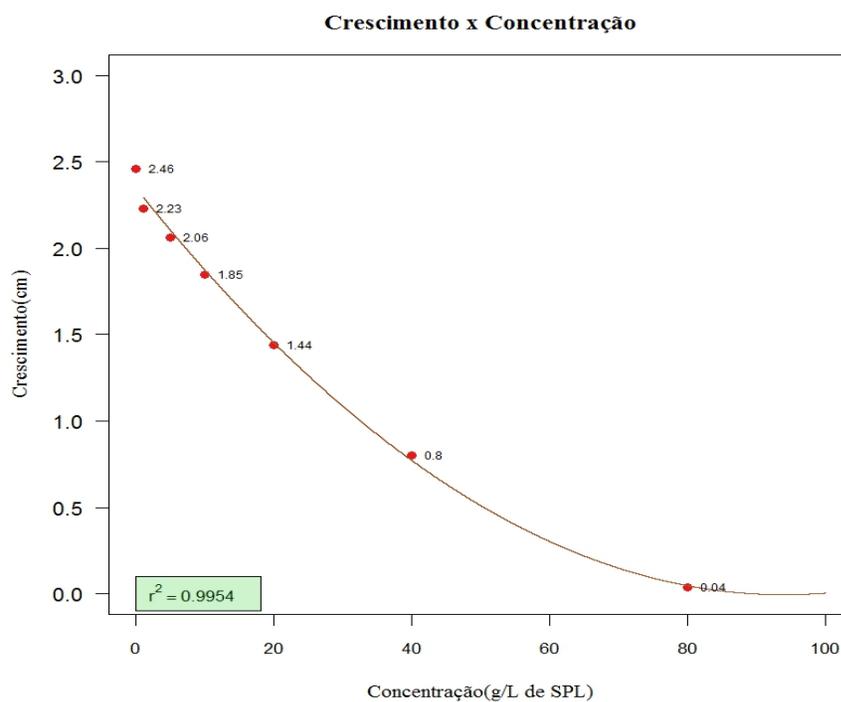


Figura 5 Curva de regressão linear para os valores médios de comprimento das raízes germinadas

Nota: os pontos indicam as médias dos tratamentos e a linha representa a curva de regressão linear cuja fórmula é igual a: $\text{Crescimento} = 0,0003 \text{ Concentração}^2 - 0,05 \text{ Concentração} + 2,3451$. O IC_{50} foi determinado como sendo aproximadamente 26,5 g/L de *SPL*. Para a água observou-se um tamanho médio nas raízes igual a 2,51 cms.

4 DISCUSSÃO

Fica evidente pelos resultados obtidos no presente trabalho que o *SPL* apresenta um amplo potencial tóxico. A avaliação desse potencial foi conduzida tanto em nível biológico através de um teste de germinação e crescimento radicular quanto por meio de uma série de testes de prospecção química.

Os testes de prospecção química mostraram tanto a presença de metais pesados na composição do *SPL*, óxidos de ferro e de alumínio, como também o seu caráter inorgânico e evidenciaram a presença de compostos alogenados, possivelmente o fluoreto, uma vez que este já foi constatado por outros trabalhos como sendo componente do *SPL* (ANDRADE et al. 2008; SILVEIRA, 2003).

O efeito exato do fluoreto nos sistemas biológicos não é totalmente conhecido (FRANZARING et al., 2007). No entanto, sabe-se que ele pode ser acumulado nos vegetais causando uma série de danos como alterações metabólicas, lesões foliares e redução no crescimento e desenvolvimento deste. O fluoreto é absorvido da atmosfera pelas folhas podendo causar necrose nos tecidos foliares (ABDALLAH et al., 2006). O fluoreto interage com sistemas celulares mesmo em pequenas doses e sabe-se que ele pode induzi-los a um processo de *stress* oxidativo (BARBIER et al., 2010).

Em humanos, a exposição excessiva e prolongada a esse íon pode acarretar um problema sério conhecido como fluorose. Os principais sintomas da fluorose são manchas dentárias e deformidades esqueléticas. Isso ocorre devido à ação desse íon sobre as células ósseas (osteoblastos e osteoclastos). Adicionalmente, já foi relatada a ação do fluoreto sobre células de tecidos moles, como nos rins, sistema nervoso e gônadas (NRC, 2006).

A presença de óxidos de alumínio no *SPL* indica que durante a purificação da bauxita o alumínio não foi totalmente separado da matéria-prima,

sendo, portanto, descartado juntamente com os demais resíduos do processo (SILVEIRA, 2002).

O óxido de ferro é um contaminante natural da bauxita, ele é separado da alumina por meio do processo *Bayer*. Nesse processo a bauxita é lavada com uma solução quente de hidróxido de sódio (NaOH), a 175°C o que promove a converção dessa em hidróxido de alumínio, (Al(OH)₃) que se dissolve na solução. O alumínio em solução é posteriormente recuperado através de precipitação em baixas temperaturas (POWER & LOH, 2010).

Os metais pesados de maneira geral são considerados tóxicos e sabidamente causam danos ao DNA podendo levar até ao surgimento de carcinomas em humanos (MICO et al. 2006; OWENS & NIEMEYER, 2006; MENDIGUCHIA et al. 2007).

O acúmulo de metais pesados nos sistemas biológicos é prejudicial e esse pode ocorrer por inalação, ingestão ou contato direto da pele com compostos que contenham esses elementos (MIGUEL et al. 2007; BABULA et al, 2008). No caso específico do *SPL* a maior preocupação é com a ingestão de alimentos ou de água contaminados pelo lixiviado do resíduo, portanto saber a composição química do lixiviado é de extrema importância.

O pH do lixiviado do *SPL* é de natureza básica. Esse dado indica que o composto possui um alto potencial de se lixiviar em condições ácidas como em solos degradados e regiões de forte atividade industrial. Isso é especialmente preocupante quando se leva em consideração a produção de *SPL*, estima-se que um milhão de toneladas desse resíduo sejam produzidos anualmente no mundo (LISBONA & STEEL, 2008) e que lixiviados de resíduos industriais podem contaminar fontes de água potável e afetar a saúde humana (CHANDRA et al., 2005).

Além disso, notou-se que o lixiviado possui não só a presença de traços de manganês, cromo e zinco, compostos que não foram notados na análise de

raios-X possivelmente devido à sua baixa concentração no *SPL*, como também sais de flúor e ferro, este último presente em concentrações oito vezes maiores que a permitida pela legislação nacional (15mg/L- Resolução Conama 397 de 03 de março de 2008).

O ferro é um metal de grande distribuição na crosta terrestre, é o segundo metal mais abundante ficando atrás apenas do alumínio que também é componente do *SPL*. Ele é de extrema importância, pois faz parte de uma série de processos metabólicos básicos dos sistemas biológicos, como o transporte de oxigênio e a fotossíntese (FONTECAVE & PIERRE, 1992). No entanto, uma dose excessiva de ferro pode causar intoxicação. Em humanos sintomas de intoxicação por ferro são diarreia, vômitos, aumento do número de glóbulos brancos e uma alta taxa de glicose no sangue (hiperglicemia), podendo levar ao surgimento de obstruções intestinais e cirrose (AREZZINI et al. 2002).

Esse metal pesado em altas concentrações é citotóxico e pode ser letal afetando quase todos os órgãos. A absorção de ferro é normalmente regulada de modo a evitar a acumulação desse no organismo, porque não há nenhum mecanismo fisiológico que consiga eliminar o excesso de ferro no corpo. A toxicidade do ferro deve-se à sua acumulação em sua forma livre, ou seja, não ligado a moléculas protetoras como a transferrina ou a ferritina (MENEHINI, 1997).

Os trabalhos que avaliam a toxicidade do *SPL* não levaram em conta, até hoje, o ferro como sendo um dos principais agentes da toxicidade do *SPL*, fica claro, no entanto, que o ferro é um importante fator nos mecanismos de toxicidade desse composto e que se lixivia facilmente e em profusão devendo ser considerado juntamente com os sais de fluoreto e cianeto e o alumínio como um dos principais agentes da nocividade do *SPL*.

Os dados aqui apresentados são preocupantes, pois demonstram que o lixiviado do *SPL* possui alto potencial tóxico, devido a isso o cuidado com seu

descarte deve ser grande, depósitos de *SPL* a céu aberto, por exemplo, representam grande perigo não só a saúde humana mas a ecossistemas próximos dele.

É importante salientar que não foi possível constatar a presença de cianeto nem no composto nem no lixiviado, o que difere da literatura (SILVEIRA, 2003 e ANDRADRE, 2008). Uma possível explicação para isso seria a ocorrência de baixas concentrações desse elemento, o que tornaria ele dificilmente detectável por técnicas mais generalistas, que não são específicas para a identificação de compostos cianídricos.

Testes de germinação e crescimento radicular já foram feitos para o *SPL* anteriormente (ANDRADE et al., 2010), no entanto os autores incluíram uma série de tratamentos que não abrangeram a potencialidade tóxica total do *SPL*, os tratamentos utilizados no presente estudo vão desde concentrações bastante reduzidas (1g/L de *SPL*) até concentrações muito elevadas (80g/L de *SPL*), abrangendo um grande espectro de ação do resíduo.

As raízes expostas ao *SPL* apresentaram tanto uma redução no comprimento final quanto uma diminuição na porcentagem total de sementes germinadas, o que corrobora com os resultados obtidos por Andrade et al. (2010).

A inibição na germinação, refletida pela redução na porcentagem total de sementes germinadas, foi observada já a partir do tratamento de 10g/L de *SPL*, o que mais uma vez evidencia a toxicidade do *SPL*, visto que testes de germinação e crescimento radicular são especialmente eficientes quando usados para indicar fitotoxicidade de contaminantes de solo, sendo que a taxa de germinação é considerada o parâmetro mais sensível para avaliação de fitotoxicidade de metais pesados (VALERIO et al. 2007).

Outro parâmetro que demonstra os efeitos fitotóxicos do composto é o IVG. Notou-se que a partir da concentração de 5g/L esse índice sofreu reduções,

isso demonstra a capacidade do *SPL* de retardar a germinação (protusão radicular), o crescimento e o desenvolvimento de raízes. Isso é nocivo aos vegetais, pois a raiz é um órgão de extrema importância, envolvida na obtenção de nutrientes e água, ancoragem da planta, produção hormonal além de ser um meio de interação entre as plantas e bactérias do solo (YAO et al., 2002).

O crescimento radicular foi reduzido possivelmente devido à presença de Al e uma série de outros metais pesados evidenciados na composição química do lixiviado de *SPL* pelas análises químicas conduzidas neste trabalho, como ferro, manganês e zinco. Todos esses metais tem ação fitotóxica inibitória do crescimento radicular (LIU et al., 1992; OUZOUNIDOU et al., 1995; MATSUMOTO, 2000; SEREGIN et al., 2004), sendo que em alguns casos eles podem inclusive provocar alterações morfológicas na raiz (EL-GHAMERY et al., 2003). Essas alterações estruturais na raiz foram demonstradas para o *SPL* através de imagens de microscopia eletrônica apresentadas no trabalho de Andrade e et al. (2010).

A ação principal do alumínio é a inibição do crescimento radicular, podendo estar relacionada à redução da proliferação celular quando esse se aloca no simplasto, principalmente na região meristemática da raiz (MATSUMOTO, 2000)

É importante salientar também que o *SPL* provoca redução no índice mitótico e causa uma série de aberrações cromossômicas, bem como induz as células dos modelos testados a entrarem em um processo de morte celular programada (ANDRADE et al. 2008, 2010 e ANDRADE-VIEIRA, 2011), todos esses são fatores que têm efeito direto nas taxas de germinação e crescimento de raízes, uma vez que reduzem o número de divisões celulares, de células viáveis e comprometem a alongação celular. É interessante também chamar atenção para o fato de não ter havido diferenças entre o controle negativo com a água e com CaCl_2 0,01M, o que comprova que este último não tem efeitos fitotóxicos.

Outra grande importância do ensaio de crescimento radicular é a determinação do IC_{50} (Inibição de Crescimento 50%), que corresponde à concentração do agente testado em que o tamanho das raízes do modelo vegetal é 50% menor que o das raízes do tratamento controle (LIN & XING, 2007). Essa é uma concentração bastante representativa dos efeitos do composto, uma vez que é alta o suficiente para ter efeitos tóxicos claros, passíveis de serem mensurados e analisados por diversos bioensaios, sem que seja excessivamente nociva, o que comprometeria o resultado da maioria dos ensaios biológicos.

Foi constatado que o IC_{50} do *SPL* é igual a uma concentração de 26,5 g/L do composto, essa é maior que o tratamento mais concentrado utilizados nos trabalhos de Andrade et al. (2008,2010 e 2011), logo pode se dizer que o real potencial tóxico desse composto não foi perfeitamente constatado ainda, a maior concentração testada até o presente momento tem um potencial inibitório menor do que 50%. Estudos citogenéticos utilizando o IC_{50} como base podem ser de grande importância para elucidação dos mecanismos de toxicidade do *SPL*.

Fica comprovado que os testes de germinação e crescimento empregados conjuntamente com análises químicas são eficazes para demonstrar o potencial tóxico de misturas complexas derivadas do processo industrial e pode ser incorporado pelos órgãos de fiscalização para tal fim.

5 CONCLUSÃO

O *SPL* representa um sério risco ambiental e possui um elevado potencial tóxico, possuindo compostos alogenados como o flúor e metais pesados como ferro, cromo, zinco e manganês em sua composição. Esses elementos podem se lixiviar principalmente em solos degradados e regiões de intensa atividade industrial devido ao caráter básico do *SPL*.

O potencial nocivo do *SPL* em modelos biológicos foi evidenciado pela inibição no crescimento e germinação de sementes de alface expostas ao lixiviado do composto.

REFERÊNCIAS

M. Grodzinska-Jurczak, Management of industrial and municipal solid wastes in Poland. *Resources, Conservation and Recycling* 32(2001), 85-103.

S.E. Mbuligwe, M.E. Kaseva, Assessment of industrial solid waste management and resource recovery practices in Tanzania. *Resources, Conservation and Recycling* 47 (2006), 260-276.

B.I. Silveira, A.E. Dantas, J.E. Blasquez, R.K.P.Santos, Effectiveness of cement-based for stabilization and solidification of spent pot liner inorganic fraction. *J. Hazard. Mater.* 98(2003), 183–190.

L.F. Andrade, J.M.S Campos, L.C. Davide, Cytogenetic alterations induced by SPL (Spent Pot Liner) in meristematic cells of plant bioassays. *Ecotoxicology And Environmental Safety*. 71(2008), 706-710.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), Resíduos Sólidos – Classificação, NBR 10004, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2004.

J. Srodon, V.A. Drits, D.K. McCarty, J.C.C. Hsieh, Eberl D.D., Quantitative X-ray diffraction analysis of clay-bearing rocks from random preparations, *Clays Clay Miner.* 49 (2001) 514–528.

G.P Tomaino, Quantative determination of quartz in calcite, dolomite and t by powder X-ray diffraction analysis, *Analytica Chimica Acta*, 286(1994) 75-80.

R.L. Frost, D.A. Henry, M.L. Weier, W. Martens, *J. Raman Spectrosc.* 37(2006) 722–732.

R.L. Frost, S.J. Palmer, J.M. Bouzaid, B.J. Reddy, *J. Raman Spectrosc.* 38(2007) 68–77.

Y. Wang, C-H. Xu, P. Wang, S-Q. Sun, J-B. Chen, J. Li, T. Chen, J-B. Wang, Analysis and identification of different animal horns by a three-stage infrared spectroscopy *Spectrochimica Acta Part A*. 83(2011) 265–270.

A. Langier-Kuźniarowa, Thermal analysis of organo-clay complexes. In: Yariv, S., Cross, H. (Eds.), *Organo-Clay Complexes and Interactions*. Marcel-Dekker, New York (2002), pp. 273–344.

R. Vijay, T.A. Sihorwala, Identification and leaching characteristics of sludge generated from metal pickling and electroplating industries by Toxicity Characteristics Leaching Procedure (TCLP). *Environ Monit Assess.* 84(2003) 193-202.

D. Feretti, I. Zerbini, E. Ceretti, M. Villarini, C. Zani, M. Moretti, C. Fatigoni, G. Orizio, F. Donato, S. Monarca, Evaluation of chlorite and chlorate genotoxicity using plant bioassays and in vitro DNA damage tests. *Water research* 42(2008) 4075-4082.

N. Koo, H-J. Jo, S-H. Lee, J-G. Kim, Using response surface methodology to assess the effects of iron and spent mushroom substrate on arsenic phytotoxicity in lettuce (*Lactuca sativa* L.), *Jour. Of Haz. Mat.* 192(2011) 381-387.

J. Charles, B. Sancey, N. Morin-Crini, P-M. Badot, F. Degiorgi, G. Trunfio, G. Crini, Evaluation of the phytotoxicity of policontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74 (2011) 2057-2064.

B.J. Young, N.I. Riera, M. E. Beily, P.A. Bres, D.C. Crespo, A.E. Ronco, Toxicity of the effluent an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 76 (2012) 182-186.

B.J. Dutka, Short-term root elongation toxicity bioassay. *Methods for toxicological analysis of Waters, wastewaters and sediments*. National Water Research Institute (NWRI), 1989.

M.A. Lewis, Algae and vascular plant tests. in: Rand, G. (Ed.), Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment, Taylor & Francis Publishers, USA (1995), pp. 135–169.

H.N.B. Gopalan, Ecosystem health and human wellbeing: the mission of the international programme plant bioassays. Mutation Research, 426 (1999) 99–102.

M.E. Valerio, J.F. Garcia, F.M. Peinado, Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). Science Total Environment 378(2007) 63–66.

L.F. Andrade, L.C. Davide, L.S. Gedraite, The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. Ecotoxicology And Environmental Safety, 73(2010), 626-631.

S.S Narwal, D.A Sampietro, C.A.N. Catalan, M.A. Vattuone, B. Poolitycka, Plant Bioassays. Studium Press, LLC, Texas, USA (2009) 334pp.

R Development Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing (2011).

J. Franzaring, A. Klumpp, A. Fangmeirer. Active biomonitoring of airborne fluoride near an HF producing factory using standardised grass cultures. Atmospheric Environment. 41(2007) 4828-4840.

F.B. Abdallah, N. Elloumi, I. Mezghani, M. Boukhris, J.P Garrec, Survival strategies of pomegranate and almond trees in a fluoride polluted area. Comptes Rendus Biologies. 329(2006) 200-207.

O. Barbier, L.A. Mendoza, L.M.D. Raso, Molecular mechanisms of fluoride toxicity. Chemico-Biological Interactions. 188(2010) 319-333.

B.I. Silveira, A.E. Dantas, J.E. Blasquez, R.K.P. Santos, Characterization of inorganic fraction of spent pot Liners: evaluation of the cyanides and fluorides content. *J. Hazard. Mater.* 89 (2002) 177–183.

G. Power, J. Loh, Organic Compounds in the processing of lateritic bauxites to alumina Part1: Origins and chemistry of organics in the Bayer process. *Hydrometallurgy* 105(2010) 1-29.

C. Mico, L. Recatala, M. Peris, J. Sanchez, Assessing heavy metal sources in agricultural soils of a European Mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere* 65(2010) 863–872.

J.E. Owens, E.D. Niemeyer, Analysis of chemical contamination within a canal in a Mexican border colonia. *Environ. Pollut.* 140 (2006) 506–515.

C. Mendiguchia, C. Moreno, M. Garcia-Vargas, Evaluation of natural and anthropogenic influences on the Guadalquivir River (Spain) by dissolved heavy metals and nutrients. *Chemosphere* 69 (2007) 1509–1517.

E. De Miguel, I. Irribarren, E. Chacón, A. Ordoñez, S. Charlesworth, Risk-based evaluation of the exposure of children to trace elements in playgrounds in Madrid (Spain), *Chemosphere* 66 (2007) 505–513.

P. Babula, V. Adam, R. Opatrilova, J. Zehnalek, L. Havel, R. Kizek, Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review, *Environmental Chemical Letter* 6 (2008) 189–213.

D.F. Lisbona, K.M. Steel. Recovery of fluoride values from spent pot-lining: precipitation of an aluminium hydroxyfluoride hydrate product. *Separation and Purification Technology*, 61(2008) 182-192.

S. Chandra, L.K.S Chauhan, R.C. Murthy, P.N. Saxena, P.N. Pande, S.K. Gupta, Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. *Science of the Total Environment* 347(2005) 46-52.

M. Fontecave, J.L. Pierri, Iron Metabolism, toxicity and therapy. *Biochimie*. 75(1993) 767-773.

B. Arrezzini, B. Lunghi, G. Lunharella, C. Gardi, Iron overload enhances the development of experimental liver cirrhosis in mice. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 35(2003) 486-495.

R. Meneghini, Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radical Biology & Medicine*. 23(1997) 783-792.

S-G. Yao, S. Taketa, M. Ichii, A novel short-root gene that affects specifically early root development in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*. 163(2002) 207-215.

D.H. Liu, W.S. Jiang, M.X. Li, 1992. Effects of cadmium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Acta Sci. Circumst.* 12 (1992) 339-406.

G. Ouzounidou, M. Ciamporova, M. Moustakas, S. Karataglis, Responses of maize *Zea mays* L. plants to copper stress—I. Growth mineral content and ultra structure of roots. *Environ. Exp. Bot.* 35(1995) 167-176.

H. Matsumoto, Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 200(2000) 1-46.

I.V. Seregin, L.K. Shpigun, V.B. Ivanov, Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. *Russ. J. Plant Physiol.* 51 (2004) 525-533.

A.A. El-Ghamery, M.A. El-Kholy, M.A.A. El-Yousser. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. *Mutation Research* 537(2003) 29-41.

L.F. Andrade-Vieira, L.S. Gedraite, J.M.S. Campos, L.C. Davide, Spent Pot Liner (SPL) Induced DNA Damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 74 (2011) 822-828.

ARTIGO 2 Avaliação citotóxica comparativa dos principais componentes químicos do *Spent Pot Liner* (SPL)

PALMIERI, M. J. ¹; LUBER, J. ; ANDRADE-VIEIRA, L.F. ²; DAVIDE, L.C. ¹

¹Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

²Departamento de Biologia, Universidade Federal d Espírito Santo (UFES), CEP 29500-000, Alegre, ES, Brasil

Autor Correspondente: Tel: (35) 3829-1356

Endereço de e-mail: lisete.ufla@gmail.com (L.C.Davide)

RESUMO

O presente trabalho estudou os efeitos dos principais componentes químicos (fluoreto, cianeto e alumínio) do *SPL* (*Spent Pot Liner*), um resíduo da produção de alumínio, bem como a interação entre esses efeitos e como cada um desses compostos contribui para a toxicidade do *SPL*. Por meio de análises químicas se determinou a concentração de fluoreto, cianeto e alumínio encontrada nas concentrações referentes ao IC_{50} , $0,5 IC_{50}$ e $1,5 IC_{50}$ do *SPL*. Constatou-se que os três se encontram em concentrações acima das permitidas por organizações de saúde e governamentais. Foi empregado um teste de ciclo celular utilizando-se *Lactuca sativa* como modelo. Observou-se que todos os componentes testados apresentam efeito tóxico. O alumínio é o principal responsável pela redução no IM causada pelo *SPL*. As alterações cromossômicas induzidas pelo resíduo são resultantes de uma interação de seus três principais componentes sem que haja predominância da ação de um ou de outro. A indução de núcleos condensados se deve principalmente a ação do alumínio e do fluoreto e possivelmente indica a ocorrência de morte celular programada.

Palavras-chave: *SPL*. Ciclo celular. IC_{50} . *Lactuca sativa*. Alumínio. Cianeto. Fluoreto.

ABSTRACT

The present work studied the effects of the main chemical components (fluoride, cyanide and aluminum) of SPL (Spent Pot Liner), a waste of the aluminum production, as well as the interactions amongst these effects and how each one of these elements contribute to the SPL toxicity. Through chemical analysis the fluoride, cyanide and aluminum concentration on the concentrations referent to the IC_{50} , $0.5 IC_{50}$ and $1.5 IC_{50}$ of the SPL were determined. It was shown that all 3 of these elements are above the maximum allowed concentrations by governmental and health organizations. A cell cycle test was employed utilizing *Lactuca sativa* as model. All the tested components have toxic effects. Aluminum contributes heavily to the reduction of the MI caused by SPL. Chromosomal alterations inducted by SPL are the result of the joint action of the three tested elements, there is no predominant action of neither of them. The induction of condensate nucleus is due mainly to the effects of aluminum and fluoride and is a strong indicator of the occurrence of programmed cell death

Keywords: SPL. Cell cycle. IC_{50} , *Lactuca sativa*. Aluminum. Cyanide. Fluoride.

1 INTRODUÇÃO

O *Spent Pot Liner (SPL)* é um resíduo sólido da produção de alumínio e é formado por uma série de substância que se acumula nas cubas de redução da alumina durante os processos de purificação e refino da bauxita (SILVEIRA, 2002). Estima-se que cerca de 1 milhão de toneladas desse resíduo seja produzido anualmente no mundo (LISBONA & STEEL, 2008).

O *SPL* pode ser lixiviado, contaminando corpos d'água e plantações ou até mesmo ecossistemas inteiros, representando, portanto, um risco para a saúde humana, além de um grave risco ecológico (CHANDRA et al., 2005).

Entre os diversos compostos que constituem o *SPL* três são apontados como os principais agentes de sua toxicidade: sais de cianeto, de fluoreto e o alumínio (SILVEIRA, 2003 ; ANDRADE 2008).

O alumínio (Al^{3+}) é conhecido por afetar diversos processos fisiológicos e celulares nas plantas, suas ligações são fortes e difíceis de serem desfeitas (CHAPUIS & FAVIER, 1999). Ele pode se acumular nas células e formar depósitos volumosos incompatíveis com o desempenho das funções básicas celulares (GALE, 1987).

O efeito do fluoreto (F^-) nas plantas não é conhecido com clareza (FRANZARING et al., 2007). No entanto, ele pode ser acumulado nestas causando danos que vão desde alterações metabólicas, lesões foliares, redução no crescimento e desenvolvimento, até prejuízos no ecossistema como um todo. Nas folhas, por onde é absorvido da atmosfera pelas plantas, pode ser observada a necrose como principal sintoma de toxidez ao flúor (ABDALLAH et al., 2006).

O cianeto (CN^-) é um contaminante comum do solo e em geral é encontrado associado com gás manufacturado, plantas condutoras de elétrons e em minas de metais preciosos, sendo conhecido por ser tóxico a todos os

organismos. Nos locais onde é encontrado, ele está associado a compostos férricos, apesar dessas formas serem menos tóxicas do que o cianeto livre (CN⁻), ele ainda é perigoso, pois pode ser liberado desses compostos por fotólise (MEEUSSEN et al., 1992; ZIMMERMAN et al., 2007).

A relação que essas substâncias possuem com o solo e com os organismos interessa muito no que se refere ao comportamento do *SPL*. Com isso em mente este trabalho teve como objetivo elucidar os efeitos citotóxicos dos principais componentes do *SPL* e fazer inferências sobre a contribuição desses nos mecanismos de toxicidade do *SPL*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Análise de Composição Química de Soluções do *SPL* para os seus Principais Componentes

Concentrações de *SPL* baseadas em seu IC_{50} (inibição de crescimento 50%) foram analisadas para se determinar sua composição química para seus principais componentes .

2.1.1 Preparação das Soluções

As soluções foram preparadas com intuito de simular o processo de lixiviação natural, dissolvendo *SPL* em $CaCl_2$ a 0,01M. O $CaCl_2$ é utilizado para fornecer a força iônica presente naturalmente nos solos, meio pelo qual o *SPL* contamina o ambiente (ANDRADE et al., 2010). Além disso, $CaCl_2$ não apresenta efeitos tóxicos não comprometendo, portanto, os testes (PALMIERI et al., Capítulo 2) . As soluções foram agitadas a 180 rpm em uma mesa agitadora por 12h, posteriormente deixada em repouso por mais 12h. O procedimento foi repetido 3 vezes até completar um total de 72h. Após as 72h, o sobrenadante foi coletado e filtrado.

Foram preparadas três concentrações de *SPL* (13,25; 26,5; 39,75 g/L de *SPL* – *SPL* 1,2 e 3 respectivamente), As quais foram baseadas no IC_{50} (inibição de crescimento 50%), determinado em ensaios de germinação e crescimento radicular utilizando *Lactuca sativa* como modelo (Palmieri et al, Capítulo 2). As concentrações correspondem à metade do IC_{50} , o próprio IC_{50} e uma vez e meia o IC_{50} respectivamente.

O IC_{50} é uma concentração de grande importância em estudos de toxicidade, pois é alta o suficiente para ter efeitos tóxicos claros, passíveis de

serem mensurados e analisados por diversos bioensaios, sem que seja excessivamente nociva, o que comprometeria o resultado da maioria dos ensaios biológicos. Em termos citogenéticos, é possível a obtenção de raízes de tamanho adequado para a confecção de lâminas.

2.1.2 Análise de Composição Química das Soluções de SPL para Fluoreto, Cianeto e Alumínio

A metodologia utilizada seguiu aquela encontrada no livro “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” 21ª Edição (EATON et al., 2005) para os compostos analisados. A amostragem foi a determinada pela normativa ABNT NBR 9898 (ABNT, 1989).

2.2 Análise de Ciclo Celular

A análise de ciclo celular foi feita utilizando-se *Lactuca sativa* variedade Crespa Grand Rapids para se avaliar os efeitos citotóxicos do SPL.

2.2.1 Tratamento das Raízes

Cianeto de Potássio (KCN), Fluoreto de Sódio (NaF) e Sulfato de Alumínio e Potássio $KAl(SO_4)_2$ foram dissolvidos em $CaCl_2$ a 0,01M para se obter as concentrações de cianeto, fluoreto e alumínio correspondentes às encontradas nas concentrações 0,5 IC_{50} , IC_{50} e 1,5 IC_{50} do SPL determinadas pela análise química. O processo de preparo dessas soluções foi o mesmo daquele utilizado na análise de composição química.

Foram preparadas também soluções de *SPL* idênticas aquelas preparadas durante a análise química pelo mesmo processo. Como controle negativo foi utilizado CaCl_2 a 0,01M.

Sementes de *Lactuca sativa* var. *Crepa Grand Rapidis* (alface) foram colocadas diretamente em placa de petri com papel filtro umedecido com as soluções de fluoreto, cianeto, alumínio e *SPL* separadamente. As raízes foram coletadas após 48h de exposição e fixadas em solução de etanol/ácido acético (3:1) por um período mínimo de 24 horas. A solução de CaCl_2 (0,01M) foi usada como controle negativo.

2.2.2 Análise de Citotoxicidade

As raízes fixadas foram lavadas, hidrolisadas em HCl 1N a 60°C por 10 minutos e coradas com orceína acética. Para o preparo das lâminas, o meristema foi picotado em pequenos pedaços, coberto com lamínula e esmagado em ácido-acético 45%.

As alterações cromossômicas e nucleares foram analisadas em diferentes estágios da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase). A presença de núcleos interfásicos condensados foi usada como indicador do processo de morte celular (ANDRADE, 2008 ; ANDRADE-VIEIRA, 2011). Foi avaliado também o índice mitótico de cada tratamento, dado pela razão entre o total de células em divisão pelo total de células observadas.

Foram avaliadas aproximadamente 1000 células por lâmina e 10 lâminas por tratamento, totalizando 10000 células. Para os testes estatísticos foi utilizado o *software* livre “R” (R *Development Core Team*, 2011) empregando o teste de *Kruskal Wallis*.

3 RESULTADOS

3.1 Análise de Composição Química das Soluções de *SPL* para Fluoreto, Cianeto e Alumínio

Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 1. As concentrações de fluoreto e cianeto elevaram-se à medida que a concentração de *SPL* se elevou, no entanto para o alumínio observou-se a menor quantidade no tratamento de maior concentração de *SPL*.

Tabela 1 Unidades (mg/L) de Fluoreto Cianeto e Alumínio Presentes nas Concentração de *SPL* testadas

Compostos	<i>SPL</i> 1 (0,5 IC₅₀)	<i>SPL</i> 2 (IC₅₀)	<i>SPL</i> 3 (1,5 IC₅₀)	LMP (mg/L)
Fluoreto	0,0577	0,3938	0,435	< 0,001
Cianeto	0,001503	0,0031	0,004592	< 0,0002
Alumínio	0,00167	0,004588	0,0012	-

LMP – Limites Máximos Permissíveis em (Segundo Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG nº 1 – 05/05/2008)

As concentrações de fluoreto, alumínio e cianeto obtidas aqui serão tratadas, de agora em diante, como “Fluoreto”, “Alumínio” e “Cianeto” seguidos de indicadores numéricos (1, 2 e 3), onde 1 indica a concentração do elemento referente ao *SPL* 1 (0,5 IC₅₀), 2 a concentração referente ao *SPL* 2 (IC₅₀) e 3 a concentração referente ao *SPL* 3 (1,5 IC₅₀).

3.2 Análises de Ciclo Celular

Para as duas maiores concentrações de fluoreto não foi possível a confecção de lâminas, pois a inibição no crescimento de raízes e germinação de sementes foi tão forte que não houve a possibilidade de se obter material para montagem de lâminas.

Para os demais tratamentos o índice mitótico (IM), o número de alterações cromossômicas (AC) e o número de núcleos condensados (NC) estão demonstrados na Tabela 2.

O IM apresentou diferenças significativas em relação ao controle apenas para os tratamentos de *SPL* e para o Alumínio 2. A redução máxima no IM foi observada para o *SPL* 3. O IM encontrado nessa concentração foi aproximadamente 83% menor que aquele do controle.

Para as AC, todos os tratamentos testados apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, sendo que o Cianeto 3 foi aquele que apresentou a maior média de alterações cromossômicas por lâmina (11,9% das células), número cerca de 15 vezes maior que o encontrado no tratamento controle.

Para todos os tratamentos avaliados observou-se a ocorrência de pontes cromossômicas, micronúcleos, C-metáfases, cromossomos perdidos e pegajosos como observado na Tabela 3. Nos tratamentos com alumínio e com fluoreto observou-se grande número de pontes e micronúcleos e nos com cianeto houve elevada ocorrência de C-metáfases. Ocorreu grande número de cromossomos pegajosos para todos os tratamentos avaliados. A Figura 1 demonstra uma diversidade de alterações cromossômicas encontradas nos vários tratamentos testados.

Para a presença de NC os testes estatísticos mostraram que todos os tratamentos, com exceção do Alumínio 3 diferem significativamente do

controle. Na maioria dos casos o aumento nesse parâmetro foi acentuado, sendo que no *SPL 3* o número médio de núcleos condensados encontrado foi 542 vezes maior do que no controle.

Tabela 2 Índice Mitótico (IM) médio e média por lâmina do número de Alterações Cromossômicas (AC) e Núcleos Condensados (NC) para cada tratamento

Tratamentos	IM	AC	NC
Controle	5,2 ± 0,38	0,8 ± 0,35	0,2 ± 0,13
<i>SPL 1</i>	1,6 ± 0,47*	3,1 ± 1,72*	7,4 ± 1,92*
<i>SPL 2</i>	2,3 ± 0,46*	7,8 ± 1,6*	6,6 ± 2,78*
<i>SPL 3</i>	0,9 ± 0,47*	7,1 ± 2,89*	108,5 ± 24,6*
Fluoreto 1	4,9 ± 0,36	9,1 ± 1,39*	4,3 ± 1,3*
Fluoreto 2	-	-	-
Fluoreto 3	-	-	-
Cianeto 1	5,1 ± 0,44	9 ± 2,08*	3,3 ± 1,3*
Cianeto 2	5,2 ± 0,30	8,2 ± 0,97*	2,1 ± 0,6*
Cianeto 3	5,6 ± 0,41	11,9 ± 1,54*	2,9 ± 0,92*
Alumínio 1	5,1 ± 0,47	6,6 ± 0,88*	8,3 ± 2,34*
Alumínio 2	3,3 ± 0,38*	6,9 ± 1,41*	15,6 ± 3,26*
Alumínio 3	5,6 ± 0,25	8,6 ± 1,25*	0,6 ± 0,3

Médias seguidas de desvio padrão. Valores marcados com * diferem significativamente do controle

Tabela 3 Porcentagem das alterações observadas em relação ao total de alterações encontradas para cada elemento testado

	Ponte s	Perdidos	C- metáfases	Pegajoso s	Micronúcleos
<i>SPL</i>	18.07	16.87	19.28	31.33	14.46
Fluoreto	27.27	8.08	5.05	43.43	16.16
Cianeto	5.48	13.70	23.29	54.79	2.74
Alumíni o	25.64	5.13	6.41	47.44	15.38

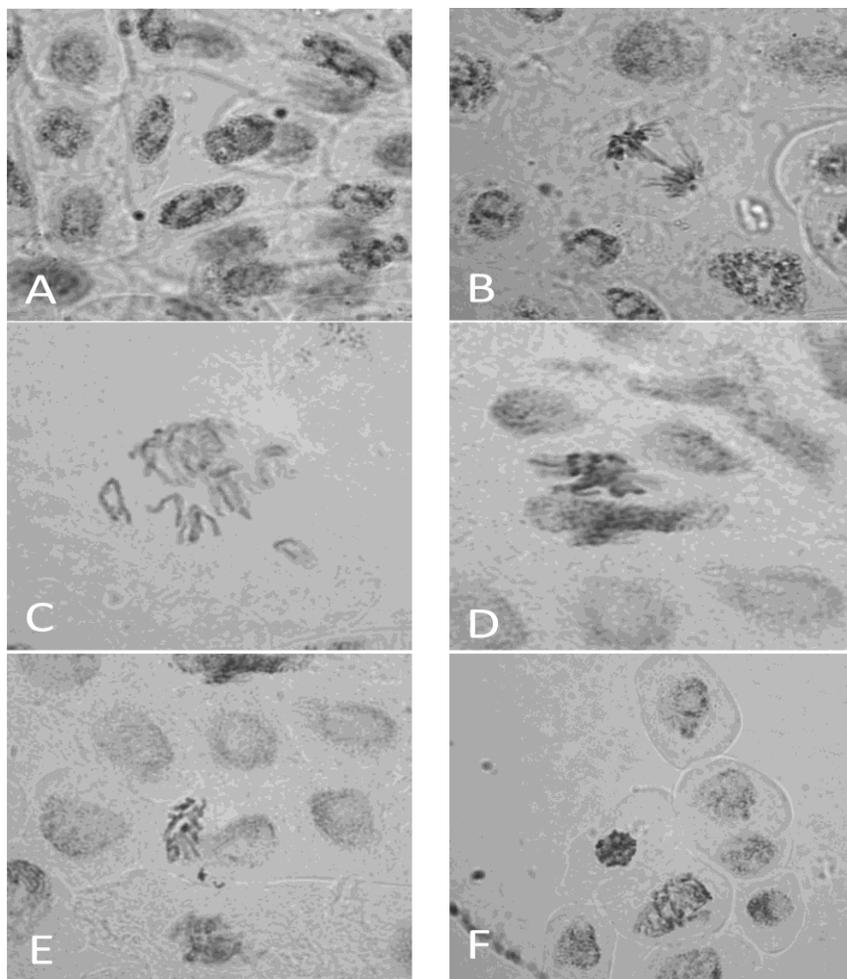


Figura 1 Alterações cromossômicas encontradas nos diversos tratamentos.

Nota: A - micronúcleos em células interfásicas (Alumínio 2); B - Ponte cromossômica em anáfase (Alumínio 2); C - C-metáfase (Cianeto 2); D - *Stickness* cromossômico em metáfase (Fuoreto 2); E - Cromossomos perdidos em metáfase (Fuoreto 2); F- Núcleo Condensado (*SPL* 2) . Imagens capturadas em objetiva de 100x.

4 DISCUSSÃO

As análises químicas comprovam a presença de fluoreto, cianeto e alumínio nas soluções de *SPL*, o que está de acordo com o encontrado por Andrade et al. (2008).

Para o alumínio nota-se que na maior concentração de *SPL* a sua concentração reduz. Essa redução na concentração de alumínio em solução à medida que a concentração de *SPL* se torna mais elevada também condiz com o que foi observado por Andrade et al. (2008) e possivelmente está relacionada com o limite de dissolução de substâncias no solvente e com o pH.

O alumínio possui baixa solubilidade em meios aquosos (HEM et al., 1973). Como o *SPL* é formado por uma mistura de substâncias (SILVEIRA,2002; ANDRADE et al.,2008; PALMIERI et al., Capítulo 2) a medida que a concentração do composto aumenta, aumenta também a concentração de todas as suas substâncias componentes, isso satura o solvente com substâncias que se dissociam mais facilmente como sais de fluoreto e cianeto, o que faz com que parte do alumínio contido no *SPL* se precipite e não dissolva. Além disso, o alumínio tem maior facilidade de se dissolver em pHs ácidos, e o *SPL* possui pH básico (PALMIERI et al.,Capítulo 2)

Esse fato é provavelmente um indício de que em ambientes naturais o alumínio contido no *SPL* seja menos móvel que seus demais componentes, e represente, portanto menor risco ecológico.

No entanto, a concentração de alumínio encontrada em todas as três concentrações de *SPL* testadas excedeu o máximo considerado aceitável para alumínio em solução pela Organização Mundial de Saúde (0,2 mg/L) (OMS,1998). Em humanos, intoxicação por alumínio pode estar associada à doença de *Alzheimer* e também a duas outras síndromes neurodegenerativas

graves, *Parkinson* e esclerose amiotrófica lateral (CHAPUIS & FAVIER, 1999; GARRUNTO et al. 1990).

As concentrações de cianeto e fluoreto encontradas foram consideravelmente superiores aos limites máximos permissíveis estabelecidos no Brasil pelas normas federais (COPAM/CERH-MG nº1, 2008). Esse fato é especialmente preocupante quando se considera o potencial tóxico desses dois compostos, principalmente no que diz respeito a saúde humana.

A exposição em curto prazo a compostos cianídricos pode causar tremores, dificuldades respiratórias e diversos sintomas neurológicos. Já a exposição por períodos prolongados é mais perigosa podendo causar perda de peso, danificação de células nervosas, problemas tireoidianos podendo levar à morte. Irritações e feridas podem ser causadas por contato direto com líquidos contendo cianeto em solução (DASH et al., 2009).

Já a exposição excessiva e prolongada ao fluoreto pode levar a um problema sério conhecido como fluorose. Os principais sintomas da fluorose são manchas dentárias e deformidades esqueléticas. Isso ocorre devido à ação desse íon sobre as células ósseas (osteoblastos e osteoclastos). Adicionalmente, já foi relatada a ação danosa do fluoreto sobre células de tecidos moles, como nos rins, sistema nervoso e gônadas (NRC, 2006).

Nas análises citogenéticas o efeito tóxico do *SPL* fica mais uma vez comprovado, assim como fica também provado os riscos que os seus principais componentes trazem a sistemas biológicos.

Pela avaliação do IM é possível concluir que a sua redução se dá principalmente pela ação do alumínio. O *SPL* inibe o crescimento radicular (ANDRADE et al, 2008, 2010; PALMIERI et al, Capítulo 2) e já foi demonstrado que a principal ação tóxica do alumínio em plantas é exatamente o seu potencial de inibir crescimento radicular (MATSUMOTO, 2000; KOLLMEIER et al., 2000; FRANTZIOS, 2001). O alongamento de raízes está

diretamente relacionado ao crescimento celular, assim como o índice de proliferação celular, logo o alumínio tem uma ação direta nesse fator.

Alterações cromossômicas são reconhecidas como importantes consequências de ações genotóxicas de agentes químicos (NATARAJAN, 2002). Os resultados deste trabalho compactuam com os de Andrade et al. (2008) e provam mais uma vez que o *SPL* induz as AC.

A presença predominante de pontes e micronúcleos sugere forte ação clastogênica dos tratamentos de alumínio e fluoreto. Pontes cromossômicas podem levar a quebras e formar fragmentos cromossômicos acêntricos (LEME & MARIN-MORALES, 2008). Por sua vez fragmentos cromossômicos livres no citoplasma celular podem ser envoltos por uma membrana e originar micronúcleos (MA et al., 1995).

Para o cianeto observou-se grande concentração de C-metáfases. Essa alteração indica um efeito predominantemente aneugêncio desse composto nas concentrações avaliadas, ele promove alterações no funcionamento do fuso mitótico, resultando em um processo de divisão celular anormal que pode levar a formação de células aneuploides ou até mesmo com ploidia distinta do padrão da espécie (FENECH, 2000).

O *SPL* por sua vez apresenta relativo equilíbrio entre a ocorrência de AC clastogênicas e aneugênicas. Devido a isso é possível supor que nenhum dos principais compostos do *SPL* esteja contribuindo de forma mais predominante para a toxicidade do *SPL* e sim que essa se dá pela ação em sinergia desses compostos.

Nota-se também que os tratamentos com *SPL* apresentam AC em número menor do que a maioria dos demais tratamentos. Isso está provavelmente relacionado ao fato de existir uma quantidade bem elevada de NCs nestes. NCs são considerados marcadores citológicos de morte celular programada (MCP), um mecanismo de autodefesa encontrado na maioria dos

organismos vivos que visa eliminar células que apresentem danos genéticos, a fim de evitar que esses se proliferem e sejam herdados (DANON et al., 2000, ANDRADE-VIEIRA et al., 2011).

Sabe-se também que quebras na dupla fita de DNA são a principal lesão responsável pela formação de aberrações cromossômicas (NATARAJAN & OBE, 1978; OBE et al., 1992; BRYANT, 1998). Dessa forma o grau de dano genético é, provavelmente, maior no *SPL* do que nos demais compostos testados, o que obriga o vegetal a lançar mão da MCP para tentar corrigir esses danos.

Outro forte indício de que a MCP pode estar ocorrendo é a presença de cromossomos pegajosos. A ocorrência desses se dá após alterações na estrutura cromossômica que promove a perda das características normais de condensação causando a formação de aglomerados (SILVA & FONSECA, 2004). Essa alteração está normalmente associada a um forte efeito citotóxico, é irreversível e pode levar à morte celular (EL-GHAMERY et al, 2003). Além disso, cromossomos pegajosos podem ocasionar perdas cromossômicas já que o processo de divisão ocorre de maneira irregular e alguns cromossomos podem não se aderir ao aglomerado cromossômico formado sendo, portanto, perdidos durante o ciclo celular.

É importante frisar que a relativa alta taxa de ACs encontrada na única concentração de fluoreto em que a confecção de lâminas foi possível (maior do que aquelas encontradas para todas as concentrações de cianeto e alumínio referentes a 0,5 IC_{50} ou ao IC_{50} do *SPL*) conjuntamente com o fato dos maiores tratamentos de fluoreto terem inibido totalmente o crescimento radicular e impedido a germinação de sementes é um forte indicador de que a principal ação desse composto no *SPL* é a indução de morte celular, o que explicaria o fato da maior concentração de *SPL* analisada apresentar um número de NCs tão superior ao controle e a todos os demais tratamentos.

Por último, o fato do fluoreto, quando isolado, ter uma ação tóxica tão acentuada a ponto de impedir a obtenção de material viável para a montagem de lâmina e não ter esse mesmo efeito drástico quando presente em mesma concentração na solução de *SPL* está, provavelmente, ligado ao fato do alumínio ter a capacidade de se complexar com uma série de substâncias orgânicas e inorgânicas, entre elas o fluoreto (CCME, 1988; ISO, 1994). Com concentrações tão elevadas de fluoreto não é difícil imaginar que essa complexão esteja ocorrendo, isso tornaria o fluoreto menos disponível no meio atenuando seus efeitos. Esse fato pode estar ligado também com a redução nas concentrações de alumínio disponíveis em solução observada na maior concentração de *SPL*.

Os dados observados neste trabalho são fortes indicadores de que os diversos componentes do *SPL* tem ação sinérgica como havia sido proposto por Andrade et al. (2008). Além disso, este trabalho apresentou estudos citogenéticos da ação tóxica do fluoreto em modelos vegetais, estudos estes que nunca antes haviam sido feitos, o que permite elucidar melhor a ação desse composto em plantas.

5 CONCLUSÃO

Foi comprovado mais uma vez o potencial tóxico do *SPL* e que o emprego de testes químicos conjuntamente com bioensaios é bastante eficiente para estudos toxicológicos. O *SPL* possui concentrações elevadíssimas de seus principais compostos, todas acima do permitido por agências de saúde e leis federais.

A redução no IM observado nos testes citogenéticos se dá principalmente pela ação do alumínio, as ACs são advindas da ação harmônica entre os componentes do *SPL* e os NCs são, provavelmente, decorrentes principalmente da ação dos sais de fluoreto.

É possível que em concentrações elevadas do *SPL* o fluoreto se complexa com o alumínio e se torne menos disponível no meio, tendo seus efeitos tóxicos atenuados.

Este trabalho apresentou dados inéditos do efeito citotóxico do fluoreto em células vegetais mostrando que esse apresenta alta capacidade de formação de núcleos condensados, alterações cromossômicas e redução de índice mitótico. Além disso, foi constatado que as duas maiores concentrações testadas do composto apresentam grande potencial fitotóxico.

REFERÊNCIAS

B.I. Silveira, A.E. Dantas, J.E. Blasquez, R.K.P. Santos, Characterization of inorganic fraction of spent pot Liners: evaluation of the cyanides and fluorides content. *J. Hazard. Mater.* 89 (2002) 177–183.

D.F. Lisbona, K.M. Steel. Recovery of fluoride values from spent pot-lining: precipitation of an aluminium hydroxyfluoride hydrate product. *Separation and Purification Technology*, 61(2008) 182-192.

S. Chandra, L.K.S Chauhan, R.C. Murthy, P.N. Saxena, P.N. Pande, S.K. Gupta, Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using Allium test. *Science of the Total Environment* 347(2005) 46-52.

B.I. Silveira, A.E. Dantas, J.E. Blasquez, R.K.P.Santos, Effectiveness of cement-based for stabilization and solidification of spent pot liner inorganic fraction. *J. Hazard. Mater.* 98(2003), 183–190.

L.F. Andrade, J.M.S Campos, L.C. Davide, Cytogenetic alterations induced by *SPL* (Spent Pot Liner) in meristematic cells of plant bioassays. *Ecotoxicology And Environmental Safety*. 71(2008), 706-710.

F.B. Abdallah, N. Elloumi, I. Mezghani, M. Boukhris, J.P Garrec, Survival strategies of pomegranate and almond trees in a fluoride polluted area. *Comptes Rendus Biologies*. 329(2006) 200-207.

J.C.L Meeussen, M.G. Keizer, F.A.M. Dehaan, Chemical stability and decomposition rate of iron cyanide complexes in soil solutions. *Environmental Science Technology*, 26(1992) 511-516.

A. Zimmerman, D-H. Kang, M-Y Ahn, S Hyun, M.K. Banks, Influence of a soil enzyme on iron-cyanide complex speciation and mineral adsorption. *Chemosphere*. 70(2007) 1044-1051.

L.F. Andrade, L.C. Davide, L.S. Gedraite, The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 73(2010), 626-631.

A.D. Eaton, M.A.H. Franson, Standard methods for examination of water & wastewater 21st edition. American Water Works Association, Water Environment Federation - American Public Health Association (2005).

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), Preservação e técnicas de amostragem de afluentes líquidos e corpos receptores - Procedimento, NBR 9898, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1989.

L.F. Andrade-Vieira, L.S. Gedraite, J.M.S. Campos, L.C. Davide, Spent Pot Liner (SPL) Induced DNA Damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 74 (2011) 822-828.

R Development Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing (2011).

J.D. Hem, C.E. Roberson, C.J. Lind, W.L. Polzer, Chemical interactions of aluminium and aqueous silica at 25°C. Geological Survey, Water Supply Paper (1973).

OMS (Organização Mundial de Saúde), Guidelines for drinking-water quality, 2^aed. Genebra, Suíça (1998) 3-13.

P. Chapuis, A. Favier, Trace elements in nutrition and therapeutic. *Med. Int.* (1999) 131-137.

R.M. Garrunto, R. Yanagihara, D.C. Gajdusek, Models of environmentally induced neurological disease: epidemiology and etiology amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia in the Western Pacific. *Environmental Geochemistry Health*, 12(1990) 137–151.

COPAM(Conselho Estadual Político Ambiental)/CERH-MG (Conselho Estadual de Recursos Hídricos do Estado de Minas gerais). Deliberação normativa conjunta nº 01. (2008).

R.R. Dash, A. Ghaur, C. Balomajumder, Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *Journal Of Hazardous Materials*, 163(2009).

H. Matsumoto, Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 200(2000) 1–46.

M. Kollmeier, H.H. Felle, W.J. Horst. Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? *Plant Physiology*, 122 (2000) 945-956.

G. Frantzios, B. Galatis. P. Apostolakos. Aluminum effects on microtubule organization in dividing root tip cells of *Triticum turgidum*. II. Cytokinetic cells. *Journal of Plant Research*. 114(2001)157-170.

A.T. Natarajan, Chromosome Aberrations: past, present and future, *Mutation Research*, 504 (2002) 3-16.

D.M. Leme, D.F. Angelis , M.A. Marin-Morales. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquatic Toxicology* 88 (2008) 214–219.

T.H. Ma, The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*. 334(1995) 185-195.

M. Fenech, The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*. 455(2000) 81-95.

A. Danons. Review Plant programmed cell death : A common way to die. *Nature*, 38 (2000) 647-655.

A.T. Natarajan, G. Obe, Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations . Part 1: utilization of neurospora endonuclease for the study of aberration production in G2 stage of cell cycle, *Mutation Research*. 52(1978).

G. Obe C. Johanes, D. Schulte-Frohlinde, DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation, *Mutagenesis*, 7(1992) 3-12.

P.E. Bryant, Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis, *Mutation Research*, 404(1998) 107-111.

J. Silva, M.B.M Fonseca, Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana. *Genética Toxicológica* (2003) 70-84.

A.A. El-Ghamery, M.A. El-Kholy, M.A.A. El-Yousser. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. *Mutation Research* 537(2003) 29-41.

CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment), Canadian water quality guidelines. (1998).

ISO (International Organization for Standardization) Water quality —
Determination of aluminium: spectrometric method using pyrocatechol violet.
(1994).

ARTIGO 3 Danos ao DNA de linfócitos humanos devido à ação do *Spent Pot Liner (SPL)* e seus principais componentes

PALMIERI, M. J. ¹; MARCUSSI, S. ²; TRENTO, M.V.C. ²; ELEUTÉRIO, M. W. ²; ANDRADE-VIEIRA, L.F. ³; DAVIDE, L.C. ¹

¹Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

² Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras (UFLA), CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

³Departamento de Biologia, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), CEP 29500-000, Alegre, ES, Brasil

Autor Correspondente: Tel: (35) 3829-1356

Endereço de e-mail: lisete.ufla@gmail.com (L.C.Davide)

RESUMO

O *SPL* é um resíduo sólido tóxico da produção de alumínio. Os efeitos dos principais componentes químicos (fluoreto, cianeto e alumínio) do *SPL* e como cada um destes compostos contribui para a capacidade de induzir danos ao DNA foram avaliados. O ensaio do cometa, uma técnica que demonstra e quantifica a fragmentação do DNA, foi aplicado para tal finalidade. Utilizou-se linfócitos humanos obtidos a partir do sangue de quatro doadores saudáveis entre as idades de 20-40 anos. Os cometas foram avaliados visualmente e classificados com *scores* de 0 a 4 baseados no dano observado (0 - menor que 5%, 1- entre 5 e 20%, 2- entre 20 e 40%, 3- entre 40 e 95%, 4- acima de 95% de dano ao material genético). Os *scores* obtidos foram multiplicados as suas respectivas frequências de ocorrência e somados gerando um valor único de Unidades Arbitrárias (UA) para cada tratamento. Observou-se que todos os tratamentos induziram a fragmentação do DNA. O fluoreto apresentou um valor de UA próximo ao do *SPL* (258 e 270, respectivamente), o que, aliado a dados obtidos em outros trabalhos, mostra que ele é, provavelmente, o principal agente da capacidade do *SPL* de gerar danos ao material genético. O alumínio apresentou valor de UA intermediário (165,9), enquanto o cianeto teve o valor mais reduzido (110,5).

Palavras-chave: *SPL*. Ensaio cometa. Linfócitos humanos. Alumínio. Cianeto.

Fluoreto.

ABSTRACT

SPL is a solid and toxic waste of the aluminum production. This paper studied the effects of the main chemical components of this waste (fluoride, cyanide and aluminum) and how each one of these elements contribute to SPL's potential to cause DNA damage. This was achieved through the comet assay, an assay that demonstrates and quantifies the DNA-laddering or fragmentation. Human lymphocytes obtained from the blood of 4 healthy volunteers of ages between 20-40 years were used as test subjects. The comets were evaluated visually and classified with scores ranging from 0 to 4 based on the damage observed (0- less than 5%, 1- between 5 and 20%, 2- between 20 and 40%, 3- from 40 to 95% , 4- over 95% damage to the genetic material) . These scores were multiplied with their respective frequencies and then added generating a single value of Arbitrary Units (AU) for each treatment. It was observed that every treatment induced DNA fragmentation. Fluoride displayed an AU value similar to the SPL itself (258 and 270 respectively), this data in addition with results from past researches demonstrate that fluoride is probably the main agent of SPL's PCD inductor potential. Aluminum had an intermediary AU value (165,9) while cyanide had the smallest AU value (110,5).

Keyworlds: SPL. Comet assay. Human lymphocytes. Aluminum. Cyanide. Fluoride.

1 INTRODUÇÃO

O *Spent Pot Liner (SPL)* é um resíduo sólido tóxico da produção de alumínio, e pode se lixiviar e contaminar corpos d'água e plantações, representando, portanto, um risco para os humanos, além de poder contaminar ecossistemas representando um grave risco ecológico (CHANDRA et al., 2005).

Esse composto é formado por uma mistura de substâncias (SILVEIRA, 2003; ANDRADE et al., 2008; PALMIERI et al., Capítulo 2), dentre as quais os sais de fluoreto, cianeto e o alumínio são apontados como os principais responsáveis pela toxicidade do composto (SILVEIRA, 2003; ANDRADE, 2008). Estima-se que cerca de 1 milhão de toneladas desse resíduo seja produzido anualmente no mundo (LISBONA & STEEL, 2008).

Até o presente momento apenas testes com modelos vegetais foram aplicados para se avaliar a toxicidade do *SPL*, no entanto sabe-se que esses modelos apresentam uma boa relação com os testes em animais (FISKESJÖ, 1985; CHAUHAN et al., 1999). É possível, portanto, avaliar o efeito do *SPL* e seus principais componentes em células animais e fazer relações dos resultados obtidos com aqueles já disponíveis em trabalhos anteriores, como os de Andrade-Vieira et al. (2011) e Palmieri et al. (Capítulo 3) que mostraram a capacidade do *SPL* de induzir morte celular programada (MCP) entre outros danos celulares.

Um dos principais marcadores moleculares da MCP é o “DNA laddering”, ou a fragmentação do DNA (DOORN & WOULTERING, 2005, 2010; GICHNER, 2005). Uma forma efetiva de se evidenciar essa fragmentação é através do ensaio cometa. Esse teste é altamente sensível e tem sido utilizado para detectar um amplo espectro de danos no material genético (YILDIZ et al., 2009). Nesse ensaio o dano ao material genético é determinado pela distância de migração do DNA a partir da posição de fixação do nucleóide em um gel de

agarose, após eletroforese, bem como pela espessura e comprimento da cauda do “cometa” formado (SIGHN, 2000). A intensidade da fluorescência da cauda pode ser levada em consideração também nessa avaliação (YILDIZ et al., 2009).

Essa técnica vem sendo utilizada em vários trabalhos e em sua maioria é aplicada em modelos animais. Para humanos utiliza-se principalmente linfócitos como modelo. Ritter e Knebel (2009) destacam a crescente importância que esse teste vem tendo nos estudos de toxicidade. O ensaio cometa é rápido, econômico e de alta especificidade e sensibilidade (AZQUETA et al., 2011).

A gama de substâncias que o ensaio cometa permite avaliar é muito ampla, indo desde a prospecção do potencial antígenotóxico de plantas medicinais (KAUR et al., 2010) até o efeito de peçonha de serpentes (MARCUSI et al., 2011), o que mostra que é um teste de grande utilidade em estudos de análises toxicológica.

Este trabalho visa através do ensaio cometa avaliar os danos causados pelo *SPL* e seus principais componentes fracionais ao DNA de linfócitos humanos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparação das Soluções

O preparo das soluções seguiu o método empregado nos trabalhos de Andrade et al. (2008) e Palmieri et al. (Capítulos 2 e 3).

Foram preparadas soluções de *SPL* e seus principais componentes (cianeto, fluoreto e alumínio). Dissolveu-se *SPL* sólido, Cianeto de Potássio (KCN), Fluoreto de Sódio (NaF) e Sulfato de Alumínio e Potássio $KAl(SO_4)_2$ em $CaCl_2$ a 0,01M com o intuito de simular o processo de lixiviação natural do *SPL* (ANDRADE et al., 2008). As concentrações das soluções foram obtidas através da análise de composição química do IC_{50} do *SPL*, determinadas por Palmieri et al. (Capítulo 3) e corresponderam a 23,6; 0,394; 0,0046 e 0,0031 g/L de *SPL*, cianeto, fluoreto e alumínio respectivamente.

2.2 Ensaio Cometa

2.2.1 Preparo da Solução de Lise

Foi preparada um solução estoque contendo 2,5M de NaCl, 100mM de EDTA e 10mM de Tris diluídos em água autoclavada. O pH da solução foi acertado para 10. Na hora do uso dessa solução foi adicionado a 100 mL da solução estoque, com as luzes apagadas, 10mL de Tritom X-100 e 100 mL de DMSO.

2.2.2 Preparo da Solução de Neutralização

Foi preparada uma solução de 0,4M de Tris. O pH dessa solução foi acertado para 7,5.

2.2.3 Preparo da Solução de Eletroforese

Foi misturado 5mL de uma solução de 2,5g/L de NaOH com 30mL de uma solução de 0,075g/L de EDTA, a solução foi completada para 1 litro com água autoclavada.

2.2.4 Preparo das Lâminas

As lâminas foram preparadas segundo a metodologia de Singh et al. (1988). Os testes foram feitos utilizando-se linfócitos humanos obtidos a partir do sangue de 4 doadores saudáveis de idades entre 20-40 anos após o consentimento dos mesmos. O sangue de cada voluntário correspondeu a um ensaio distinto.

Para montagem das lâminas foi adicionado 100 μ L de cada tratamento a frascos contendo 500mL de sangue por um período de 4 horas. Em seguida misturou-se uma alíquota de 20 μ L de sangue + tratamento de cada frasco diluídos em 500 μ L com 100 μ L de agarose de baixo ponto de fusão. A mistura foi homogeneizada e uma alíquota adicionada a uma lâmina de vidro revestida previamente por agarose de ponto de fusão normal, sendo imediatamente coberta por lamínula. Posteriormente, para cada tratamento foram montadas 3 lâminas e avaliou-se 100 células por lâmina totalizando 300 células por tratamento. Os procedimentos descritos acima foram realizados no escuro.

Após o preparo as lâminas foram levadas para um refrigerador por 10 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram removidas e as lâminas introduzidas em solução de lise “*overnight*” a 4°C. Esse processo é responsável pela eliminação de eritrócitos, plaquetas e a maioria das estruturas celulares do linfócito deixando apenas o nucleóide intacto (MARCUSSEI et al., 2011).

Como controle negativo utilizou-se uma solução de CaCl₂ a 0,01M pura e como controle positivo se utilizou Doxorubicina, droga antitumoral, em concentração de 2µg/mL.

2.2.5 Eletroforese

As lâminas foram transferidas da solução de lise para uma solução de eletroforese resfriada onde foram mantidas por 20 minutos. Em seguida correu-se a eletroforese em uma voltagem de 25V e amperagem de 300mA por um período de 20 minutos. Após a eletroforese as lâminas foram imersas em solução de neutralização por 25 minutos. Finalmente o DNA foi precipitado em etanol por 3 minutos e as lâminas secas em temperatura ambiente.

2.2.6 Coloração e Avaliação das Lâminas

As lâminas foram coradas com iodeto de propídeo (3,5µg/L) e em seguida avaliadas em microscópio de fluorescência em aumento de 400x. Os cometas foram avaliados visualmente seguindo o critério de Collins et al. (1997). Os cometas foram categorizados em “*scores*” de 0 a 4 conforme o dano observado através da comparação do tamanho da cauda em relação a cabeça, sendo 0 referente a nenhum dano e 4 referente a altíssimo dano (cabeça inexistente ou praticamente inexistente e cauda longa). As porcentagens de dano

ao DNA associadas a cada *score* foram: 0 - menor que 5%, 1- entre 5 e 20%, 2- entre 20 e 40%, 3- entre 40 e 95%, 4- acima de 95%.

2.2.7 Análises Estatísticas

Os *scores* obtidos foram multiplicados pela frequência de células que apresentaram cada *score* para um dado tratamento obtendo-se um valor de Unidades Arbitrárias (UA) que varia de 0 até 400 para cada tratamento (0 indica ausência total de danos e 400 dano máximo) (KOCYIGIT et al.,2005). Comparou-se o valor de UA de cada tratamento pelo teste de Duncan utilizando-se *software* livre “R” (R Development Core Team, 2011).

3 RESULTADOS

Foi possível observar cometas de todos os graus, o controle negativo apresentou cometas de grau 2 no máximo, enquanto que os demais tratamentos apresentaram todas as classes de cometas. A Figura 1 demonstra alguns exemplos de cometas observados neste trabalho.

Todos os tratamentos diferiram significativamente do controle negativo. Os valores de UA encontrados para o *SPL* foram os maiores, superando inclusive os do controle positivo, tendo sido mais do que 16 vezes superiores àqueles obtidos para o controle negativo. Além disso, 92% dos nucleoides observados apresentaram algum grau de dano para o *SPL*. O fluoreto também causou elevada porcentagem de nucleoides danificados (90%), sendo que em ambos os casos o valor foi praticamente idêntico aquele encontrado para o controle positivo (94%). A Tabela 1 representa os resultados observados.

Tabela 1 Dano observado em linfócitos humanos após os diferentes tratamentos

<i>Scores</i>	0	1	2	3	4	% de Nucleoides Danificados	UA
<i>SPL</i>	8,58 ± 2,90	12,41 ± 2,28	13,16 ± 3,79	34,75 ± 5,91	31,75 ± 4,95	92%	270 ± 32,6*
Fluoreto	10,58 ± 1,67	10,00 ± 3,68	18,83 ± 4,58	35,00 ± 8,16	26,33 ± 8,31	90%	258 ± 27,3*
Cianeto	23,00 ± 4,64	46,08 ± 4,18	28,25 ± 4,82	2,41 ± 1,82	0,17 ± 0,29	77%	110,5 ± 12,4*
Alumínio	15,08 ± 3,65	26,83 ± 3,31	44,00 ± 8,56	10,25 ± 3,35	5,08 ± 3,64	85%	165,9 ± 11,8*
CaCl ₂	83,83 ± 5,02	15,58 ± 4,68	0,58 ± 0,57	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	16%	16,5 ± 2,4*
Doxorubicina	6,00 ± 1,77	10,91 ± 4,07	20,42 ± 3,65	46,08 ± 5,47	17,41 ± 3,04	94%	259,7 ± 19*

Médias seguidas de desvio padrão

UA- Unidades Arbitrárias. Valores marcados com * diferem significativamente do controle negativo

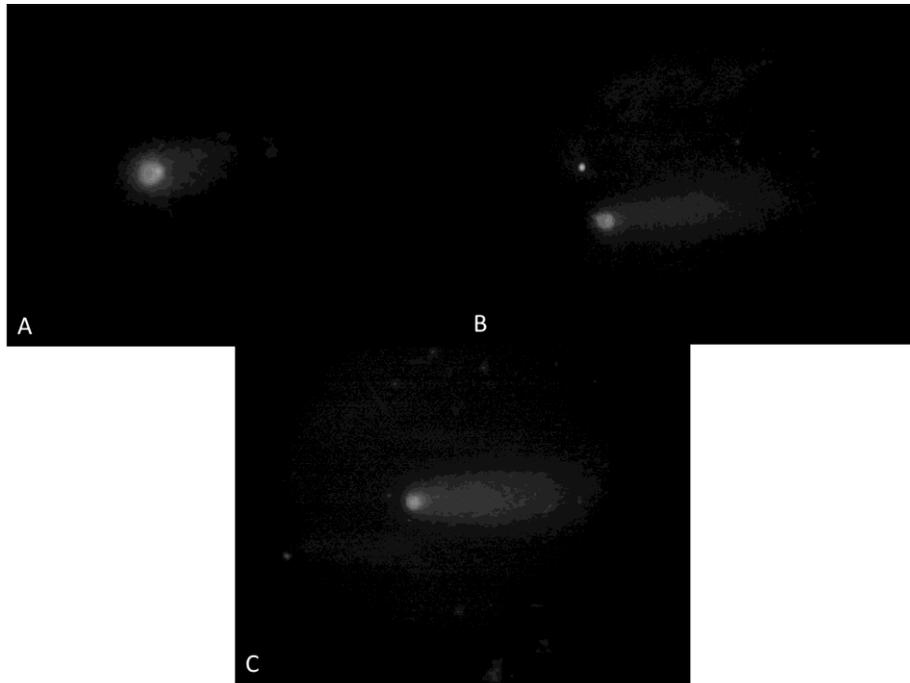


Figura 1 Exemplos de cometas observados.

Nota: A- Cometa grau 1; B- Cometa grau 2; C – Cometa grau 3. Poderia incluir o que causou cada um dos cometas

4 DISCUSSÃO

Os dados apresentados neste trabalho, aliados aos dados observados por Andrade-Vieira et al. (2011), onde ficou evidenciado pelo teste de TUNEL a presença de danos na estrutura do DNA de *Allium cepa* provocados pelo *SPL*, comprova irrefutavelmente o potencial desse composto de induzir danos ao material genético. Além disso, fica evidente seu efeito tóxico nos dois tipos de células, vegetais e animais. Deve-se salientar, no entanto, que o TUNEL demonstra a ocorrência de fragmentação no DNA através da marcação das extremidades 3`OH livres da molécula (BEHBOODI & SAMADI, 2004), no entanto não é tão eficiente quanto o cometa na quantificação da intensidade ou severidade dessa fragmentação, uma vez que esse segundo permite a avaliação do grau de fragmentação através da análise do arraste observado (SIGHN, 2000).

Dentro desse contexto foi possível observar que o *SPL* possui grande capacidade de induzir fragmentação do material genético de células humanas tendo apresentado valores de UA superiores inclusive ao controle positivo, além disso, apresentou uma porcentagem total de nucleoides danificados próxima de 100%. Essa capacidade é, provavelmente, decorrente da ação de seus diversos componentes fracionais em sinergia.

O fluoreto também foi capaz de causar danos acentuados ao material genético apresentando valores de UA quase idênticos ao controle positivo, além de alta porcentagem de nucleoides danificados, analogamente ao que foi observado para o *SPL*. Sabe-se que em modelos vegetais, nas folhas, por onde é absorvido da atmosfera, o fluoreto provoca necrose do tecido foliar (ABDALLAH et al., 2006), o que pode ser relacionado com o alto potencial indutor de danos ao material genético observado para esse composto no presente trabalho.

O ensaio cometa apresenta uma boa correlação com os testes citogenéticos de análise de ciclo celular e aberrações cromossômicas (HARTMANM et al., 2003, GIANNOTTI et al., 2002). Os dados apresentados por Palmieri et al (Capítulo 3) mostram que o fluoreto induz a formação de um grande número de núcleos condensados, considerado um dos principais marcadores citológicos da MCP (DANON et al., 2000), o que reforça a ideia de que o fluoreto tem alta capacidade de provocar a fragmentação do material genético. A principal ação do fluoreto no *SPL* é provavelmente a indução de morte celular (PALMIERI et al, Capítulo 3).

O alumínio também levou a um aumento significativo dos valores de UA, mas esses foram inferiores àqueles observados para o fluoreto e ao controle positivo, mesmo assim 85% dos nucleoides avaliados apresentaram algum grau de dano. Sabe-se que uma das principais ações tóxicas desse composto em vegetais é o retardamento do desenvolvimento normal da raiz e que isso se relaciona diretamente com a capacidade desse composto de reduzir o índice mitótico dos vegetais (MATSUMOTO, 2000; KOLLMEIER et al., 2000; FRANTZIOS, 2001, CAPÍTULO 3). O índice mitótico é caracterizado pelo número total de células em divisão durante o ciclo celular. Esse índice pode ajudar a determinar o grau de toxicidade de um agente (FERNANDES et al, 2007). Uma das causas dessa redução é exatamente a indução de danos genéticos que possam provocar aberrações cromossômicas e/ou levar à MCP impedindo a proliferação celular normal (KURÁS et al., 2006).

O cianeto exibiu os menores valores de UA comparativamente, mesmo assim, esses valores foram significativamente distintos do controle negativo, o que vai de acordo com o observado por Palmieri et al. (Capítulo 3), onde se constatou que o cianeto induz a formação de núcleos condensados e promove alterações cromossômicas. Além disso, pode-se observar que o cianeto provocou danos em algum grau em 77% dos nucleoides avaliados.

Palmieri et al. (Capítulo 3) observaram que dentre os principais componentes do *SPL* o cianeto tem o menor potencial indutor de condensação nuclear, isso se relaciona bem com os dados obtidos no presente trabalho e indica que a contribuição do cianeto para a capacidade de o *SPL* promover a fragmentação no DNA é reduzida em relação aos demais componentes do mesmo.

Esse elemento apesar de se encontrar em concentrações cerca de 15 vezes superiores do *SPL* em relação às permitidas pelas legislações nacionais está em quantidades muito inferiores àquelas observadas para o fluoreto (PALMIERI et al., Capítulo 2), o que provavelmente se relaciona com o fato do primeiro não possuir uma ação tão acentuadamente tóxica quanto o segundo.

É importante ressaltar que o alumínio tem a capacidade de se complexar com uma série de substâncias orgânicas e inorgânicas, como o fluoreto e o cianeto (CCME, 1988; ISO, 1994). Isso provavelmente atenua os efeitos dos diversos componentes do *SPL* quando está misturado em solução, o que explica o porquê dos danos genéticos induzidos pelo *SPL* não serem uma simples soma dos efeitos dos seus diversos componentes.

Outro importante fator a se considerar também foi o potencial indutor de formação de micronúcleos apresentado pelo *SPL* como visto no trabalho de Palmieri et al. (Capítulo 3). A sua presença indica a ocorrência de quebras cromossômicas que dificilmente serão corrigidas durante as etapas de reparo do DNA durante o ciclo celular, resultando em alterações permanentes na estrutura cromossômica e do material genético e podem, portanto, causar mudanças na fisiologia e morfologia celular e inclusive serem transmitidas hereditariamente (Fenech, 1985). A ocorrência desses micronúcleos foi constatada tanto para o *SPL* como para todos os seus componentes fracionais (Palmieri et al., Capítulo 3) e pode ser considerada como um indicador de que os danos ao DNA observados por este trabalho não estão sendo reparados em sua totalidade.

5 CONCLUSÃO

O *SPL* e seus principais componentes fracionais induzem a fragmentação do DNA de linfócitos humanos provocando o chamado “DNA laddering”. Os resultados obtidos neste trabalho em conjunto com dados observados em outras pesquisas envolvendo o *SPL* comprovam a capacidade desse composto de induzir danos ao material genético.

Avaliações em modelos vegetais feitas utilizando-se o *SPL* se mostraram bem relacionadas com os resultados observados em linfócitos humanos obtidos neste trabalho.

O *SPL* é um composto extremamente nocivo e medidas de manejo e descarte são extremamente importantes para evitar a contaminação do meio ambiente.

REFERÊNCIAS

S. Chandra, L.K.S Chauhan, R.C. Murthy, P.N. Saxena, P.N. Pande, S.K. Gupta, Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. *Science of the Total Environment* 347(2005) 46-52.

B.I. Silveira, A.E. Dantas, J.E. Blasquez, R.K.P.Santos, Effectiveness of cement-based for stabilization and solidification of spent pot liner inorganic fraction. *J. Hazard. Mater.* 98(2003), 183–190.

L.F. Andrade, J.M.S Campos, L.C. Davide, Cytogenetic alterations induced by SPL (Spent Pot Liner) in meristematic cells of plant bioassays. *Ecotoxicology And Environmental Safety*. 71(2008), 706-710.

D.F. Lisbona, K.M. Steel. Recovery of fluoride values from spent pot-lining: precipitation of an aluminium hydroxyfluoride hydrate product. *Separation and Purification Technology*, 61(2008) 182-192.

G. Fiskesjö, The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102 (1985) 99-112.

L.K.S. Chauhan, P.N. Saxena, S.K. Gupta, Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Environmental and Experimental Botany*. 42(1999) 181-189.

L.F. Andrade-Vieira, L.S. Gedraite, J.M.S. Campos, L.C. Davide, Spent Pot Liner (SPL) Induced DNA Damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 74 (2011) 822-828.

T.J. Reape, P.F. McCabe, Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis* 15(2010) 249–256.

W.V.G. Doorn, E.J. Woultering, Many ways to exit ? Cell death categories in plants. *Trends In Plant Science*. 10(2005) 117-122.

W.V.G. Doorn, E.J. Woultering, What about the role of autophagy in PCD ? Trends In Plant Science, 8(2010), 361-362.

T. Gichner, Evaluation of the nuclear DNA Diffusion Assay to detect apoptosis and necrosis. Mutation Research, 586(2005) 38-46.

M. Yildiz, I.H Cigerci, M. Konuk, A.F. Fidan, H. Terzi, Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromossome aberration and comet assays. Chemosphere 75(2009) 934-938.

N.P. Singh, Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. Mutat. Res. 455(2000) 111–127.

D. Ritter, J. Knebel, Genotoxicity testing in-vitro – Development of a higher trougthput method based on the comet assay. Toxicology in Vitro. 23(2009) 1570-1575.

A. Azqueta, K.B. Gutzkow, G. Brungborg, A.R. Collins, Towards a more reliable comet assay: Optimizing agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. Mutation Research, 724(2011) 41-45.

P Kaur, Modulatory role of alizarin from *Rubia cordifia* L. against genotoxicity of mutagens. Food and Chemical Toxicology, 48(2010) 320-325.

S. Marcussi, P.R.S Santos, D.L. Menaldo, L.B. Silveira, N.A. Santos-Filho, M.V. Mazzi, S.L. Silva, R.G. Stábeli, L.M.G. Antunes, A.M. Soares, Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. Mutation Research, 724(2011) 59-63.

N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Scheider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, Exp. Cell. Res. 175(1988) 184–191.

A. Collins, M. Dusinská, M. Franklin, M. Somorovská, H. Petrovská, S. Duthie, L. Fillion, M. Panayiotidis, K. Raslová, N. Vaughan, Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications, *Environ. Mol. Mutagen.* 30(1997) 139–146.

A. Kocyigit, H. Keles, S. Selek, S. Guzel, H. Celik, O. Erel, Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutat. Res.* 585(2005) 71–78.

R Development Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing (2011).

B.S Behboodi, L. Samadi, Detection of apoptotic bodies and oligonucleosomal DNA fragments in cadmium-treated root apical cells of *Allium cepa* Linnaeus. *Plant Sci.* 167(2004) 411–416.

F.B. Abdallah, N. Elloumi, I. Mezghani, M. Boukhris, J.P Garrec, Survival strategies of pomegranate and almond trees in a fluoride polluted area. *Comptes Rendus Biologies.* 329(2006) 200-207.

A. Hartmann, Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. *Mutation Research.* 536(2003) 27-38.

E. Giannotti, A comparison of the in vitro Comet assay with the in vitro chromosome aberration assay using whole human blood or Chinese hamster lung cells: validation study using a range of novel pharmaceuticals. *Mutagenesis*, 17(2002) 163–170.

A. Danon. Review Plant programmed cell death : A common way to die. *Nature*, 38 (2000) 647-655.

H. Matsumoto, Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 200(2000) 1–46.

M. Kollmeier, H.H. Felle, W.J. Horst. Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? *Plant Physiology*, 122 (2000) 945-956.

G. Frantzios, B. Galatis. P. Apostolakos. Aluminum effects on microtubule organization in dividing root tip cells of *Triticum turgidum*. II. Cytokinetic cells. *Journal of Plant Research*. 114(2001)157-170.

T.C.C Fernandes, D.E.C. Mazzeo, M.A. Marin-Morales, Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 88(2007) 252–259.

M. Kurás, J. Nowakowska, E. Sliwinska, R. Pilarski, R. Ilasz, T. Tykarska, A. Zobel, K. Gulenwicz, Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology* 107(2006) 211-221.

CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment), Canadian water quality guidelines. (1998).

ISO (International Organization for Standardization) Water quality — Determination of aluminium: spectrometric method using pyrocatechol violet. (1994).

M. Fenech, The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage, *Methods Mol. Biol.* 410 (2008) 185–216.