



MAIRY BITENCOURT TEIXEIRA

**GENOTOXICIDADE E MODIFICAÇÕES
ANATÔMICAS RADICULARES EM *Allium cepa*
L. (Amaryllidaceae) PROVOCADAS PELO
EFLUENTE DO BENEFICIAMENTO DE
ROCHAS ORNAMENTAIS**

**LAVRAS - MG
2014**

MAIRY BITENCOURT TEIXEIRA

**GENOTOXICIDADE E MODIFICAÇÕES ANATÔMICAS
RADICULARES EM *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) PROVOCADAS
PELO EFLUENTE DO BENEFICIAMENTO DE ROCHAS
ORNAMENTAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração Botânica, para obtenção de título de Mestre.

Orientadora

Profa. Dra. Vânia Helena Techio

Coorientador

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro

**LAVRAS-MG
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Teixeira, Mairy Bitencourt.

Genotoxicidade e modificações anatômicas radiculares em
Allium cepa L. (Amaryllidaceae) provocadas pelo efluente do
beneficiamento de rochas ornamentais / Mairy Bitencourt Teixeira.
– Lavras: UFLA, 2014.

84 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Vânia Helena Techio.

Bibliografia.

1. Anormalidades cromossômicas. 2. Anatomia radicular. 3.
Toxicidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 571.95

MAIRY BITENCOURT TEIXEIRA

**GENOTOXICIDADE E MODIFICAÇÕES ANATÔMICAS
RADICULARES EM *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) PROVOCADAS
PELO EFLUENTE DO BENEFICIAMENTO DE ROCHAS
ORNAMENTAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração Botânica, para obtenção de título de Mestre.

APROVADA em de de 2014

Dra. Maria Cristina Mendes Costa UNILAVRAS

Dr. Fabrício José Pereira UFLA

Dr. Evaristo Mauro de Castro UFLA

Dra. Vânia Helena Techio

Orientadora

**LAVRAS-MG
2014**

*Aos meus Pais, Paulo Teixeira e Alice Bitencourt Teixeira, pelo amor, apoio e
por sempre acreditarem em mim.*

*Ao Aníbal Anatólio Diogo Filho, por ser companheiro, compreensivo e presente
nos momentos difíceis.*

*Aos meus orientadores, Vânia Helena Techio e Evaristo Mauro de Castro, por
me ensinarem a gostar e entender a importância da pesquisa.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado condições de lutar e alcançar meus objetivos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, pela oportunidade concedida para realização do Mestrado.

Ao Instituto Federal do Espírito Santo (Ifes) pelo apoio financeiro e afastamento concedido para realização do mestrado.

Aos professores, Vânia Helena Techio e Evaristo Mauro de Castro, pela orientação.

Ao técnico de laboratório Ítalo Antônio Fernandes pelo suporte.

Aos Laboratórios de Citogenética e de Anatomia Vegetal.

"Procuro semear otimismo e plantar sementes de paz e justiça. Digo o que penso, com esperança. Penso no que faço, com fé. Faço o que devo fazer, com amor. Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende. Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir."

Cora Coralina

RESUMO

O presente estudo foi realizado para avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos e as modificações anatômicas provocados por efluente proveniente da indústria de polimento de rochas ornamentais em células de ápices radiculares de *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae). As amostras do efluente foram coletadas em tanques de sedimentação horizontal de uma indústria de polimento localizada em Nova Venécia, ES e analisadas por espectrometria de massa e emissão atômica. Foram montados experimentos com bulbos de *A. cepa* submetidos a concentrações crescentes do efluente do polimento (12,5%, 25%, 37,5%, 50%, 75%, (v/v)) e ao efluente na forma bruta, não diluído, por um período de 20 dias. Para controle positivo utilizou-se metilmetanosulfonato (MMS) 4×10^{-4} M e como controle negativo, água destilada. Após o período experimental, as raízes foram coletadas para a avaliação do índice mitótico, das anormalidades cromossômicas e nucleares, da área total da raiz, da área percentual da coifa e dos tecidos meristemáticos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelos testes de Scott-Knott e Kruskal-Wallis e análise de regressão. Os principais elementos encontrados na amostra do efluente em ordem decrescente de concentração foram: Cl, Mg, Na, K, Ca, SO_4^{2-} , F, W, Li, B e Sr. Verificou-se que todas as concentrações do efluente do polimento de rochas ornamentais induziram anormalidades cromossômicas e nucleares sendo as mais observadas aquelas do tipo *stickiness* e brotos nucleares. Verificou-se também que efluente do polimento tem uma ação mitose-depressiva uma vez que o índice mitótico sofreu um decréscimo proporcional ao aumento da concentração. Importante destacar a alta frequência de células em processo de morte programada, observada nas raízes expostas às maiores concentrações. Além de provocar efeitos citotóxicos e genotóxicos em células meristemáticas da raiz de *A. cepa*, o efluente do polimento de rochas ornamentais afeta a estrutura da coifa e do centro quiescente por meio do aumento de suas áreas percentuais, enquanto que os tecidos meristemáticos protoderme, meristema fundamental e procâmbio sofreram uma significativa redução em suas áreas percentuais.

Palavras-chave: Anormalidades cromossômicas. Anatomia radicular. Efluente industrial. Toxicidade.

ABSTRACT

The present study was conducted to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects and anatomical changes caused by effluent from the polishing of ornamental stone industry in cells of root tips of *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae). Samples of the effluent were collected in horizontal sedimentation tanks located at a polishing industry in Nova Venécia- ES, and analyzed by mass spectrometry and atomic emission. Experiments were made with *A. cepa* bulbs subjected to increasing concentrations of the effluent from polishing (12.5%, 25%, 37.5%, 50%, 75% (v / v)) and the effluent in its crude form non diluted, for a period of 20 days. For a positive control it was used methyl methane sulfonate (MMS) 4×10^{-4} M and as negative control, distilled water. After the test period, the roots were collected to evaluate the mitotic index, the chromosomal and nuclear abnormalities, the total area of the root, the percentage area of the hood and meristematic tissues. The data were subjected to analysis of variance and the averages were compared by the Scott-Knott and Kruskal-Wallis tests and regression analysis. The main elements found in the sample of the effluent in descending order of concentration were: Cl⁻, Mg, Na, K, Ca, SO₄⁻², F⁻, W, Li, B and Sr. It was found that all concentrations of the effluent from polishing of ornamental stones have induced chromosomal and nuclear abnormalities being the most seen those kinds of stickiness and nuclear buds. It was also found that the effluent from polishing has a mitosis-depressive action since the mitotic index had a proportional decrease to the increase of the concentration. Important to highlight the high frequency of cells in the programmed death process, observed in roots exposed to higher concentrations. In addition to cytotoxic and genotoxic effects in meristematic root cells of *A. cepa* caused by the effluent from polishing of ornamental stones it also affects the structure of the hood and the quiescent center by increasing their percentage areas, while the protoderm meristematic tissues, fundamental meristem and procambium have suffered a significant reduction in their percentage areas.

Keywords: Chromosomal abnormalities. Root anatomy. Industrial effluent. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Índices mitóticos (IM) observados em células meristemáticas radiculares de *A. cepa* submetidas a diferentes concentrações do efluente proveniente do polimento de rochas ornamentais 44
- Figura 2 Danos observados nas células das raízes de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações do efluente do polimento. A-A2- Cromossomos perdidos; B-B2- C- Metáfases; C-C2- Micronúcleos; D-D2- Multipolaridade; E-E2- Pontes cromossômicas, F-F1- Stickiness; F2- Broto nuclear. Barra 50 μm 47
- Figura 3 Fotomicrografias de diferentes morfologias, associadas ao processo de morte celular programada em células meristemáticas de pontas de raízes de *A. cepa* após exposição ao efluente do polimento. (A e A1) Células meristemáticas do tratamento de controle negativo com algumas fases do processo mitótico (setas) e (B), (C), (D) e (E) células meristemáticas após 20 dias de exposição ao efluente do polimento na concentração 100% v/v; (B) Núcleos altamente condensados, fortemente corados e a ausência de divisão celular; (C) Núcleos fragmentados em pequenas esferas formando corpúsculos heterocromáticos no interior do citoplasma; (D) Núcleos com alto grau de degradação; (E) Células com degradação total do núcleo. Barra 50 μm 51

- Figura 4 Sinais de toxicidade nos bulbos de *A. cepa* após 10 dias de exposição a concentrações crescentes do efluente do polimento. (A) Controle negativo com formação e crescimento normal de raízes. (B), (C), (D) e (E) Bulbos apresentando severa inibição no processo de formação das raízes (seta), quando expostos à concentração 25%, 50%, 75% e 100% v/v do efluente do polimento, respectivamente 62
- Figura 5 Características anatômicas radiculares de bulbos de *A. cepa* após 20 dias de exposição a diferentes concentrações do efluente do polimento de rochas ornamentais: A – água destilada (controle negativo), B – metil metano sulfonato MMS (controle positivo), C – 100% v/v, D – 75% v/v, E – 50% v/v, F – 37,5% v/v, G – 25% v/v, H – 12,5% v/v. Barra 100 μm 64
- Figura 6 Área percentual (%) da coifa (A), do CQ (B), da protoderme (C), do meristema fundamental (D) e área total (μm^2) (E) da raiz de *A. cepa* exposta a concentrações crescentes do efluente do polimento, por um período de 20 dias. CQ – Centro Quiescente..... 65

Figura 7 Características anatômicas radiculares de plantas de *A. cepa* expostas a crescentes concentrações do efluente do polimento por 20 dias. A – A3 água destilada; B – B3 75% (v/v) e C – C3 100%; ep - epiderme, ex - exoderme, ct - córtex e cv - cilindro vascular. Secções transversais evidenciando em B e B1 a necrose dos tecidos (seta), em B2 e C2 desorganização do sistema vascular (seta) e em C1 os tecidos, epiderme e exoderme, danificados (setas). Secções longitudinais em B3 e C3 evidenciando desarranjo nas fileiras de células meristemáticas e perda na delimitação da área de cada meristema. Barra 50 μm 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Padrões para o ensaio de solubilização conforme NBR 10.004/2004 e respectivos limites máximos permitidos (LMP) no extrato solubilizado do resíduo.....	22
Tabela 2	Resultados das análises químicas apresentando a concentração das substâncias presentes no efluente do polimento de rochas ornamentais coletadas em Nova Venécia-ES e o respectivo limite estabelecido pela NBR 10.004/2004 anexo G que contém os padrões classificação de efluentes industriais	39
Tabela 3	Médias da Frequência (%) de AN, MN, brotos nucleares, núcleos lobulados e células binucleadas, núcleos poliplóides e assincrônicos observadas em células meristemáticas radiculares de <i>A. cepa</i> expostas a diferentes concentrações do efluente do polimento de rochas ornamentais e aos testes de controle negativo (água destilada) e positivo (MMS), após 20 dias	48
Tabela 4	Médias da Frequência (%) de núcleos condensados, observados em células meristemáticas radiculares de <i>A. cepa</i> expostas a diferentes concentrações do efluente do polimento de rochas ornamentais e aos testes de controle negativo (água destilada) e positivo (MMS), após 20 dias.....	52
Tabela 5	Médias da frequência (%) do total de anormalidades cromossômicas (AC) e de cada tipo de AC observados em células meristemáticas radiculares de <i>A. cepa</i> expostas a diferentes concentrações do efluente proveniente do polimento de rochas ornamentais e aos testes de controle negativo (água destilada) e positivo (MMS), após 20 dias.....	56

Tabela 6	Médias da área percentual do procâmbio da raiz de <i>A. cepa</i> exposta a concentrações crescentes do efluente do polimento de rochas ornamentais por um período de 20 dias – Brasil – 2013	67
----------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	O uso das rochas ornamentais e o cenário nacional.....	19
2.2	O processo produtivo, lamas geradas e classificação	19
2.3	Lamas e impactos ambientais.....	22
2.4	<i>Allium cepa</i> L. (Amaryllidaceae)	24
2.5	Genotoxicidade e sua avaliação	25
2.6	Anatomia vegetal na avaliação de contaminantes ambientais.....	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1	Obtenção da amostra do efluente do polimento de rochas ornamentais e do material vegetal.....	32
3.2	Local de execução e análises do efluente do polimento	32
3.3	Planejamento experimental e coleta das raízes	33
3.4	Análise de ciclo celular e avaliação da genotoxicidade	34
3.4.1	Análise dos dados do ciclo celular	35
3.5	Análise anatômica quantitativa e qualitativa.....	36
3.6	Análise estatística.....	38
3.7	Tratamento de resíduos contaminados	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1	Análise da Composição química do efluente do polimento de rochas ornamentais.....	39
4.2	Análises do ciclo celular.....	44
4.2.1	Índice mitótico (IM).....	44
4.2.2	Anormalidades nucleares (AN)	46
4.2.3	Anormalidades cromossômicas (AC)	55
4.3	Caracterização anatômica	61

4.3.1	Análise macroscópica.....	61
4.3.2	Anatomia quantitativa da raiz de Allium cepa exposta a diferentes concentrações do efluente do polimento.....	63
4.3.3	Anatomia qualitativa da raiz de Allium cepa exposta a diferentes concentrações do efluente do polimento.....	69
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
6	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

Países como o Brasil, que dispõem de importantes recursos geológicos e exploração de rochas ornamentais em pleno desenvolvimento, estão sujeitos a diversos impactos ambientais. A indústria de rochas ornamentais caracteriza-se pela produção de elevadas quantidades de resíduos, entre os quais, as lamas provenientes do processo de beneficiamento. A deposição inadequada destes resíduos, que vem sendo acumulados no próprio pátio das indústrias ou em aterros superficiais a céu aberto tem provocado impactos à paisagem quer em nível visual quer ambiental. Entre os impactos, estão a contaminação das águas superficiais e dos lençóis freáticos, a inutilização do solo, a destruição da vegetação e o assoreamento dos rios (BERTOSSO et al., 2012). As lamas do beneficiamento de rochas ornamentais (LBRO) apresentam grande concentração de sólidos totais, alto teor de ferro e elevado pH, e quando se trata da lama gerada durante a etapa de beneficiamento em que se realiza o polimento das chapas, aumentam-se os problemas de contaminação, inclusive por metais pesados, haja vista a enorme quantidade de insumos e/ou produtos químicos como resinas, polímeros, pastilhas abrasivas que as empresas de beneficiamento utilizam durante o processo de polimento.

Aproximadamente 240.000 toneladas/ano de LBRO são produzidas e distribuídas nos estados do Espírito Santo, Bahia, Ceará e Paraíba (CHIODI FILHO, 2013). Braga et al. (2010), de acordo com as recomendações da NBR 10.004/2004, realizaram ensaios de lixiviação e solubilização para estes resíduos classificando-os como Classe IIA - Não inertes, ou seja, com algum potencial para produzir danos ao ambiente e à saúde, por apresentarem concentrações de Al, F, Fe, Pb, Hg, Cr, Cl e fenóis superiores ao limite máximo estabelecido conforme a norma anteriormente citada.

De acordo com a legislação estadual do Espírito Santo, a LEI n°: 4.636/92 Art. 1°, prevê que as indústrias de beneficiamento de mármore e granito estabelecidas neste Estado ficam obrigadas a construir e utilizarem tanques de decantação para as lamas sendo que a água residuária, após decantação, deverá retornar para o processo industrial até a sua saturação e ou evaporação evitando seu descarte para o ambiente.

No Brasil, buscando-se maneiras de mitigar o impacto gerado pelas LBRO, estudos têm sido realizados visando utilizar esse resíduo em diferentes setores da indústria como, por exemplo, seu aproveitamento na agricultura com a finalidade de fertilizante e na fabricação de produtos cerâmicos para uso na construção civil. Porém, até o momento, não foram encontrados relatos na literatura a respeito dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do efluente do polimento de rochas ornamentais, portanto, pesquisas são necessárias para avaliar os efeitos tóxicos desse efluente.

Uma das formas de avaliação é verificar os efeitos desta água residuária sobre células e tecidos vegetais. Algumas espécies de plantas sensíveis e bem estabelecidas para fornecer dados sobre estes efeitos têm sido reconhecidas como excelentes modelos para esse tipo de avaliação, ou seja, constituem os chamados sistemas-teste utilizados frequentemente em monitoramentos ambientais. Dentre as espécies, destaca-se *Allium cepa* que tem sido o sistema-teste utilizado para avaliar danos no DNA e distúrbios no ciclo mitótico desde a década de 40 (inserir fonte: autor e ano).

O sistema-teste *A. cepa* apresenta vantagens, tais como, crescimento rápido de suas raízes, grande número de células em divisão, baixo custo, abundância e disponibilidade durante todo o ano no Brasil, fácil manuseio e possui cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho (GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985; MATSUMOTO et al., 2006). Resultados satisfatórios sobre os efeitos de diferentes substâncias químicas têm sido

relatados por meio deste sistema-teste por diferentes autores (RANK; NIELSEN, 1993; SUDHAKAR; NINGE GOWDA; VENU, 2001; SAURABH CHANDRA et al., 2005; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A exploração e o beneficiamento de rochas ornamentais, como já enfatizados, causam extenso impacto ambiental, no entanto, são relevantes para a economia do país. Dessa forma, avaliação da genotoxicidade e das alterações anatômicas provocadas pela água residuária proveniente do polimento de rochas ornamentais no organismo teste *A. cepa* pode servir de alerta para os perigos que as populações possam estar expostas e auxiliar no destino ambientalmente correto desse resíduo. Diante disso, objetivou-se, com esse trabalho, verificar a ocorrência de anormalidades/alterações no ciclo celular em tecidos meristemáticos e alterações anatômicas na raiz de bulbos de *Allium cepa*, quando expostos a diferentes concentrações do efluente do polimento e, assim, determinando o potencial genotóxico, citotóxico e mutagênico desse efluente da indústria de rochas ornamentais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O uso das rochas ornamentais e o cenário nacional

A indústria de rocha ornamental é constituída de empresas que realizam exploração e/ou beneficiamento de rochas como mármore e granito. A ocorrência destas rochas é sob a forma de maciços rochosos que são exploradas através de pedreiras a céu aberto (FABRI; JUNIOR; LEITE, 2012). A resistência a ataques químicos e abrasão, a durabilidade, a facilidade de limpeza e a estética apresentadas pelo granito têm sido responsáveis pela preferência do seu uso na construção civil. Por isso, estão sendo amplamente utilizados para revestimento externo de prédios, pisos, soleiras, na fabricação de móveis (mesas, pias) e na arte funerária (PEITER, 2001).

O Brasil é o 4º maior produtor mundial de rochas ornamentais com mais de 1.200 variedades de rochas, 12.000 empresas exploradoras instaladas em todo país produzindo 9,0 milhões de toneladas por ano empregando diretamente 100 mil trabalhadores. Atualmente, o país é o 4º exportador de rochas beneficiadas, sendo os granitos o principal produto do setor. O Estado de Minas Gerais responde pela maior diversidade de rochas extraídas, mas é o estado do Espírito Santo que responde por quase 48% do total de rochas produzidas nacionalmente, sendo o maior produtor de rochas do país e o sexto do mundo (CHIODI FILHO, 2013).

2.2 O processo produtivo, lamas geradas e classificação

O setor das rochas ornamentais inclui as empresas que realizam a extração e/ou transformação de rochas para fins decorativos e agrega três tipos de produto: blocos, extraídos dos recursos geológicos (extração); chapas

serradas, correspondente ao bloco cortado (transformação); chapas polidas, produto resultante do polimento que será selecionado e embalado para comercialização (transformação) (TORRES, 2007).

A extração consiste na retirada da rocha na natureza que é realizada nas chamadas pedreiras a céu aberto. Neste processo são utilizados o fio helicoidal, abrasivos (areia) e jatos de água de alta pressão para retirar blocos de rocha com aproximadamente 3 m x 1,8 m x 1,8 m. Como resultado deste processo, são geradas lamas que compreendem uma mistura de água e pó de rocha.

Os blocos de rocha são transportados até os locais de beneficiamento onde será feita a sua transformação em três etapas: desdobramento ou serragem dos blocos, polimento das chapas brutas e corte e acabamento das chapas polidas. Para a serragem utilizam-se lâminas de aço, água, cal e granalha metálica para transformar o bloco de granito em chapas de dois a três centímetros de espessura. Nesta etapa são produzidas lamas constituídas por pó de rocha, granalha fragmentada, cal e água (BUZZI, 2008).

O polimento das chapas de granito provenientes da etapa de desdobramento é feito por meio de elementos abrasivos que deslizam sobre o material desbastando-o. Esta etapa é realizada em via úmida onde são inseridos grandes volumes de água sobre a área que vai sendo polida. Os abrasivos são constituídos por uma resina de poliéster insaturada, partículas de carbono de silicone, carbonato de cálcio, cloreto de sódio e óxidos corantes (LUZ, 2005). Os insumos utilizados durante o polimento podem transformar a lama gerada nesta etapa do beneficiamento num resíduo mais perigoso. A última etapa do processo de beneficiamento é o corte e o acabamento das chapas polidas, transformando-as em artefatos úteis, tais como: pias, bancadas, pisos e tampos de mesas. O resíduo gerado nesta etapa consiste numa lama gerada em quantidade muito menor comparado as etapas já mencionadas.

As lamas resultantes dos vários processos de beneficiamento passam por um processo de desidratação separando a parte sólida da líquida. A líquida é aproveitada voltando novamente ao processo industrial e a sólida é encaminhada aos aterros. Nestes locais, a lama desidratada permanece por tempo indeterminado em estado natural, ou devem ser transformadas em material adequado para que não ofereçam riscos à saúde da população e impactos ao meio ambiente (MAGACHO; SILVA, 2006).

Braga et al. (2010) analisaram amostras de lamas de polimento de cinco empresas de beneficiamento e todas as amostras coletadas foram classificadas como Classe IIA - Não-inerte de acordo com os critérios estabelecidos pela NBR 10004/2004 que dispõe sobre a classificação de resíduos. Os parâmetros presentes nas amostras e que contribuíram para a não inerticidade das lamas foram Cd, Pb, Cl⁻, fenóis, e Fe. Isto quer dizer que são resíduos susceptíveis de sofrerem transformações físicas, químicas ou biológicas importantes das quais possam resultar efeitos nocivos para o ambiente, nomeadamente para as águas de superfície ou subterrâneas. Para realizar esta classificação, a NBR 10004/2004 propõe a comparação entre os parâmetros definidos na listagem do Anexo G e os parâmetros encontrados no extrato solubilizado da lama. Se a concentração de pelo menos um dos parâmetros previstos no Anexo G, estiver acima do limite máximo permitido (LMP), a lama será classificada como Classe II A, isto é, não- inerte.

A Tabela 1 mostra os parâmetros previstos no Anexo G da norma NBR 10.004/2004 e seus respectivos LMP.

Tabela 1 Padrões para o ensaio de solubilização conforme NBR 10.004/2004 e respectivos limites máximos permitidos (LMP) no extrato solubilizado do resíduo

Componentes químicos	LMP (mg L⁻¹)
Aldrin e dieldrin	3,0 x 10 ⁻⁵
Alumínio	0,2
Arsênio	0,01
Bário	0,7
Cádmio	0,005
Chumbo	0,01
Cianeto	0,07
Clordano (todos os isômeros)	2,0 x 10 ⁻⁴
Cloreto	250,0
Cobre	2,0
Cromo total	0,05
2,4-D	0,03
DDT (todos os isômeros)	2,0 x 10 ⁻³
Endrin	6,0 x 10 ⁻⁴
Fenóis totais	0,01
Ferro	0,3
Fluoreto	1,5
Heptacloro e seu epóxido	3,0 x 10 ⁻⁵
Hexaclorobenzeno	1,0 x 10 ⁻³
Lindano	2,0 x 10 ⁻³
Manganês	0,1
Mercúrio	0,001
Metoxicloro	0,02

2.3 Lamas e impactos ambientais

As rochas ornamentais passam por várias transformações desde a extração da matéria-prima até o produto final a ser comercializado e a geração de elevadas quantidades de resíduos ocorre em todas as etapas deste processo produtivo. Dessa forma, a indústria de transformação de rochas enquadra-se como uma atividade potencialmente poluidora por causar danos ao meio ambiente (BUZZI, 2008).

A lama gerada na transformação de rochas é um grave problema para as indústrias devido à dificuldade de acomodação desta enorme quantidade de resíduo. Isto tem gerado grande número de aterros que atingem volumes

consideráveis e ocupam grandes áreas tornando-se deste modo uma preocupação ambiental. A preocupação aumenta quando os aterros são clandestinos e localizados em regiões ambientalmente sensíveis como aquelas próximas a vilarejos, curso d'água e zonas de grandes declives.

Um dos fatores que contribui para a geração excessiva de resíduos na indústria de rochas ornamentais é a carência tecnológica, uma vez que empregasse métodos rudimentares de extração e de beneficiamento que causam depredação de reservas minerais, grandes perdas de material e significativos impactos ambientais (CAMPOS et al., 2009).

Tendo em vista que a maioria das pedreiras, no Brasil, é explorada a céu aberto, as cavas são muito frequentes e visualizadas a grandes distâncias causando um grande impacto ambiental visual e estético. Além disso, grande parte dos rejeitos da lama são estocados de forma inadequada e deixados nas próprias pedreiras, criando riscos de acidentes e prejudicando, inclusive, a sequência dos trabalhos na própria empresa de extração (CAMPOS et al., 2009).

O impacto ambiental de grande preocupação é a contaminação das nascentes e o assoreamento de córregos e rios causados pela lama resultante da exploração em regiões montanhosas, principalmente, em época de chuva. Segundo Buzzi (2008) a lama que fica armazenada em tanques escavados diretamente no solo até ser enviada para os aterros industriais específicos, coloca em risco os corpos d'água próximos. El Khalil et al. (2008), confirmam o impacto da atividade de mineração sobre os recursos hídricos e que isto pode representar um perigo potencial para a saúde do ser humano e para toda comunidade biótica nas imediações dessas áreas de exploração. Segundo os autores, a maioria das amostras de água subterrânea coletada em áreas próximas à atividade exibiu contaminação por metais uma condutividade elevada.

Além da contaminação de corpos hídricos, Bertossi et al. (2012) consideram importante atentar para os possíveis impactos que estes resíduos

podem causar na qualidade do solo uma vez que o processo de serragem causa intensa cominuição do material rochoso, gerando um resíduo de fina granulação que pode causar a impermeabilização do solo e diminuir sua condutividade hidráulica..

Outro impacto a ser considerado proveniente das lamas provenientes do processamento de rochas ornamentais é a presença de elementos em teores que podem causar toxidez às plantas. Estudos têm sido realizados para avaliar concentrações de metais em espécies de plantas comestíveis e cultivadas em solos de áreas de mineração. Os resultados obtidos mostram que as concentrações de metais nessas plantas excederam o limite máximo permitido sendo consideradas fitotóxicas e que o consumo destas plantas poderia implicar num risco para a saúde. Além disso, os resultados mostraram que a presença de metais em plantas é significativamente influenciada pela mineralogia do solo que por sua vez está sob influência da atividade minerária (EL KHALIL et al., 2008; EL HAMIANI et al., 2010; GONZALEZ-FERNANDEZ et al., 2011).

2.4 *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae)

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma das plantas cultivadas de mais ampla difusão no mundo, sendo a segunda hortaliça em importância econômica consumida por quase todos os povos do planeta, independente da origem étnica e cultural (BOITEUX; MELO, 2004).

Espécies pertencentes ao gênero *Allium* são encontradas em uma ampla gama de altitudes e latitudes que incluem desde o círculo polar Ártico até o continente europeu, Ásia, América do Norte e África. O geneticista russo Vavilov sugeriu, como provável centro de origem das cebolas, as áreas desérticas englobando regiões do atual Paquistão e o Irã (FRITSCH; FRIESEN, 2002).

A planta é herbácea, com altura da parte aérea variável, em torno de 70 cm. Além das folhas fotossintéticas (eófilos) que são cilíndricas e com limbo que se afila da base para o ápice, apresentam folhas modificadas chamadas catáfilos que se sobrepõe umas às outras, acumulando substâncias de reserva e constituindo o bulbo. O caule possui formato de disco cônico e possui entrenós muito curtos e constitui a base do bulbo. O sistema radicular é do tipo fasciculado apresentando raízes adventícias finas, pouco ramificadas, de cor branca e com odor típico da cebola. As flores da cebola são hermafroditas e encontram-se agrupadas em umbelas simples globosas na extremidade dos escapos ou hastes florais. A polinização é principalmente entomófila, e também em certo grau anemófila. (FRITSCH; FRIESEN, 2002).

Diversas características morfológicas e fisiológicas da cebola suportam a hipótese que esta hortaliça tenha originado em solos pobres e rasos e submetidos à constante estresse hídrico. Entre as adaptações a estas condições extremas encontram-se as folhas modificadas (catáfilos) servindo como órgãos de reserva, a presença de níveis variáveis de cerosidade foliar que reduz a transpiração, a baixa densidade radicular que permite melhor exploração de solos rasos; a presença de folhas de formato cilíndrico, estreitas e com orientação quase vertical contribuindo para níveis de transpiração e fotossíntese reduzidos em condições de altos potenciais de solo-água, que resulta em um limitado crescimento, permitindo a planta sobreviver por períodos mais longos de seca (FRITSCH; FRIESEN, 2002).

2.5 Genotoxicidade e sua avaliação

O equilíbrio dos ecossistemas tem sido afetado devido à crescente descarga de produtos químicos perigosos no ambiente comprometendo a qualidade ambiental e a sobrevivência dos organismos. Os bioensaios de

toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para avaliar os efeitos de poluentes no ambiente e nos organismos.

Genotoxicidade é o estudo dos efeitos diversos de agentes físicos e químicos no material genético de células (DNA ou cromossomos) e a subsequente expressão de tais mudanças. Os agentes que mudam a sequência do DNA são “tóxicos” para o gene e são então chamados de genotóxicos. A genotoxicidade vem sendo estudada, utilizando plantas que respondem às alterações ambientais, exibindo altas frequências de células portadoras de anormalidades que, frequentemente, estão associadas à instabilidade genética, decorrentes de exposição a condições desfavoráveis (BEZRUKOV; LAZARENKO, 2002).

Entre os danos causados nos organismos expostos a poluentes, os mais preocupantes têm sido os genotóxicos. Ocorrendo em células reprodutoras, além de prejuízos estrutural, fisiológico ou bioquímico, eles podem afetar gerações futuras por serem herdáveis (RIBEIRO, 2003). A avaliação de danos desta natureza tem sido proposta por meio de algumas características, tais como, índice mitótico (IM), anormalidades cromossômicas (CA) e anormalidades nucleares (AN) em um organismo teste. O índice mitótico é um bom indicador de proliferação adequada das células e utilizado em estudos de toxicidade e mutagenicidade (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Fiskesjo (1985) propôs a observação de anormalidades nas diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase) para investigar o potencial genotóxico.

Segundo Russel (2002), as alterações na estrutura ou no número total de cromossomos podem ocorrer de forma espontânea ou como resultado da exposição a agentes químicos e físicos. Quebras no DNA, inibição da síntese de DNA, alteração no processo de replicação do DNA e segregação anormal dos

cromossomos estão entre as principais causas das alterações estruturais e numéricas dos cromossomos.

As anormalidades que envolvem alterações na estrutura do cromossomo como pontes e quebras cromossômicas indicam ação clastogênica do poluente, enquanto aquelas que envolvem alterações numéricas no conjunto cromossômico como aderências, atrasos e perdas de cromossomos, multipolaridade e C-metáfases indicam ação aneugênica. (HOUK, 1992; VIDAKOVIĆ-CIFREK et al., 2002; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Anormalidades nos núcleos interfásicos como núcleos lobulados, células polinucleares, mini células e brotos nucleares, também têm sido utilizadas por muitos pesquisadores para avaliar efeitos genotóxicos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

A ocorrência de micronúcleo (MN), ou seja uma estrutura semelhante ao núcleo principal porém em tamanho reduzido, tem sido utilizada para avaliar danos no DNA causados por exposição a agentes mutagênicos. O MN foi considerado por Ma et al. (1995) como a característica ideal para indicação de danos citológicos, e portanto, para avaliar a contaminação do ambiente. Os micronúcleos são formados durante a divisão celular e representam perda na cromatina decorrente de algum dano na estrutura do cromossomo ou dano no aparelho mitótico. Assim sendo, podem ser constituídos de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal (RIBEIRO, 2003).

De acordo com Leme e Marin-Morales (2008) o tamanho do MN pode ser uma forma para avaliar os efeitos clastogênicos e aneugênicos em *A. cepa* por ser uma espécie com cariótipo homogêneo em relação ao tamanho dos cromossomos. Dessa forma, um MN grande indicaria efeitos aneugênicos

resultantes de uma perda de cromossomo, enquanto MN pequenos podem indicar uma ação clastogênica resultante de alguma ruptura cromossômica.

A avaliação das características utilizada para investigar danos no material genético mencionada anteriormente, tem sido realizada em sistemas-teste vegetais. Estes sistemas-teste vêm se destacando como excelentes modelos genéticos para avaliação de genotoxicidade (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1994). Muitos vegetais têm sido utilizados: *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia*, *Nicotiana tabacum*, *Crepis capillaris* e *Hordeum vulgare* (GRANT, 1994). Dentre estas espécies, *Allium cepa* é um dos modelos genéticos mais eficientes e utilizados para avaliação do potencial genotóxico e dos mecanismos de ações dos agentes testados (GRANT, 1982).

A introdução desta espécie como sistema de ensaio é bem antiga, sendo utilizada em estudos para demonstrar distúrbios no fuso mitótico devido uso de colchicina (LEVAN, 1938). Desde então, adaptações na metodologia do teste de *A. cepa* têm sido usadas para otimizar a avaliação das misturas complexas que promovem a contaminação ambiental (RANK; NIELSEN, 1993; MA et al., 1995).

O estudo sobre efeitos genotóxicos por meio da avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *A. cepa* é uma alternativa eficiente devido ao crescimento rápido de suas raízes, a elevada proliferação celular, alta tolerância a diferentes condições de cultivo, disponibilidade durante o ano todo, fácil manuseio, e possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1994; MATSUMOTO et al., 2006; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Além disso, é uma avaliação indicada e validada por diversas agências ambientais, como o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP - United Nations Environmental Program), a Organização Mundial de Saúde (WHO - World Health Organization) e a

Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA – U.S. Environmental Protection Agency) (GRANT, 1982).

Por isso, este organismo-teste tem sido amplamente usado para testar amostras ambientais complexas líquidas como efluentes industriais (RADIC et al., 2010; OLORUNFEMI; OGIESERI; AKINBORO, 2011; MASOOD; MALIK, 2013) e águas impactadas por efluentes industriais (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; DUSMAM et al., 2014).

Considerando todas as vantagens que o sistema-teste *A. cepa* apresenta, ele tem sido indicado para avaliar os impactos causados por diversos contaminantes ambientais caracterizando-se como uma ferramenta importante para estudos de monitoramento ambiental com relatos de resultados satisfatórios.

2.6 Anatomia vegetal na avaliação de contaminantes ambientais

As modificações anatômicas em plantas observadas após exposição a poluentes, mesmo sem alterações macroscópicas, reforçam a importância de estudos anatômicos para o diagnóstico de injúrias por poluentes e o entendimento dos mecanismos de fitotoxicidade. Trabalhos retratam a importância da análise anatômica de raízes de plantas sob efeito de vários poluentes (SOIKKELIS, 1981; KOZHEVNIKOVA; SEREGIN; BYSTROVA, 2007; ÇAVUŞOĞLU et al., 2011).

As plantas ao serem expostas a determinadas substâncias como, por exemplo, metais pesados, além das alterações fisiológicas podem apresentar também alterações anatômicas. Segundo Zhou et al. (2008), muitas plantas aquáticas respondem à contaminação por meio de modificações em sua estrutura interna.

Em casos de contaminação do solo o sistema radicular é particularmente afetado, pois, a raiz é o primeiro órgão da planta que se expõe ao contaminante devido ao seu contato direto com estas substâncias (DEGENHARDT; GIMMLER, 2000). Portanto, alterações morfofisiológicas em todo o corpo da planta podem estar relacionadas diretamente às modificações na estrutura radicular, decorrentes de respostas a contaminantes ambientais haja visto que as raízes constituem a via primária de absorção de água e nutrientes no vegetal.

Estudos têm mostrado que uma variedade de condições estressantes pode promover modificações na estrutura da raiz. Gomes et al. (2011) avaliando os efeitos dos rejeitos da indústria de zinco em *Salix humboldtiana* (salgueiro) verificou que as raízes destas plantas apresentaram maior espessura da epiderme, exoderme e endoderme enquanto que o número de elementos condutores do xilema diminuiu. A formação de espaços intercelulares no córtex radicular de *Thlaspi caerulescens* devido à morte celular induzida por cádmio foi mostrada por Wójcik et al. (2005). Já Pereira et al. (2013), avaliando a fitotoxicidade por chumbo em *Lactuca sativa*, verificou que a presença deste metal em diferentes concentrações, induziu modificações significativas na anatomia radicular como aumento linear da espessura da exoderme com o aumento das concentrações de chumbo e redução da espessura da endoderme.

Tecidos radiculares de *Allium cepa* foram analisados por Turkmen et al. (2009) para identificar possíveis alterações anatômicas induzidas por águas residuárias. Este estudo mostrou a ocorrência de danos anatômicos, tais como, acúmulo de compostos químicos no parênquima cortical, células com núcleo de formato atípico, tecido vascular com estruturas pouco evidentes e morte celular.

As características morfológicas da zona meristemática e da coifa também foram importantes na avaliação dos efeitos tóxicos por diferentes tipos de estresse. A redução nos meristemas em *Sorghum bicolor* L. e *Pisum sativum* L., espessamento da camada de células da coifa em *Glycine max* L. e

comprimento das células da coifa em *Zea mays* L. foram parâmetros avaliados para determinar os efeitos tóxicos por metais pesados e radiação em plantas (PEIXOTO; PIMENTA; CAMBRAIA, 2007; KOZHEVNIKOVA; SEREGIN; BYSTROVA, 2007; CAI et al., 2011; KRAVETS et al., 2012).

Diante do exposto, uma maneira de elucidar os possíveis efeitos dos contaminantes ambientais em plantas seria por meio de avaliações anatômicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção da amostra do efluente do polimento de rochas ornamentais e do material vegetal

Para os testes de toxicidade e alterações anatômicas foi usado o efluente do processo de polimento das chapas de granito conhecido como lama de polimento que não possui qualquer tipo de tratamento. Foram coletadas amostras do sobrenadante da lama de polimento em tanques de sedimentação horizontal de uma empresa de beneficiamento de rochas ornamentais localizada no município de Nova Venécia, no Estado do Espírito Santo. As amostras foram coletadas no ponto do tanque que recebeu o efluente diretamente do equipamento de polimento e foram acondicionadas em recipientes plásticos de 20 litros.

Os bulbos de *A. cepa* L. cultivar bola precoce, selecionadas quanto à uniformidade do tamanho foram adquiridos no comércio da cidade de Lavras MG. Foram selecionados bulbos que apresentavam os melhores aspectos, isto é, com ausência de traumas, deformidades naturais e contaminação por fungos.

3.2 Local de execução e análises do efluente do polimento

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal e no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA - MG).

As análises do efluente proveniente do polimento de rochas ornamentais foram realizadas no SGS GEOSOL LABORATÓRIOS LTDA – Rod. MG 10 – Km 24,5 – Vespasiano-MG e a metodologia analítica utilizada para determinação da composição química atendeu às especificações descritas no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater de autoria das

instituições APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association) e WEF (Water Environment Federation) que consiste numa publicação conjunta de métodos e técnicas internacionais para análise de águas residuárias (EATON et al., 2005).

As amostras do efluente do polimento foram submetidas a uma análise quantitativa e qualitativa utilizando as técnicas analíticas ICP –MS e ICP–AES. Estas técnicas fazem um ultra rastreamento dos níveis dos componentes químicos da amostra por meio da espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP–MS) e da espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP–AES).

Para a análise realizada pelo laboratório de análises geoquímicas GEOSOL optou-se pelo método de código do ME – MS61 que utiliza as técnicas para rastrear até 51 elementos químicos presentes numa mistura complexa e de composição química variada como é considerado o efluente do polimento.

Estas análises foram realizadas apenas para fornecer uma descrição sucinta da composição química do efluente do polimento de rochas ornamentais. Os dados da composição química desta água residuária foram confrontados com os limites máximos permitidos pelas legislações que regulamentam as condutas relacionadas ao meio ambiente.

3.3 Planejamento experimental e coleta das raízes

O experimento foi montado em casa de vegetação no delineamento inteiramente casualizado (DIC) utilizando seis concentrações crescentes do efluente do polimento. Para o preparo das diluições das amostras do resíduo foi utilizada água destilada, obtendo-se as seguintes concentrações: controle negativo (somente água destilada), 12,5%, 25%, 37,5%, 50%, 75%, e 100%

(resíduo na forma bruta, não diluído) (v/v). Para controle positivo usou-se o agente indutor de danos no DNA, metilmetanosulfonato (MMS) na concentração $4 \times 10^{-4} \text{M}$ (LEME; MARIN-MORALES, 2008), totalizando oito tratamentos com cinco repetições. Antes da exposição aos tratamentos, todos os bulbos foram desbastados na região do prato com lâminas de aço para possibilitar o estudo do crescimento das raízes quando expostas aos tratamentos. Em seguida, dez bulbos foram dispostos em uma prancha de isopor perfurada (dimensões 15 cm x 20 cm) sobre bandejas que continham 2L da amostra do efluente do polimento nas diferentes concentrações. Devido à evaporação, o volume do efluente nas respectivas concentrações foi repostado diariamente, objetivando a manutenção das raízes mergulhadas durante todo período experimental. Após 20 dias de exposição, as raízes foram coletadas com auxílio de uma tesoura. .

3.4 Análise de ciclo celular e avaliação da genotoxicidade

Para análise do ciclo celular de *Allium cepa* ($2n=2x=16$ cromossomos), as coletadas foram fixadas em solução de Carnoy (Álcool-Ácido Acético 3:1 – v/v) por 24 horas, em temperatura ambiente. Após 24 horas, as raízes foram transferidas para uma nova solução de Carnoy, onde foram conservadas a -4°C , até sua utilização na confecção de lâminas. Para o preparo das lâminas, foi feita a hidrólise em HCl 5 N por 20 minutos em temperatura ambiente e utilizaram-se quatro pontas de raiz para a confecção de cada lâmina. A montagem das lâminas foi feita segundo a técnica de esmagamento (GUERRA; SOUZA, 2002). As lamínulas foram removidas em nitrogênio líquido e, após secagem, as lâminas foram coradas em solução de Giemsa (5%). As análises foram feitas na objetiva de 40X em microscópio trinocular Zeiss modelo Axio Lab A1 de tecnologia alemã (Carl Zeiss), fabricado na China e com sistema de captura de imagens

acoplado com câmera digital – Axio Can ICc 1. Foram avaliadas cinco lâminas/tratamento e 1000 células/lâmina.

3.4.1 Análise dos dados do ciclo celular

A análise do potencial genotóxico foi realizada com base nas frequências de anormalidades em todas as fases do ciclo celular. Os diferentes tipos de anormalidades foram categorizadas em: (i) anormalidades cromossômicas (AC) que compreendem os stickiness (aderência cromossômica), C-metáfase, ponte cromossômica, multipolaridade, poliploidia, cromossomos/fragmentos perdidos e (ii) as anormalidades nucleares (AN) que compreendem os micronúcleos (MN), os brotos nucleares, os núcleos lobulados e as células binucleadas. O número total de AC e de AN nas células meristemáticas das raízes de *A. cepa* foi contabilizado e obtido o percentual da frequência total destas anormalidades (AC e AN) em cada concentração testada por meio das fórmulas:

$$AC (\%) = \frac{\text{Total de anormalidades cromossômicas}}{\text{Total de células avaliadas}} \times 100$$

$$AN (\%) = \frac{\text{Total de anormalidades nucleares}}{\text{Total de células avaliadas}} \times 100$$

Para cada tipo de AC e AN existe um mecanismo específico para induzi-la. Em vista disso, realizaram-se as análises estatísticas de todos os tipos de AC e AN separadamente com o objetivo de avaliar o modo de ação, aneugênica ou clastogênica, das substâncias presentes no efluente do polimento sobre o

organismo – teste. Para isso, calculou-se o percentual da frequência de cada tipo de anormalidade (AC e AN) em cada concentração testada por meio da fórmula:

$$\text{Tipo de anormalidade (\%)} = \frac{\text{Tipo de anormalidade} \times 100}{\text{Total de células avaliadas}}$$

Para os efeitos citotóxicos foram avaliadas as alterações observadas nos Índices Mitóticos (I.M.) de todas as amostras, em relação aos testes controles. O índice mitótico foi obtido pela relação entre as células em divisão celular e o total de células avaliadas, seguindo a fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{Número total de células em divisão} \times 100}{\text{Total de células avaliadas}}$$

As células apoptóticas, núcleos condensados e degradados (NC), ou seja, em processos de morte celular, também foram consideradas como uma categoria indicativa de citotoxicidade e analisadas separadamente das AN.

As melhores figuras das anormalidades observadas, para cada amostra, foram fotodocumentadas em microscópio, para registro e comprovação dos resultados.

3.5 Análise anatômica quantitativa e qualitativa

Para a realização da análise anatômica, as raízes coletadas aos 20 dias após a exposição aos tratamentos foram fixadas em F.A.A._{70%} (solução de formaldeído, ácido acético e etanol) por um período de 72 horas e armazenadas em etanol 70% até a data das análises (JOHANSEN, 1940; KRAUS; ARDUIN, 1997).

Para realizar as secções, o material foi embocado em resina. Para isso, as raízes foram desidratadas em série etílica: etanol 70%, 92,5%, 100%, etanol 100% com resina ativada na proporção 1:1(uma parte de etanol e uma parte de resina ativada) e por fim resina ativada. Em seguida foram infiltradas e incluídas em hidroxietil-metacrilato Leica®.

Para a confecção das lâminas foram feitas secções longitudinais na região meristemática e transversais na região pilífera, com o auxílio do micrótomo de deslize ou rotativo marca YIDI.

As secções foram coradas com azul de toluidina 0,05% e montadas em Permunt (FEDER; O'BRIEN, 1968). As lâminas foram observadas em microscópio trinocular Zeiss Axio com sistema de captura acoplado com câmera digital – Axio Can ICc 1.

A análise anatômica quantitativa foi realizada na região meristemática das raízes e as seguintes características foram avaliadas: a área percentual de cada um dos meristemas primários (protoderme, meristema fundamental e procâmbio), a área percentual da coifa, a área percentual do centro quiescente e a área total da raiz. A análise anatômica qualitativa foi realizada na região pilífera.

Após captura das imagens, as medições da área de cada característica foram feitas no software de análise de imagens (imageJ) calibrado com uma régua micrométrica fotomicrografada nos mesmos aumentos das fotomicrografias.

Foram analisadas cinco raízes, fazendo uma lâmina para cada raiz e analisando cinco campos por lâmina, totalizando 25 avaliações para a análise de cada característica em cada tratamento.

3.6 Análise estatística

As análises estatísticas dos dados da anatomia e do índice mitótico foram realizadas utilizando-se o software SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2011). Antes da realização de uma análise paramétrica, os dados foram testados quanto à sua normalidade e os que não apresentaram distribuição normal, foram transformados. Os dados foram submetidos à análise de variância em delineamento inteiramente casualizado e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, com 5% de probabilidade de erro, ou submetidos ao teste de regressão. Para as anormalidades cromossômicas e nucleares foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) e a análise estatística foi realizada utilizando-se o software R (R Core Team, 2013). Os resultados foram expressos utilizando média e o erro padrão.

3.7 Tratamento de resíduos contaminados

As soluções preparadas com o efluente do polimento e bulbos contaminados foram encaminhadas ao Laboratório de Gestão de Resíduos Químicos da UFLA, para o correto tratamento e disposição final desses resíduos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da Composição química do efluente do polimento de rochas ornamentais

O resultado da análise qualitativa mostrou que dos 51 parâmetros rastreados pelo método de código ME – MS61, 16 deles foram encontrados no efluente do polimento de rochas ornamentais (Tabela 2).

Tabela 2 Resultados das análises químicas apresentando a concentração das substâncias presentes no efluente do polimento de rochas ornamentais coletadas em Nova Venécia-ES e o respectivo limite estabelecido pela NBR 10.004/2004 anexo G que contém os padrões classificação de efluentes industriais

Parâmetros	Unidade	Efluente do polimento	LMP
Alumínio Total	mg Al. L ⁻¹	0,07	0,2
Bário Total	mg Ba. L ⁻¹	0,02	0,7
Boro Total	mg B. L ⁻¹	0,15	**
Cálcio Total	mg Ca. L ⁻¹	9,47	**
Cloreto	mg Cl. L ⁻¹	1117	250
Estrôncio Total	mg Sr. L ⁻¹	0,10	**
Fenóis	mg C ₆ H ₅ OH.L ⁻¹	0,01	0,01
Fluoreto	mg F. L ⁻¹	0,31	1,5
Lítio Total	mg Li. L ⁻¹	0,21	**
Magnésio Total	mg Mg. L ⁻¹	366	**
Níquel Total	mg Ni. L ⁻¹	0,04	**
Potássio Total	mg K. L ⁻¹	133	**
Sódio Total	mg Na. L ⁻¹	194	200
Sulfato	mg SO ₄ . L ⁻¹	1,39	250
Tungstênio Total	mg W. L ⁻¹	0,23	**
Vanádio Total	mg V. L ⁻¹	0,01	**

*LMP – Limites Máximos Permissíveis segundo o Anexo G da NBR 10.004/2004.

** Não especificado no anexo G da NBR 10.004/2004.

As maiores concentrações foram observadas para os parâmetros Cl, Mg, K, e Na (Tabela 2). Para vários componentes detectados na composição da lama, não há determinação do limite máximo permitido pela legislação vigente estabelecida pela Resolução n° 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente –

CONAMA (BRASIL, 2011) que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes.

Muitos dos contaminantes deste efluente são provenientes da enorme quantidade de insumos e/ou produtos químicos como resinas, polímeros, pastilhas abrasivas que as empresas de beneficiamento utilizam durante o processo de polimento. Segundo Braga et al. (2010), a composição química da lama do polimento está diretamente relacionada ao tipo de pastilha abrasiva utilizada durante o processo.

Pelas análises, o cloreto foi um dos componentes encontrados em altas concentrações no efluente do polimento de rochas ornamentais (Tabela 2). Este resultado é corroborado por uma pesquisa que mostrou que a pastilha abrasiva, cuja composição apresenta cloretos, é a mais empregada nas empresas de polimento, devido ao seu baixo custo (BUZZI, 2008).

Para fins de comparação, a concentração de cloretos encontrada na amostra do efluente do polimento foi cinco vezes superior ao limite recomendado pela NBR 10.004/2004 anexo G que dispõe os padrões para classificação de resíduos. Se considerar esta concentração de cloreto e seguir os critérios de classificação estabelecidos por esta norma, o efluente proveniente do polimento de rochas ornamentais é um resíduo não inerte, isto é, representa risco ao meio ambiente. Pela Resolução nº 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, não é possível fazer nenhum tipo de comparação, pois o parâmetro “cloretos” não aparece especificado na tabela I que contém os valores máximos permitidos.

Segundo Ayers e Westcot (1999), os íons que mais frequentemente causam toxicidade são o cloreto, sódio e o boro. Distúrbios em relação ao balanço iônico e ao efeito específico dos íons sobre as enzimas e membranas celulares, são consequências de um excesso de sódio, e, sobretudo, um excesso de cloreto no protoplasma das células (LARCHER, 2000). No solo, o excesso de

cloretos provoca aumento da salinidade causando elevação do seu potencial osmótico e consequentemente prejuízos para as plantas devido ao decréscimo da disponibilidade de água.

O uso de águas, com predomínio de cloreto, para fins de irrigação promove danos à cultura indicando efeito fitotóxico uma vez que os cloretos são absorvidos pelas raízes e transportados às folhas onde é acumulado, acarretando queima nas bordas das folhas, principalmente em condições de alta evapotranspiração (MAIA; RODRIGUES; LACERDA, 2012).

Estudos sobre crescimento e acúmulo de íons em *Handroanthus serratifolius* cultivadas em solução salina, mostraram que o crescimento das plântulas desta espécie foi reduzido devido aos efeitos tóxicos resultantes do acúmulo de sódio e cloreto (PEREIRA; POLO, 2011).

Os outros elementos químicos que foram encontrados em concentrações maiores nas amostras do efluente do polimento, são magnésio, sódio e potássio. Estes elementos não se encontram na tabela 1 da Resolução nº 430 do CONAMA, portanto, não foi possível confrontar os dados para verificar se os teores estão acima do limite máximo permitido por esta legislação. No anexo G da NBR 10.004/2004 há especificação somente para o parâmetro sódio e este foi encontrado em teores bem próximos ao LMP (Tabela 2). Segundo Lima (2008), os principais elementos correlacionados com o nível de salinidade são os cátions de sódio, cálcio, magnésio e potássio e os ânions cloreto, sulfato, carbonato, bicarbonato, fluoreto e nitrato, os quais foram também encontrados na amostra do efluente do polimento de rochas ornamentais analisadas (Tabela 2). Sendo assim, os resultados obtidos para estes parâmetros revelam que o efluente em análise encontra-se com nível de salinidade preocupante. Os altos teores destes elementos químicos no efluente do polimento podem estar relacionados à composição química da própria rocha, pois segundo Braga et al. (2010), em seu trabalho sobre caracterização ambiental de lamas de beneficiamento de rochas,

vários elementos presentes nas amostras estudadas tiveram como principal origem a rocha beneficiada.

O sódio, quando presente em altas concentrações, poderá afetar a porosidade do solo comprometendo sua permeabilidade (MELO; MARQUES; MELO, 2002). Isto pode diminuir a capacidade de armazenamento e movimentação de água e aumentar a resistência mecânica à penetração de raízes (RIBEIRO; FREIRE; MONTENEGRO, 2003). Além disso, o excesso de sódio, eleva o pH do solo, causando desbalanços nutricionais e diminuindo a disponibilidade de alguns nutrientes às plantas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O teor de fenóis totais na amostra do efluente do polimento enquadrou-se no LMP da NBR 10.004/2004 anexo G (Tabela 1). Pela Resolução nº 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (BRASIL, 2011), o teor encontrado de fenóis nas amostras avaliadas não ultrapassou o LMP. Os fenóis são substâncias que têm causado uma constante preocupação do ponto de vista ambiental, por isso estão incluídos pelos órgãos de controle na lista de poluentes prioritários. Esta lista é composta pelas substâncias mais nocivas à saúde humana e ao ambiente. O alto grau de toxicidade, bioacumulação nas diferentes cadeias alimentares mesmo em baixas concentrações e persistência no ambiente são características inerentes aos fenóis que contribuem para sua inclusão na referida lista (RODRIGUES; SILVA; SILVA, 2010). Nas águas tratadas, os fenóis reagem com o cloro livre formando os clorofenóis, que produzem sabor e odor na água. Por estes motivos, os fenóis apresentam limites bastante restritivos para sua concentração nas águas. Segundo a Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (BRASIL, 2005), que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, a tolerância em relação à concentração de fenóis nas águas para consumo humano é 0,003 mg/L. A amostra do efluente do polimento apresentou concentração três vezes superior ao LMP. A presença dos fenóis advém das

resinas utilizadas durante o processo de polimento, pois suspeita-se que elas tenham fenóis em sua composição.

Para os demais parâmetros, não são encontrados os valores máximos permitidos na legislação brasileira vigente estabelecida pela Resolução n° 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Entretanto, os teores do Al, Ba, Ni, Fluoreto e o sulfato foram confrontados com os LMP dispostos na Resolução n° 357 do CONAMA que é relacionada à classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Essa análise comparativa mostrou que apenas o parâmetro Ni estava em desacordo com esta legislação.

Diante disso, entre os componentes encontrados no efluente do polimento, o cloreto, devido aos altos teores encontrados, e os fenóis devido ao nível de toxicidade, são os que merecem maior atenção. Contudo, é preciso considerar que essa análise reflete temporalidade, pois refere-se às condições da amostra naquele momento da coleta. Portanto, a composição química da amostra poderá mudar, uma vez que dependerá de vários fatores como: quantidade e tipo de rocha polida, tipo de pastilha abrasiva utilizada no processo de polimento. Desta forma, uma análise posterior poderá revelar diferentes concentrações e até mesmo a presença de outros componentes na amostra.

Ainda assim, há de se ter maior preocupação sobre a precisão dos valores máximos permitidos estabelecidos pelas legislações vigentes, uma vez que, alguns estudos têm mostrado que efeitos genotóxicos significativos têm sido observados, mesmo quando os valores da contaminação são inferiores aos permitidos (MATSUMOTO et al., 2006).

4.2 Análises do ciclo celular

4.2.1 Índice mitótico (IM)

A partir de valores dos índices mitóticos é possível avaliar o potencial de uma determinada substância em inibir ou aumentar a proliferação celular. As análises do IM das raízes de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do efluente do polimento, mostraram que o IM apresentou um comportamento linear significativo ($F = 12,78$ e $p \leq 0,01$). O aumento das concentrações do efluente do polimento promoveu um decréscimo linear no IM das raízes de *A. Cepa* após 20 dias de exposição, sendo que o menor valor para o IM foi encontrado na concentração 100% (v/v) que é o efluente na sua forma bruta (Figura 1).

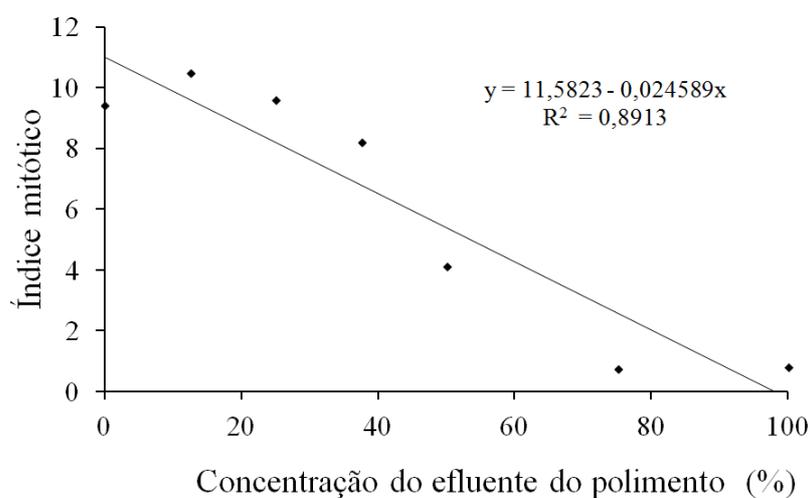


Figura 1 Índices mitóticos (IM) observados em células meristemáticas radiculares de *A. cepa* submetidas a diferentes concentrações do efluente proveniente do polimento de rochas ornamentais

O índice mitótico reflete a frequência de divisão celular e por isso é considerado um importante parâmetro nas avaliações de toxicidade, capaz de estimar os níveis do potencial citotóxico de um contaminante ambiental (KURAS et al., 2006; TURKOGLU, 2007). Segundo Leme e Marin-Morales (2009), resultados satisfatórios são mostrados em vários estudos que utilizaram avaliação do IM para detectar e mensurar a citotoxicidade.

O nível da citotoxicidade pode ser determinado pelo aumento ou decréscimo do IM (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Índices mitóticos (IMs) significativamente abaixo daquele observado no controle negativo, caracterizam queda no processo de divisão celular indicando que alguma substância química acarretou danos ao organismo-teste. Por outro lado, IMs acima daquele observado no controle negativo indicam aumento na divisão celular e também poderão indicar algum dano ao organismo-teste, uma vez que a proliferação celular desordenada pode ser responsável pela formação de tumores.

Os contaminantes podem alterar diversos eventos metabólicos e ao interagir com biomoléculas e estruturas celulares são responsáveis por efeitos fitotóxicos, tais como distúrbios do ciclo celular, da divisão celular e redução do crescimento (EZAKI et al., 2008). Samuel, Osuala e Odeigah (2010) avaliaram a citotoxicidade de efluentes industriais sobre *A. cepa* e verificaram que o índice mitótico diminuiu com as concentrações crescentes do efluente. Resultados semelhantes foram obtidos após exposição da raiz de *A. cepa* ao SPL, um resíduo sólido gerado pela indústria produtora de alumínio (ANDRADE-VIEIRA; CAMPOS; DAVID, 2012).

Considerando as concentrações testadas do efluente do polimento, pode-se concluir que, o decréscimo do IM inversamente proporcional à concentração do resíduo, verificado neste estudo, demonstra que o aumento da concentração do efluente do polimento inibiu a divisão celular da região meristemática das

raízes de *A. cepa*, sugerindo toxicidade promovida pelas substâncias presentes neste efluente.

4.2.2 Anormalidades nucleares (AN)

Os bulbos de *A. cepa*, quando expostos às diferentes concentrações do efluente do polimento de rochas ornamentais, apresentaram anormalidades nucleares (AN) em células meristemáticas radiculares (Figura 2 e Tabela 3).

As anormalidades nucleares (AN) podem ser consideradas alterações na morfologia dos núcleos interfásicos após exposição a algum tipo de agente tóxico (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Considerando esta caracterização, as frequências totais de AN, em todas as concentrações do efluente do polimento, foram superiores às encontradas no controle negativo, sendo a maioria delas estatisticamente significativas, com exceção das concentrações 100% e 75% (v/v). A brusca redução das frequências de AN para as maiores concentrações testadas do efluente do polimento pode ter sido em decorrência de outros danos drásticos sofridos pelas células, tais como, a alta frequência de núcleos condensados e o alto grau de degradação dos núcleos nas células meristemáticas da raiz de *A. cepa* expostas a estas concentrações (Tabela 4 e Figura 3). A análise da frequência total de AN indicou efeito genotóxico dos componentes químicos presentes no efluente do polimento e verificou-se que houve um efeito crescente da toxicidade a partir da concentração 25% (v/v) até a concentração 50% (v/v). Pela análise, apenas da frequência total de AN, não é possível definir os mecanismos de ação destes sobre o material genético da célula, porém analisando isoladamente cada tipo de anormalidade observada, pode-se inferir sobre estes possíveis mecanismos, classificando-os como de ação clastogênica ou aneugênica.

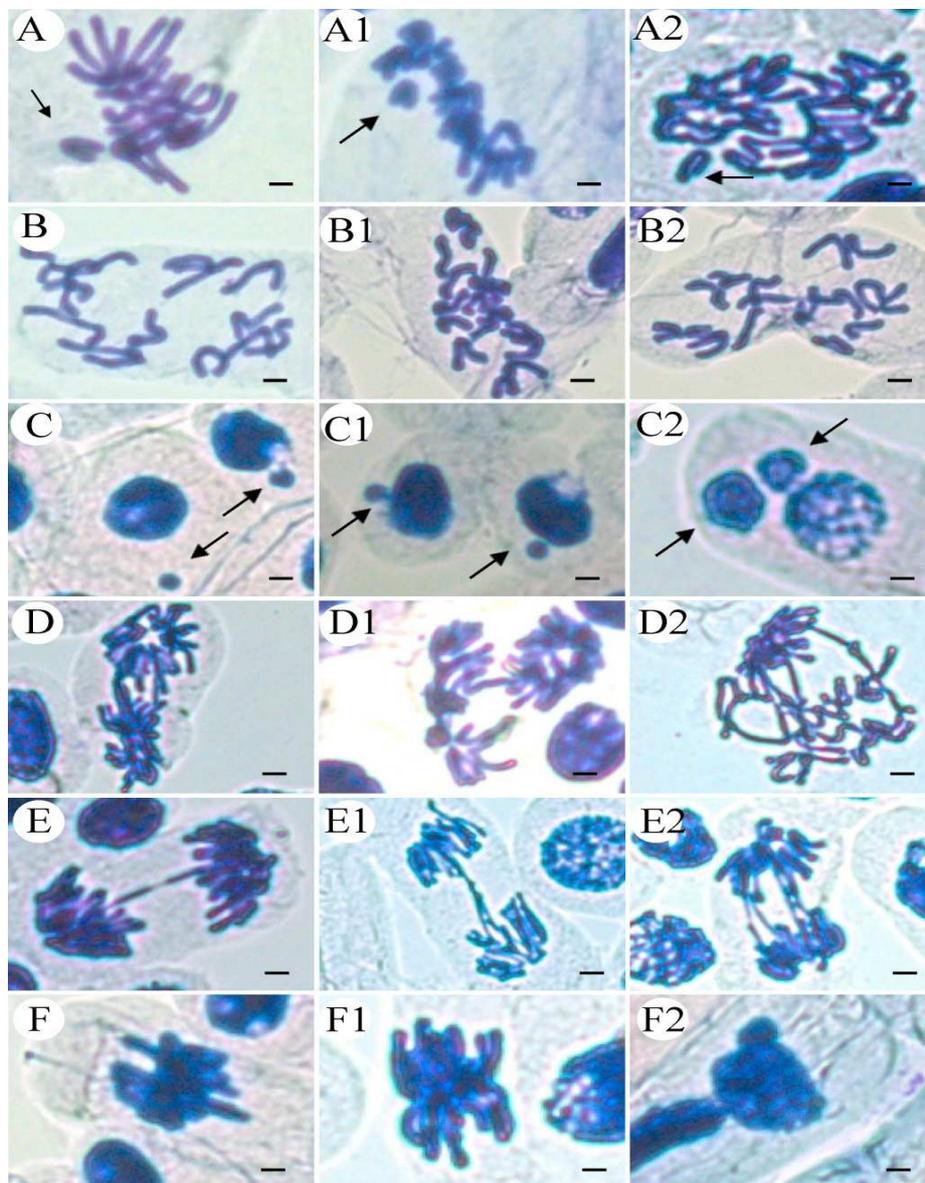


Figura 2 Danos observados nas células das raízes de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações do efluente do polimento. A-A2- Cromossomos perdidos; B-B2- C- Metáfases; C-C2- Micronúcleos; D-D2- Multipolaridade; E-E2- Pontes cromossômicas, F-F1- Stickiness; F2- Broto nuclear. Barra 50 μm

Tabela 3 Médias da Frequência (%) de AN, MN, brotos nucleares, núcleos lobulados e células binucleadas, núcleos poliplóides e assincrônicos observadas em células meristemáticas radiculares de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do efluente do polimento de rochas ornamentais e aos testes de controle negativo (água destilada) e positivo (MMS), após 20 dias

Concentração do efluente do polimento (%) v/v	AN (%) ¹	Tipos de Anormalidades (%) ²					
		Brotos	MN	Núcleos lobulados	Célula poliplóide	Núcleos assincrônicos	Célula binucleada
CN	0,02 ± 0,004 e	0 b	0,02 ± 0,004 d	0 b	0 a	0 a	0 a
12,5	0,34 ± 0,025 cd	0,02 ± 0,004 b	0,32 ± 0,027 bc	0 b	0 a	0 a	0 a
25	0,90 ± 0,043 b	0,54 ± 0,044 a	0,28 ± 0,033 bcd	0 b	0,02 ± 0,004 a	0,04 ± 0,004 a	0,02 ± 0,004 a
37,5	0,94 ± 0,058 bc	0,62 ± 0,054 a	0,32 ± 0,007 b	0 b	0 a	0 a	0 a
50	1,88 ± 0,224 b	1,20 ± 0,200 a	0,34 ± 0,025 bc	0,16 ± 0,027 a	0,02 ± 0,004 a	0,16 ± 0,032 a	0 a
75	0,18 ± 0,027 de	0,06 ± 0,008 b	0,12 ± 0,019 cd	0 b	0 a	0 a	0 a
100	0,04 ± 0,004 e	0 b	0,04 ± 0,004 d	0 b	0 a	0 a	0 a
CP	2,52 ± 0,081 a	0,76 ± 0,060 a	1,52 ± 0,059 a	0,04 ± 0,004 a	0 a	0,20 ± 0,025 a	0 a

Médias seguidas de erro padrão. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade de erro. MN – micronúcleos, AN – anormalidades nucleares (alterações do tipo MN, brotos, núcleo lobado e célula binucleada, núcleos poliplóides e assincrônicos), CN- controle negativo (água destilada) e CP – controle positivo (MMS metil metano sulfonato).

¹ AN (%) = total de anormalidades nucleares x 100 / total de células avaliadas.

² (%) = tipo de anormalidade observada x 100 / total de células avaliadas.

Os brotos foram as anormalidades nucleares encontradas com maior frequência e observou-se um aumento deste tipo de anormalidade a partir da concentração 12,5% (v/v) até 50% (v/v). Porém, as frequências foram estatisticamente significativas nas concentrações 25; 37,5 e 50% (v/v) em relação ao controle negativo (Tabela 3). Segundo Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2007), o núcleo ao eliminar material genético forma uma espécie de protrusão gerando os brotos nucleares que posteriormente podem se separar do núcleo dando origem a micronúcleos e microcélulas. Desta forma, a presença de brotos nucleares é uma forte evidência de ação aneugênica dos componentes do efluente do polimento indicando que estes componentes apresentam afinidade e interação com o fuso mitótico.

O segundo tipo de AN mais encontrado foram os micronúcleos (MN). Esta anormalidade é considerada, por diversos autores, um excelente parâmetro para avaliar efeitos de agentes tóxicos pois permitem análises simples e eficazes (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Os MN se originam de alterações nos cromossomos ou no DNA que as células não conseguem reparar podendo ser repassadas para as futuras gerações celulares, portanto, facilmente fixadas nos organismos. Por estas razões, a presença de MN em células é indicação de mutagenicidade (VENTURA; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008). Segundo Yi e Meng (2003), os MN podem levar a célula à morte devido à supressão de genes essenciais para a proliferação celular.

As frequências de MN observadas nas células meristemáticas de *A. cepa* foram maiores e estatisticamente significativas às encontradas no controle negativo, para a maioria das concentrações testadas do efluente do polimento, com exceção das concentrações 100, 75 e 25% (v/v) (tabela 3). A drástica redução de MN nas maiores concentrações do efluente, também pode estar

relacionada com o alto comprometimento celular promovido pela incidência de núcleos condensados e degradados neste tratamento.

Anormalidades cromossômicas como cromossomos perdidos ou fragmentados podem dar origem aos MN. Além disso, os brotos nucleares, recurso utilizado pelas células para tentar restaurar a ploidia normal em casos de poliploidização, também podem originar os MN. A figura 2C1, mostra a eliminação de um MN a partir de um broto nuclear, sendo uma forte evidência de que brotos podem ser geradores de MNs.

Segundo Leme e Marin-Morales (2009), a presença de MN além de avaliar os efeitos mutagênicos, permite uma investigação dos mecanismos de ação dos agentes químicos, visto que estas AN podem ser provenientes tanto de fragmentos cromossômicos resultantes de uma quebra (ação clastogênica) quanto de cromossomos inteiros e perdidos (ação aneugênica) durante o processo de divisão celular. Diante disso e pelas frequências estatisticamente significativas de MN nas concentrações testadas: 50; 37,5, e 12, 5 % (v/v) pode-se pressupor que, nas referidas concentrações, o efluente proveniente do polimento de rochas ornamentais apresenta uma ação mutagênica e genotóxica sobre o organismo-teste *A. cepa* evidenciando um modo de ação tanto aneugênico quanto clastogênico.

Os núcleos lobulados foram observados em células meristemáticas de raízes expostas apenas à concentração 50% (v/v) do efluente do polimento. A frequência encontrada para esta anormalidade foi estatisticamente diferente daquela encontrada no controle negativo e semelhante aquela encontrada no controle positivo (Tabela 3). Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2009) afirmam que núcleos lobulados podem ser originados a partir de anáfases multipolares, uma vez que a presença de multipolaridade parece não impedir que o envoltório nuclear se reestruture. Dessa forma, o envoltório acompanha a distribuição irregular do material genético na célula e origina o núcleo lobulado.

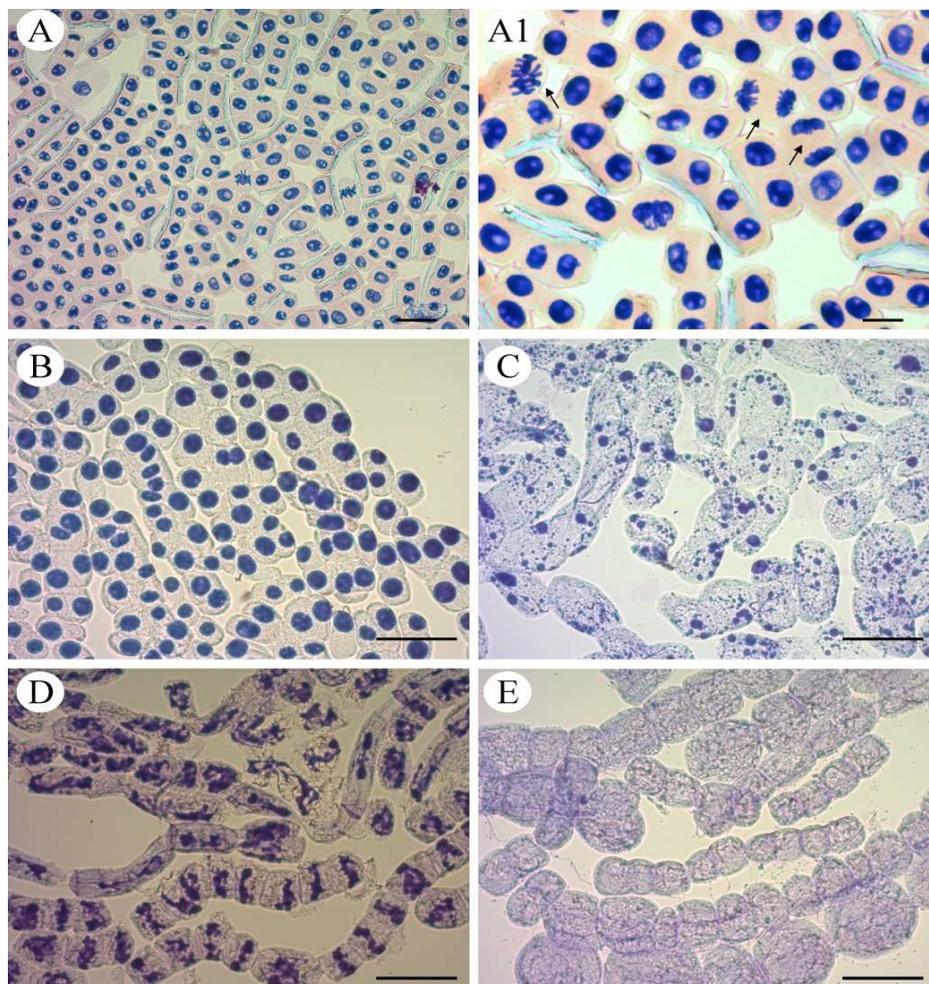


Figura 3 Fotomicrografias de diferentes morfologias, associadas ao processo de morte celular programada em células meristemáticas de pontas de raízes de *A. cepa* após exposição ao efluente do polimento. (A e A1) Células meristemáticas do tratamento de controle negativo com algumas fases do processo mitótico (setas) e (B), (C), (D) e (E) células meristemáticas após 20 dias de exposição ao efluente do polimento na concentração 100% v/v; (B) Núcleos altamente condensados, fortemente corados e a ausência de divisão celular; (C) Núcleos fragmentados em pequenas esferas formando corpúsculos heterocromáticos no interior do citoplasma; (D) Núcleos com alto grau de degradação; (E) Células com degradação total do núcleo. Barra 50 μm

Outro parâmetro utilizado neste estudo para avaliar os efeitos do efluente do polimento sobre o organismo-teste *A. cepa*, foi a ocorrência de condensação nuclear.

As células meristemáticas do ápice das raízes de *A. cepa* após exposição ao efluente do polimento de rochas ornamentais apresentaram núcleos em diversos graus de condensação e degradação da cromatina (Figura 3B, 3C, 3D e 3E).

Para a ocorrência de núcleos condensados (NC), observou-se valores crescentes das frequências a medida que aumentou a concentração do efluente. Com exceção da concentração 12,5% v/v, a frequência de NC diferiram significativamente do controle negativo (água destilada). Comparando-se ao controle positivo (MMS), exceto para as concentrações 12,5 e 25% v/v, em todas as demais a frequência de NC foram muito superiores (Tabela 4).

Tabela 4 Médias da Frequência (%) de núcleos condensados, observados em células meristemáticas radiculares de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do efluente do polimento de rochas ornamentais e aos testes de controle negativo (água destilada) e positivo (MMS), após 20 dias

Concentração do efluente do polimento (%) v/v	Núcleos condensados (%)¹
Controle negativo (água destilada)	0 d
12,5	0,32 ± 0,041d
25	12,94 ± 1,083 c
37,5	6,32 ± 0,606 c
50	32,42 ± 1,382 b
75	80,34 ± 2,825 a
100	83,16 ± 2,540 a
Controle positivo (MMS)	2,340 ± 0,916 c

Médias seguidas de desvio padrão. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade de erro. MMS – metil metano sulfonato.

¹ NC (%) = total de núcleos condensados x 100 / total de células avaliadas.

Entre os indicadores de ocorrência de toxicidade está a presença de células com núcleos excessivamente condensados em processo de morte. Em

organismos multicelulares isto pode ocorrer quando as células sofrem danos causados por exposição a agentes tóxicos, desencadeando uma complexa sequência de eventos que podem resultar em morte celular, processo conhecido como morte celular programada (MCP) (GICHNER et al., 2005).

Segundo Behboodi e Samadi (2004), os principais eventos durante o processo de MCP em plantas são as mudanças nas características morfológicas como núcleos condensados e marginais, esferas de cromatina condensada, núcleos fragmentados e corpos apoptóticos semelhantes aos encontrados nas células animais em apoptose.

Embora existam algumas dúvidas sobre a formação de corpos apoptóticos em células vegetais (WANG; BOSTOCK; GILCHRIST, 1996), tem-se observado em plantas a sequência de eventos de MCP como o fluxo de cálcio, liberação mitocondrial de proteínas apoptóticas, ativação de proteases e finalmente a destruição da célula, resultando em morfologia celular do tipo apoptótica observadas em células animais (REAPE; MCCABE, 2010).

As células expostas às concentrações do efluente e observadas nesse estudo apresentaram diferentes graus de destruição celular como: núcleos pequenos e excessivamente corados (Figura 3B), núcleos fragmentados formando corpúsculos heterocromáticos no interior do citoplasma (Figura 3C), núcleos com alto grau de degradação nuclear (Figura 3D) e degradação total do núcleo (Figura 3E).

Neste estudo, observou-se algumas características morfológicas celulares semelhantes às aquelas encontradas na apoptose de células animais. Tem sido sugerido que as células vegetais podem degradar os seus núcleos durante o processo de MCP de maneira semelhante à apoptose. Esta degradação nuclear leva ao aparecimento de estruturas semelhantes aos corpos apoptóticos, que por sua vez, são digeridos pelas enzimas presentes nos vacúolos citoplasmáticos (BEHBOODI; SAMADI, 2004; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011). Os núcleos

mostrados na Figura 3C indicam um estágio final de morte celular sugerindo grande semelhança com os corpos apoptóticos mencionados nos trabalhos destes autores.

Verificou-se ocorrência de células em processo de morte nas raízes expostas a todas as concentrações testadas. Para as concentrações 100 e 75% (v/v), o percentual de núcleos condensados e degradados ultrapassou 80%. Pode-se perceber que nas concentrações 25 e 37,5% (v/v), a frequência de NC foi semelhante àquela encontrada no controle positivo (MMS) e que a partir da concentração 50% (v/v) esta frequência foi ainda superior àquela encontrada no controle positivo (Tabela 4). Portanto, a indução de condensação nuclear foi um efeito claro e marcante nas células meristemáticas das raízes de *A. cepa*, provocado pelo efluente do polimento indicando que as células exibem morte programada.

Alterações nucleares como núcleos condensados também foram observados em células meristemáticas de *A. Cepa* expostas ao SPL e de *Lactuca sativa* expostas ao óleo de *Jatropha curcas* indicando que as células sofreram morte celular programada (ANDRADE-VIEIRA et al., 2011; ANDRADE-VIEIRA et al., 2014). Liu et al. (2007) também demonstraram a ocorrência de condensação nuclear como um dos marcadores de PCD em células meristemáticas de arroz após estresses osmóticos por sal.

Alterações desse tipo interferem, diretamente, na viabilidade celular, comprometendo, diferentes processos fisiológicos do organismo, portanto, fortemente relacionados à citotoxicidade (KAIUOMOVA; SÜSAL; OPELZ, 2001).

Diante disso, a maioria das concentrações testadas do efluente, induz à MCP do tipo apoptose em células meristemáticas de *A. cepa*, ratificando o alto potencial de citotoxicidade deste resíduo sobre o organismo-teste.

4.2.3 Anormalidades cromossômicas (AC)

As células meristemáticas do ápice das raízes de *A. cepa*, após exposição ao efluente do polimento em diferentes concentrações, apresentaram diversas anormalidades cromossômicas (AC) durante o processo de divisão celular, tais como: pontes nas anáfases e, em menor frequência na telófase, anáfases com multipolaridade, C-metáfases, stickiness, cromossomos perdidos e fragmentados (Tabela 5, Figura 2).

As anormalidades cromossômicas resultam de alterações na estrutura cromossômica e/ou no número total de cromossomos e isto pode ocorrer de forma espontânea ou devido à exposição a agentes químicos ou físicos (RUSSEL, 2002). As anormalidades cromossômicas são reconhecidas como consequências de ações genotóxicas de agentes químicos (NATARAJAN, 2002). Segundo Leme, Angelis e Marin-Morales (2008), as AC em células de *A. cepa* são um parâmetro eficiente para investigação do potencial genotóxico de vários poluentes ambientais como, por exemplo, os efluentes industriais.

Assim como ocorreu para as frequências de AN, as frequências de AC na maioria das concentrações testadas (12,5; 25; 37,5 e 50% (v/v)) diferiram estatisticamente do controle negativo, com exceção das concentrações 100 e 75% (v/v). As maiores frequências ocorreram nas células expostas às concentrações 25 e 37,5% (v/v) com valores, aproximadamente, 20 vezes superior ao controle negativo. Em relação ao controle positivo observou-se que os valores das frequências de AC foram ainda superiores para as concentrações 12,5%; 25% e 37,5% (v/v) (Tabela 5). A ausência de AC nas células expostas às maiores concentrações do efluente estaria associada à redução na taxa de divisão celular e à elevada incidência de núcleos condensados e degradados observadas neste tratamento.

Tabela 5 Médias da frequência (%) do total de anormalidades cromossômicas (AC) e de cada tipo de AC observados em células meristemáticas radiculares de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do efluente proveniente de rochas ornamentais e aos testes de controle negativo (água destilada) e positivo (MMS), após 20 dias

Concentração do efluente (%) v/v	AC (%) ¹	Tipos de Anormalidades (%) ²				
		Stickiness	Pontes	Multipolaridade	C-metáfases	Cromossomos perdidos
CN	0,08 ± 0,016 de	0,04 ± 0,008 c	0 c	0 b	0,02 ± 0,004 ab	0,02 ± 0,004 ab
12,5	1,44 ± 0,025 ab	0,98 ± 0,037 a	0,30 ± 0,024 ab	0 b	0,1 ± 0,008 a	0,06 ± 0,004 a
25	1,70 ± 0,016 a	1,14 ± 0,048 a	0,28 ± 0,023 ab	0,04 ± 0,008 b	0,12 ± 0,019 ab	0,12 ± 0,019 ab
37,5	1,62 ± 0,035 a	0,98 ± 0,014 a	0,36 ± 0,010 a	0,06 ± 0,004 a	0,12 ± 0,009 a	0,10 ± 0,008 a
50	0,58 ± 0,071 bc	0,36 ± 0,048 b	0,08 ± 0,011 c	0 b	0,10 ± 0,012 ab	0,04 ± 0,004 ab
75	0,02 ± 0,004 de	0,02 ± 0,004 c	0 c	0 b	0 b	0 b
100	0 e	0 c	0 c	0 b	0 b	0 b
CP	0,38 ± 0,044 cd	0,18 ± 0,022 bc	0,12 ± 0,019 bc	0 b	0,06 ± 0,008 ab	0 b

Médias seguidas de erro padrão. As frequências seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade de erro. AC – anormalidades cromossômicas (alterações do tipo stickiness, pontes, c-metáfases, multipolaridade e cromossomos perdidos), CN – Controle negativo: água destilada, CP – Controle positivo: MMS metil metano sulfonato.

¹ AC (%) - Total de anormalidades cromossômicas observadas x 100 / total de células avaliadas.

² Tipo de AC observada x 100 / total de células avaliadas.

Dentre as possíveis AC encontradas, as mais frequentes foram do tipo stickiness. Embora tenham sido encontrados nas células expostas à maioria das concentrações analisadas, exceto a concentração (100% v/v), resultados significativos em relação ao controle negativo foram verificados para quatro concentrações testadas: 12,5%; 25%; 37,5% e 50% (v/v) e ainda observou-se que em três destas concentrações a frequência de stickiness foi superior ao controle positivo. O fato dos dados terem mostrado que o resíduo promoveu aderências cromossômicas, de forma significativa em células de *A. cepa*, somente naquelas concentrações (12,5%; 25%; 37,5% e 50% v/v), está relacionado mais uma vez com as altas taxas de condensação nas demais concentrações.

A presença de stickiness reforça as evidências da ação aneugênica do efluente do polimento de rochas ornamentais, já descritas para as AN brotos nucleares citadas anteriormente. Provavelmente, substâncias aneugênicas presentes no efluente do polimento interferiram na formação do fuso mitótico ou induziram a quebras nos telômeros. Em decorrência disso o processo normal de condensação foi alterado e aglomerados de cromossomos se formaram na célula.

Segundo El-Ghamery, El-Kholy e El-Yousser (2003) e Turkoglu (2007), o dano, caracterizado pela aparência pegajosa dos cromossomos, pode levar a comprometimentos irreversíveis à célula, inclusive à sua morte, efeito este que também foi verificado neste estudo. Como já foi discutido, núcleos condensados são considerados ótimos indicadores citológicos de morte celular. Ao comparar o elevado percentual de anormalidades do tipo stickiness observado nas células expostas às concentrações menores, verifica-se que os resultados procedem, uma vez que stickiness é outro parâmetro também relacionado à morte celular.

Além disso, devido às quebras nos telômeros, outras anormalidades surgem a partir de stickiness, tais como eventos de fusão e pontes. Segundo Murname (2006), os telômeros têm um papel importante na manutenção da

estabilidade cromossômica e a ausência destes devido à quebras em regiões subteloméricas deixam os cromossomos susceptíveis a fusão. McClintock (1941) em trabalho clássico de citogenética com milho mostrou que a falta de reparo nas terminações cromossômicas danificadas poderiam gerar ciclos de cromossomos degenerados que denominou quebra-fusão-ponte. Este ciclo começa quando um cromossomo danificado, devido à perda do telômero, se duplica e as cromátides irmãs se fundem. Dessa maneira, surgem cromossomos com dois centrômeros, designados por cromossomos dicêntricos e durante a anáfase, estes centrômeros são puxados em direções opostas gerando uma ponte cromossômica. A ascensão dos cromossomos para os polos da célula provocará a quebra do DNA num sítio aleatório entre os dois centrômeros resultando em cromátides sem telômeros. As células filhas resultantes recebem cromossomos com ausência de telômeros permitindo a fusão entre as duas extremidades desprotegidas. Dessa forma, a sequência dos eventos descritos se repete estabelecendo um ciclo conhecido como quebra-fusão-ponte.

A ocorrência desse ciclo justifica que o segundo tipo mais frequente de AC evidenciado neste estudo foram as pontes cromossômicas. Para Leme e Marin-Morales (2009), anormalidades como estas são indicadoras de uma ação clastogênica, ratificando o potencial do efluente do polimento em promover quebras cromossômicas. No presente estudo, foram observadas frequências de pontes cromossômicas nas anáfases sempre superiores significativamente às observadas no controle negativo para as células expostas às concentrações 12,5; 25 e 37,5% (v/v) e similar ao observado para a ocorrência de stickiness (Tabela 5). A não orientação dos cromossomos na placa metafásica e, conseqüente, permanência dos mesmos dispersos no citoplasma caracterizam a anormalidade conhecida como C-metáfase. Estas anormalidades resultam de restrições na polimerização de microtúbulos que por sua vez impedem a formação das fibras

do fuso mitótico, responsáveis pela direção e distribuição cromossômica na célula (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007).

As análises indicaram a presença de baixas frequências de C-metáfases nas células meristemáticas de *A. cepa* exposta ao efluente do polimento. As C - metáfases não foram encontradas somente nas duas maiores concentrações testadas (75 e 100% (v/v)), pois nestas ocorreram, predominantemente, núcleos condensados e degradados. Porém, as frequências encontradas de C-metáfases não foram diferentes estatisticamente em relação ao controle negativo (Tabela 5). As anormalidades desse tipo, assim como os stickiness já discutidos, indicam um efeito predominantemente aneugênico. Estudos de Fiskesjö (1985), Odeigah et al. (1997) e Kirsch-Volders et al. (2002), afirmam que células poliplóides e binucleadas podem ser originadas de AC do tipo C-metáfases. Portanto, a presença destas anormalidades pode explicar a ocorrência, embora não significativa, de células poliplóides e binucleadas nas raízes expostas às concentrações 50 e 25% (v/v), onde também foram observadas as C-metáfases.

Associar as substâncias químicas presentes no efluente com as anormalidades cromossômicas e nucleares é uma tarefa difícil, uma vez que esta água é composta por diversos contaminantes provenientes do processo beneficiamento e, portanto, é considerada uma mistura complexa. Assim, mesmo que se conheça o potencial genotóxico de cada um deles, não deveríamos fazê-lo, uma vez que alguns fatores tendem a afetar a toxicidade dos diferentes elementos presentes na amostra desta mistura complexa. Este fato ocorre em função das diversas interações que podem ocorrer entre os contaminantes (BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 1992). Por exemplo, os metais pesados como chumbo, cobre e zinco na presença de outros metais como sódio, cálcio, potássio e magnésio podem associar-se e terem sua toxicidade reduzida. Porém o efeito contrário também pode ocorrer, neste caso, poderá haver uma interação entre seus componentes químicos tornando-se, por sinergismo, muitas

vezes a mistura mais tóxica do que cada um dos seus componentes se avaliados separadamente. Andrade-Vieira, Campos e David (2012) avaliando genotoxicidade do SPL, que são resíduos gerados pela indústria produtora de alumínio e constituídos por mais de um tipo de contaminante, propuseram uma ação sinérgica de seus contaminantes para induzir anormalidades. Palmieri et al. (2014) avaliaram cada componente do SPL em células meristemáticas radiculares em *A. cepa* e confirmaram o sinergismo que havia sido proposto.

Desta forma, sem inferir qual (quais) a(s) substância(s) presente(s) na água residuária estudada provocou/provocaram a ação, os dados indicam que, em menores concentrações, a ação dos componentes do efluente sobre o organismo-teste *A. cepa* seja aneugênica, em vista da maior frequência de anormalidades do tipo stickness e brotos nucleares. Por outro lado, o alto percentual de núcleos condensados encontrados nas células expostas às maiores concentrações juntamente com a severa inibição do crescimento radicular observada na análise visual dos bulbos são suficientes para apontar que a principal contribuição dos componentes do efluente do polimento, nas maiores concentrações, é a indução de morte celular. Isto é explicado pelo fato das células expostas ao efluente na sua forma bruta, apresentar um número de núcleos condensados e degradados muito superior ao daquelas células do controle negativo e das demais concentrações avaliadas.

Pela análise geral de todas as anormalidades celulares verificadas neste trabalho (AN, AC e NC), os resultados da avaliação revelaram que há efeitos citotóxicos e genotóxicos sendo provocados pelo efluente do polimento sobre o organismo-teste utilizado. Além disso, observou-se, ao final de 20 dias de exposição, que quanto maior a concentração do resíduo testado, maiores são as frequências de células danificadas, havendo, então, uma relação positiva de dose-resposta do efluente do polimento para o organismo-teste *A. cepa* (Tabelas 3, 4 e 5; Figuras 3 e 4).

4.3 Caracterização anatômica

4.3.1 Análise macroscópica

O efeito do efluente sobre o crescimento das raízes na planta teste foi verificado por meio da visualização dos bulbos nos primeiros 10 dias de exposição, os quais apresentaram redução no tamanho e na quantidade de raízes produzidas sugerindo uma inibição e/ou retardo no desenvolvimento das mesmas, principalmente nas maiores concentrações (Figura 4).

As raízes dos bulbos de *A. cepa*, expostos à concentração 100 e 75% v/v, apresentaram oxidação e necrose. Após a protrusão das raízes ocorreu um escurecimento dos seus ápices e à medida que passava o tempo de exposição, cessava o crescimento e os tecidos radiculares entravam em processo de degradação indicando a toxicidade provocada pelo resíduo. Apesar disso, a exposição por mais 10 dias possibilitou a produção de raízes em quantidade suficiente para as análises anatômicas e citogenéticas.

A observação da ocorrência ou não de germinação e da alongação de raízes expostas a um determinado agente tóxico é considerada uma das formas mais simples para avaliar toxicidade de amostras líquidas contaminadas (WANG; WILLIAM, 1990; WANG; KETURI, 1990; ARAÚJO; SAHYOUN; MONTEIRO, 2001).

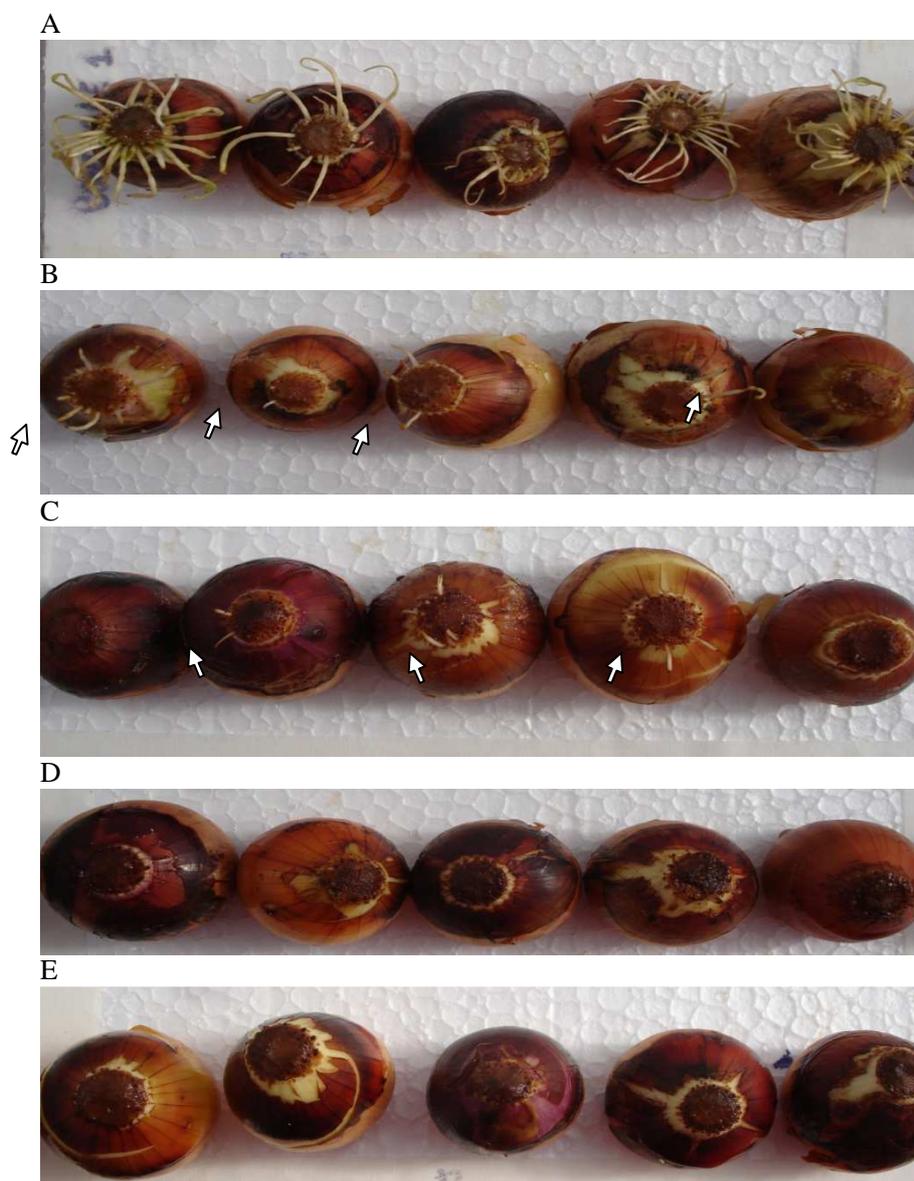


Figura 4 Sinais de toxicidade nos bulbos de *A. cepa* após 10 dias de exposição a concentrações crescentes do efluente do polimento. (A) Controle negativo com formação e crescimento normal de raízes. (B), (C), (D) e (E) Bulbos apresentando severa inibição no processo de formação das raízes (seta), quando expostos à concentração 25%, 50%, 75% e 100% v/v do efluente do polimento, respectivamente

Segundo Adam e El-Ashry (2010), o crescimento de raízes está estreitamente relacionado com o índice mitótico da região meristemática radicular, uma vez que a produção de novas células é de responsabilidade dessa região da raiz. Portanto, a severa inibição do crescimento radicular nas maiores concentrações e o retardo nas menores concentrações observada na análise visual dos bulbos poderá ser explicada por esta restrição das divisões celulares em virtude do baixo IM. Associado ao baixo IM, o nível de salinidade em virtude da alta concentração de cloreto no efluente é outro fator que explica a inibição do crescimento radicular. O baixo potencial osmótico do meio externo provocado pelo excesso de cloreto levou à diminuição da pressão de turgor necessária ao crescimento celular e subsequente morte celular. A tolerância de bulbos de *A. cepa* à salinidade foi testada e verificaram um declínio da produtividade com diminuição do diâmetro e do peso do bulbo, do crescimento das raízes, da altura de planta e do número de folhas por planta (SHANNON; GRIEVE, 1999).

4.3.2 Anatomia quantitativa da raiz de *Allium cepa* exposta a diferentes concentrações do efluente do polimento

O ápice da raiz em corte longitudinal permite visualizar os meristemas primários: protoderme, procâmbio e meristema fundamental. A área ocupada por estes tecidos na raiz apresentou alterações quantitativas com a exposição ao efluente do polimento de rochas ornamentais e ao metil metano sulfonato (MMS), substância usada como controle positivo (CP) (Figuras 5 e 6).

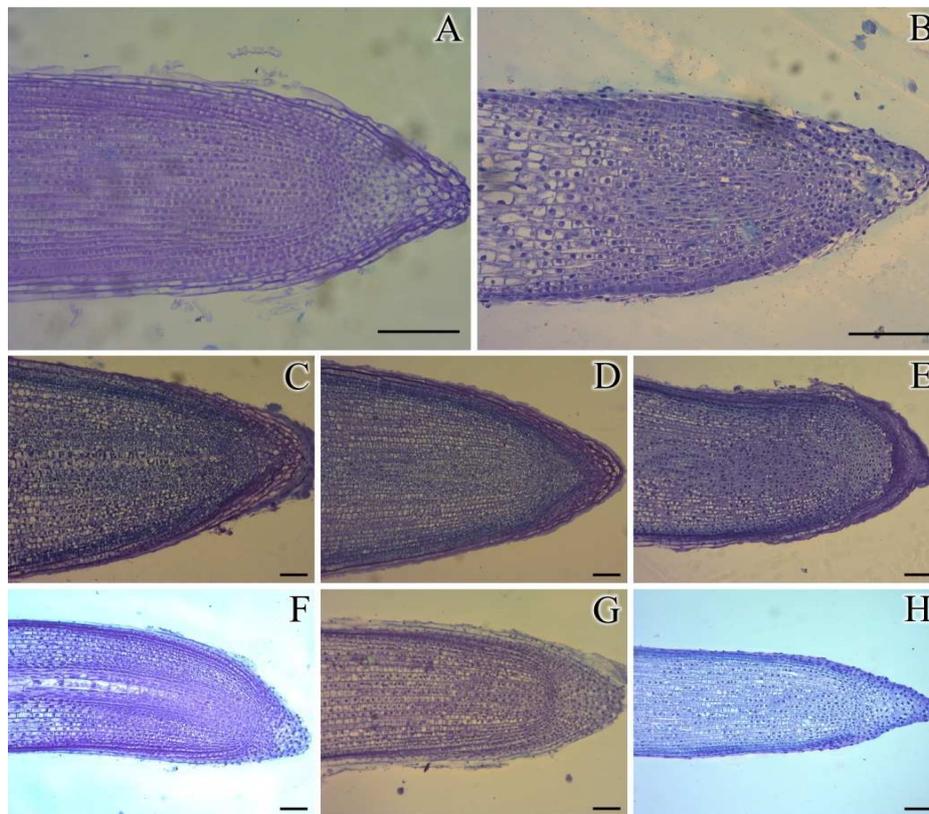


Figura 5 Características anatômicas radiculares de bulbos de *A. cepa* após 20 dias de exposição a diferentes concentrações do efluente do polimento de rochas ornamentais: A – água destilada (controle negativo), B – metil metano sulfonato MMS (controle positivo), C – 100% v/v, D – 75% v/v, E – 50% v/v, F – 37,5% v/v, G – 25% v/v, H – 12,5% v/v. Barra 100 µm

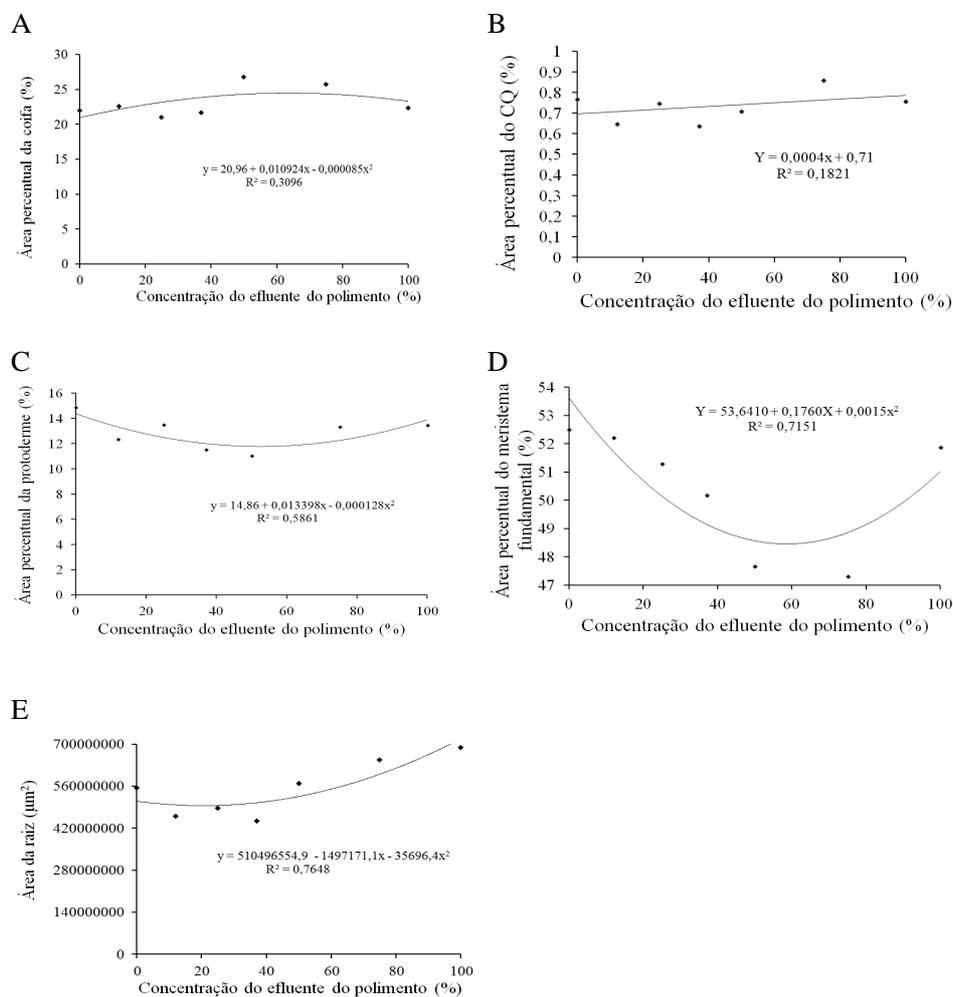


Figura 6 Área percentual (%) da coifa (A), do CQ (B), da protoderme (C), do meristema fundamental (D) e área total (μm^2) (E) da raiz de *A. cepa* exposta a concentrações crescentes do efluente do polimero, por um período de 20 dias. CQ – Centro Quiescente

O efluente do polimero de rochas ornamentais induziu modificações significativas na anatomia radicular de *A. cepa*. Nesse estudo, o percentual de área da coifa apresentou um comportamento quadrático significativo em que há

um aumento deste percentual até a concentração próxima de 50% (v/v) do efluente do polimento. A partir dessa concentração observou-se uma tendência de estabilização da área percentual para esta característica (Figura 6A). O centro quiescente foi outra característica avaliada que também respondeu de forma semelhante. Houve um aumento proporcional e linear no seu percentual de área em função do aumento das concentrações do efluente do polimento (Figura 6B).

A área percentual da protoderme e do meristema fundamental apresentaram um comportamento quadrático significativo e houve uma tendência de redução da área percentual para estas características. A área percentual estimada destes meristemas foi inferior a do grupo controle, nas diferentes concentrações (Figuras 6C e 6D).

A área total da raiz apresentou comportamento quadrático mostrando um acréscimo a partir da concentração 50% v/v do efluente do polimento (Figura 6E).

Para a área percentual do procâmbio houve diferença significativa em relação ao controle negativo, no entanto, as médias não se ajustaram ao modelo de regressão linear ou quadrático. As médias foram classificadas em grupos pelo teste de Scott-Knott, mostrando que a área percentual do procâmbio diminuiu apenas nas concentrações 12,5% e 50% (v/v) (Tabela 6).

Além dos fatores genéticos envolvidos, as diferentes condições ambientais podem ser fatores determinantes em mudanças estruturais nas raízes (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

A coifa, em vista longitudinal, reveste parte da zona meristemática que é a região onde ocorre intensa divisão celular para originar os tecidos da raiz em estágio secundário. Além de revestir e proteger parte da zona meristemática a coifa é uma estrutura que ajuda a raiz a penetrar no solo e a protege da ação de microrganismos. Vários estudos mostram que injúrias na coifa e nas células meristemáticas ativam as divisões celulares no centro quiescente e essa ativação

pode resultar na restauração do crescimento radicular e formação de uma nova coifa quando plantas são submetidas a diferentes tratamentos (BARLOW; RATHFELDER, 1985; JIANG; FELDMAN, 2003; KRAVETS et al., 2012).

Tabela 6 Médias da área percentual do procâmbio da raiz de *A. cepa* exposta a concentrações crescentes do efluente do polimento de rochas ornamentais por um período de 20 dias – Brasil – 2013

Concentração do efluente do polimento (%) v/v	APC (%)
Controle negativo	19,33 a
12,5	18,05 b
25	19,86 a
37,5	19,14 a
50	17,49 b
75	19,27 a
100	18,86 a

As médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Controle negativo: água destilada, APC – área percentual do procâmbio.

O aumento da coifa caracteriza uma estratégia da planta-teste visando maior proteção, uma vez que reduziu o fluxo dos componentes químicos do efluente para o interior da raiz, minimizando seus efeitos tóxicos. Cai et al. (2011) verificaram que raízes de plântulas de soja podem produzir um espessamento das camadas de células da coifa e maior produção de mucilagem em resposta a toxidez por alumínio para reduzir a entrada deste elemento. Kozhevnikova, Seregin e Bystrova (2007) mostraram que metais como níquel e chumbo causaram aumento no comprimento das células da coifa em raízes de milho.

O aumento na proporção da área do centro quiescente em relação aos demais tecidos refletiu no decréscimo do IM mostrado nas avaliações citogenéticas, uma vez que, segundo Appezzato-da-Glória e Carmelo-Guerreiro (2009), o centro quiescente é uma região de baixa atividade mitótica.

Diante disso, notou-se que as condições de estresse testadas afetaram a estrutura da coifa e do centro quiescente evidenciado pelo aumento de suas áreas percentuais, mostrando uma resposta da raiz quando exposta ao efluente do polimento.

O decréscimo da área percentual dos tecidos meristemáticos protoderme e meristema fundamental está relacionado ao aumento da área percentual da coifa e do centro quiescente que passaram a ocupar maior parte da área da raiz. Esta redução da área percentual dos meristemas primários pode explicar os resultados obtidos nas análises citogenéticas que mostraram uma redução do índice mitótico (IM) proporcional ao aumento da concentração do efluente do polimento, nos meristemas radiculares de *A. cepa*. A zona meristemática radicular é uma região formada por tecidos cujas células se encontram em intensas divisões mitóticas (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2009), desta forma, é uma região que apresenta elevado IM. Considerando que a menor área percentual do tecido meristemático reflete menor quantidade de células em divisão, o decréscimo da área percentual do meristema fundamental e da protoderme explica o decréscimo do IM à medida que aumentou a concentração do efluente.

Alguns autores (PEIXOTO; PIMENTA; CAMBRAIA, 2007; KRAVETS et al., 2012) descreveram alterações morfoestruturais na zona meristemática em raízes de *Sorghum bicolor* L. mantidas sob condições de estresse por exposição ao alumínio e em raízes de *Pisum sativum* L. expostas à radiação. Dentre estas alterações, observou-se a redução dos meristemas, efeito semelhante ao induzido pelo efluente do polimento em raízes de *A. cepa*.

O aumento da área total da raiz observado neste estudo é justificado pelo aumento da área percentual da coifa e do centro quiescente (Figuras 6A e 6B).

Para o percentual de área do procâmbio também houve redução, embora esta redução não fosse observada em todas as concentrações testadas. Isto

poderia ser explicado pela localização mais interna deste tecido contribuindo para que os elementos tóxicos do efluente não o alcançassem. Portanto, os resultados mostraram que este tecido pode sofrer alterações e diminuir na presença do efluente do polimento, porém essa característica não se correlaciona claramente com o aumento da concentração do resíduo.

4.3.3 Anatomia qualitativa da raiz de *Allium cepa* exposta a diferentes concentrações do efluente do polimento.

As secções transversais e longitudinais da raiz de *A. cepa*, revelaram algumas alterações qualitativas após exposição ao efluente do polimento de rochas ornamentais (Figura 7).

A epiderme e a exoderme da raiz de *A. cepa* apresentaram alterações visíveis quando expostas à concentração 75% (v/v), como células com formato irregular, colapsadas ou amassadas (Figura 7C1). Além disso, notou-se que estes tecidos apresentaram necrose (Figuras 7B e 7B1), o que não foi detectado nas raízes do tratamento controle (Figura 7A e 7A1).

A raiz em estrutura primária de *A. cepa* pode ser tetraarca, pentarca ou hexarca, porém, é mais comum ser pentarca. Notou-se que o cilindro vascular apresentou certo grau de desorganização em seus tecidos. Isto se evidencia pelo arranjo totalmente atípico dos vasos condutores observado nas raízes expostas às concentrações 75% v/v e 100% (Figuras 7B2 e 7C2) quando comparado ao tratamento controle (Figura 7A2).

Alterações semelhantes às encontradas neste estudo, foram observadas por Turkmen et al. (2009) e Çavusoglu et al. (2011) em raízes de *A. cepa* e por Liu et al. (2007) e Bona et al. (2011) em raízes de *Oriva sativa* L. e de *Sebastiania commersoniana* L., quando submetidas a diferentes condições de estresses.

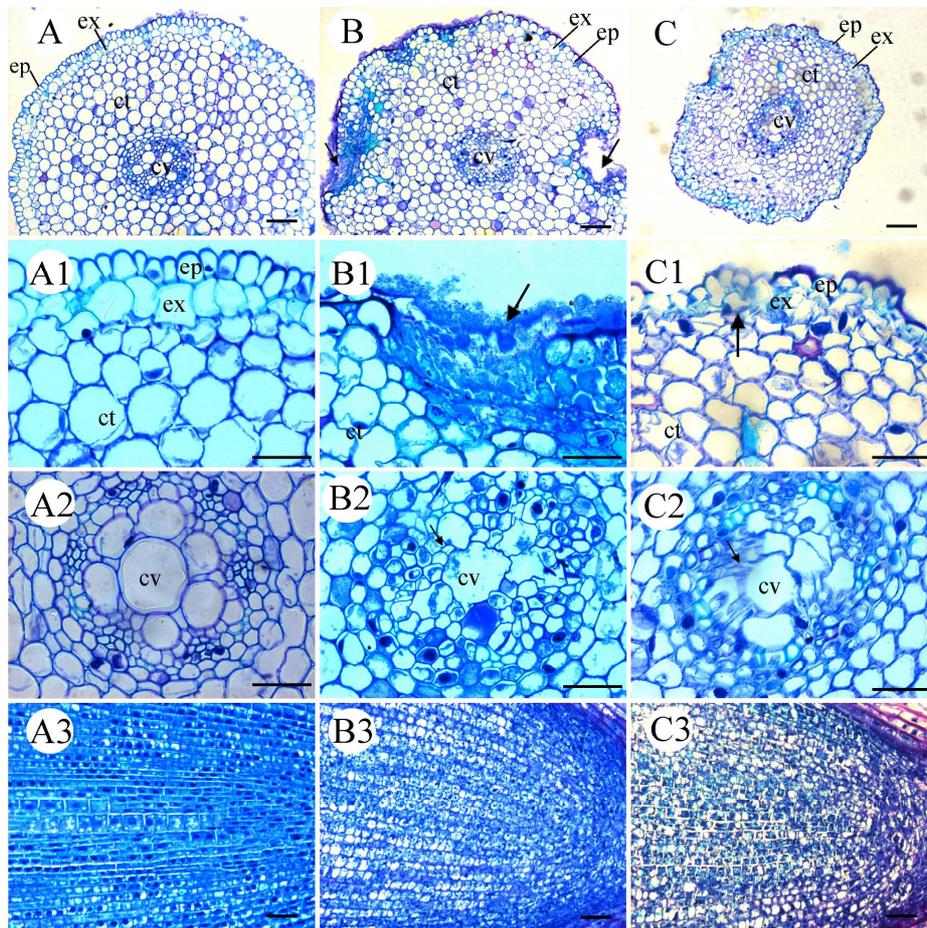


Figura 7 Características anatômicas radiculares de plantas de *A. cepa* expostas a crescentes concentrações do efluente do polimero por 20 dias. A – A3 água destilada; B – B3 75% (v/v) e C – C3 100%; ep - epiderme, ex - exoderme, ct - córtex e cv - cilindro vascular. Secções transversais evidenciando em B e B1 a necrose dos tecidos (seta), em B2 e C2 desorganização do sistema vascular (seta) e em C1 os tecidos, epiderme e exoderme, danificados (setas). Secções longitudinais em B3 e C3 evidenciando desarranjo nas fileiras de células meristemáticas e perda na delimitação da área de cada meristema. Barra 50 μ m

O aspecto irregular das células epidérmicas e exodérmicas sugere perda do turgor em decorrência do baixo potencial osmótico e da elevada salinidade do efluente do polimento. O baixo potencial osmótico também é responsável pela diminuição da disponibilidade de água a ser consumida pelas raízes. Segundo Vale et al. (2005), esta redução na disponibilidade de água é um fator limitante para o crescimento radicular, pois a deficiência hídrica afeta a divisão e o crescimento celular. Por outro lado, a necrose nestes tecidos de revestimento poderia estar associada à morte celular, efeito este também observado sobre as células meristemáticas quando expostas às maiores concentrações do efluente. Estes danos no sistema dérmico comprometeram a absorção de água e nutrientes prejudicando o crescimento e desenvolvimento das raízes nas maiores concentrações como mostrado na análise visual dos bulbos.

O movimento dos fotoassimilados para as áreas de crescimento e reserva em uma planta é chamado translocação e ocorre através do floema. Este tecido vascular também redistribui água e vários outros compostos pelo corpo da planta (TAIZ; ZEIGER, 2004). A baixa condução de fotoassimilados pelo floema como consequência da desorganização no cilindro vascular provocado pelo efluente levou a uma deficiência nutricional nos tecidos meristemáticos prejudicando a sua formação e organização (Figuras 7B3 e 7C3). Isto contribuiu para a queda no índice mitótico e, conseqüentemente, inibição do crescimento radicular.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O efluente do polimento é uma mistura complexa de vários elementos químicos, por isso, seu efeito tóxico não deve ser atribuído especificamente a um determinado elemento devido às possíveis interações que podem ocorrer entre eles para produzir o efeito final. Além disso, a análise reflete temporalidade, mostrando que sob determinadas condições do processo produtivo, a amostragem poderá apresentar variações em sua composição química e, conseqüentemente, em sua toxicidade.

O efluente do polimento promoveu alterações nas raízes de *A. cepa*, portanto, a anatomia vegetal mostrou-se uma importante ferramenta na avaliação dos efeitos tóxicos do resíduo estudado sobre o organismo-teste utilizado. Porém é fundamental a utilização destes dados em conjunto com análises fisiológicas e ultraestruturais para elucidar a fitotoxicidade causada por este resíduo.

Os bioensaios de toxicidade devem continuar a ser realizados em pesquisas futuras com o efluente estudado neste trabalho, utilizando outros organismos de diferentes níveis tróficos na realização dos testes, podendo, assim, obter melhores conclusões sobre o efeito tóxico do efluente.

6 CONCLUSÃO

O efluente proveniente do polimento de rochas ornamentais apresenta efeitos citotóxicos e genotóxicos por induzir alterações nos índices mitóticos, morte celular, alterações cromossômicas e nucleares nas células meristemáticas de *A. cepa*. Além disso, esse efluente provoca alterações anatômicas como: aumento na área da coifa e do centro quiescente e redução dos tecidos meristemáticos dos ápices radiculares deste organismo-teste.

REFERÊNCIAS

- ADAM, F. I. M; EL-ASHRY, Z. M. Evaluation of genotoxicity of 4-nonylphenol using *Vicia faba* L. **Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 4, p. 368-372, 2010.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F.; GEDRAIT, L. S.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. 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**, v. 74, p. 882–888, 2011.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPOS J. M. S.; DAVID L. C. Effects of Spent Pot Liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa*. **Journal of Environmental Management**, v. 107, p. 140-146, 2012.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F.; BOTELHO, C. M.; LAVIOLA, B. G.; PALMIER, M. J.; PRAÇA-FONTES, M. M. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 1, p. 373-382, 2014.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Ed. UFV, 2009. 438 p.
- ARAÚJO, A. S. F.; SAHYOUN, F. K.; MONTEIRO, R. T. R. Evaluation of toxicity of textile sludge compost on seed germination and root elongation of soybean and wheat. **Revista Ecosistema**, v. 26, p.117-119, 2001.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004**: Resíduos Sólidos : Classificação. Rio de Janeiro, 2004.
- AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Campina Grande: DEAg/ CCT/UFPB, 2. Ed, 1999. 153 p.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. **Suelos y Planta**, v. 2, p. 345-361, 1992.
- BARLOW, P. W.; RATHFELDER, E. L. Cell Division and Regeneration in Primary Root Meristems of *Zea mays* Recovering from Cold Treatment. **Environmental and Experimental Botany**, v. 25, p. 303-314, 1985.

BEHBOODI, B. S. H.; SAMADI, L. Detection of apoptotic bodies and oligonucleosomal DNA fragments in cadmium-treated root apical cells of *Allium cepa* L. **Plant Science**, v. 167, p. 411-416, 2004.

BERTOSSI, A. P. A.; NEVES, M. A.; DAMASCENO, C. A. (*in memorian*); CARDOSO, M. S. N.; PRADO, A. C. A.; POLIDORO, J. C. Influência da utilização do resíduo fino de beneficiamento de rochas ornamentais silicáticas na qualidade do solo e da água. **Geociências**, v. 31, n. 2, p. 185-195, 2012.

BEZRUKOV, V. F.; LAZARENKO, L. M. Environmental impact on age-related dynamics of karyotypical instability in plants. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 520, p.113-118, 2002.

BOITEUX, L. S.; MELO, P. C. T. Taxonomia e origem. In: EMBRAPA HORTALIÇAS. **Sistema de produção de cebola (*Allium cepa* L.)**. Embrapa-CNPq. Brasília, 2004. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/cebola/index.htm>>. Acesso em: 07 maio 2014.

BONA, C.; SILVA, M. Y. B.; REZENDE, I. M.; SANTOS, G. O.; SOUZA, L. A.; INCKOT, R. C. Efeito do solo contaminado com óleo diesel na estrutura da raiz e da folha de plântulas de *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) e *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, p. 277-285, 2011.

BRAGA, F. S.; BUZZI, D. C.; COUTO, M. C. L.; LANGE, L. C. Caracterização ambiental de lamas de beneficiamento de rochas ornamentais. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 15, n. 3, p. 237-244, 2010.

BRASIL. Conselho Nacional Do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Presidente do Conselho: Marina Silva. Brasília, 2005.

BRASIL. Conselho Nacional Do Meio Ambiente. **Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Presidente do Conselho: Izabella Teixeira. Brasília, 2011.

BUZZI, D. C. **Estudo de classificação e quantificação das lamas geradas no processo de beneficiamento de rochas ornamentais**. 2008. 365 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória ES, 2008.

CAI, M. Z.; WANG, F. M.; LI, R. F.; ZHANG, S. N.; WANG, N.; XU, G. D. Response and tolerance of root border cells to aluminum toxicity in soybean seedlings. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 7, p. 966–971, 2011.

CAMPOS, A. R.; CASTRO, N. F.; VIDAL, F. W. H.; BORLINI, M. C. Tratamento e aproveitamento de resíduos de rochas ornamentais e de revestimento, visando mitigação de impacto ambiental. In: XXIII SIMPÓSIO DE GEOLOGIA DO NORDESTE VII SIMPÓSIO DE ROCHAS ORNAMENTAIS DO NORDESTE, 2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 2009.

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

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: Ed. UFLA, 2009. 126p.

ÇAVUŞOĞLU, K.; YALÇIN, E.; TÜRKMEN, Z.; YAPAR, K.; ÇİÇEK, F. Investigation of Toxic Effects of the Glyphosate on *Allium cepa*.

Journal of Agricultural Sciences, v. 17, p. 131-142, 2011.

CHIODI FILHO, C. Breve análise das exportações brasileiras de rochas em 2012. **Abirochas – Associação Brasileira da Indústria de Rochas Ornamentais**, São Paulo, Informe 04/2013, 2013.

CLESCERI, L. S.; EATON, A. D.; GREENBERG, A. E.; RICE, E. W. **Standard methods for the examination of water and wastewater: Centennial edition**. Washington DC: Ed. American Public Health Association, 2005. 1600p.

DEGENHARDT, B.; GIMMLER, H. Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 595-603, 2000.

DÜSMAN, E.; LUZZA, M.; SAVEGNAGO, L.; LAUXEN, D.; VICENTINI, V. E. P.; TONIAL, I. B.; SAUER, T. P. *Allium cepa* L. as a bioindicator to measure cytotoxicity of surface water of the Quatorze River, located in Francisco Beltrão, Paraná, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p. 1793-1800, 2014.

EL-GHAMERY, A. A.; EL-KHOLY, M. A.; EL-YOUSER, M. A. A. Evaluation of cytological effects of Zn in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. **Mutation Research**, v. 537, p. 29-41, 2003.

EL HAMIANI, O.; EL KHALIL, H.; LOUNATE, K.; SIRGUEY, C.; HAFIDI, M.; BITTON, G.; SCHWART, C.; BOULARBA, A. Toxicity assessment of garden soils in the vicinity of mining areas in Southern Morocco. **Journal of hazardous materials**, v. 177, p. 755 -761, 2010.

EL KHALIL, H.; EL HAMIANI, O.; BITTON, G.; OUAZZANI, N.; BOULARBAH, A. Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: Monitoring metal content and toxicity of soil runoff and groundwater. **Environmental monitoring and assessment**, v. 136, p.147 -160, 2008.

EZAKI, B.; NAGAO, E.; YAMAMOTO, Y.; NAKASHIMA, S.; ENOMOTO, T. Wild plants, *Andropogon virginicus* L. and *Miscanthus sinensis* Anders, are tolerant to multiple stresses including aluminum, heavy metals and oxidative stresses. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 951-961, 2008.

FABRI, E. S.; JÚNIOR, H. A. N.; LEITE, M. G. P. Exploração de rochas ornamentais e meio ambiente. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 26, p.189-197, 2012.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.

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

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 88, p. 1680–1686, 2009.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

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

FRITSCH, R. M.; FRIESEN, N. Evolution, Domestication and Taxonomy. In: RABINOWITCH, H. D.; CURRAH, L. (Ed.). **Allium Crop Science: Recent Advances**. CAB International Wallingford, Reino Unido, p. 5-30, 2002.

GICHNER, T.; MUKHERJEEB, A.; WAGNER, E. D.; MICHAEL J. P. Evaluation of the nuclear DNA Diffusion Assay to detect apoptosis and necrosis. **Mutation Research**, v. 586, p. 38-46, 2005.

GOMES, M. P.; MARQUES, T. C. L. L. S. M.; NOGUEIRA, M. O. G.; SILVA, G. H.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M. Efeitos dos rejeitos da indústria de zinco na anatomia e crescimento de plantas de *Salix humboldtiana* Willd. (salgueiro). **Hoehnea**, v. 38, p. 135-142, 2011.

GONZALEZ-FERNANDEZ, O.; BATISTA M. J.; ABREU, M. M.; QUERALTA, I.; CARVALHO, M. L. Elemental characterization of edible plants and soils in an abandoned mining region: assessment of environmental risk. **X-ray spectrometry**, v. 40, p. 53 -363, 2011.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the United States Environmental Protection Agency Gene Toxicity Program. **Mutation Research**, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982.

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

GUERRA, M. S.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto SP. Ed. FUNPEC, p. 17-38, 2002.

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

HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. **Mutation Research**, v. 277, p. 91-138, 1992.

INSTITUTO ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS-IEMA. **Instrução Normativa n.º 019 de 17 de agosto de 2005**. Dispõe sobre a definição dos procedimentos de licenciamento das atividades de beneficiamento de rochas ornamentais. Cariacica, 2005.

JIANG, K.; FELDMAN, L. J. Root Meristem Establishment and Maintenance: The Role of Auxin. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 432–440, 2003.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2nd ed. New York: Mc-Graw-Hill, 1940. 523 p.

KAIUOMOVA, D.; SÜSAL, C.; OPELZ, G. Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Human Immunology**, v. 62, p. 64-74, 2001.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; BOECK, M.; DECORDIER, L. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v. 504, p. 137-148, 2002.

KOZHEVNIKOVA, A. D.; SEREGIN, I. V.; BYSTROVA, E. I. Effects of Heavy Metals and Strontium on Division of Root Cap Cells and Meristem Structural Organization. **Russian journal plant physiology**, v. 54, p. 257–266, 2007.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. UFRJ, 1997. 198 p.

KRAVETS, E. A.; BEREZHNYAYA, V. V.; SAKADA, V. I.; RASHIDOV, N. M.; GRODZINSKY, D. M. Structural Architectonics of the Root Apical Meristem in Connection with a Quantitative Evaluation of Its Radiation Damage. **Cytology and Genetics**, v. 46, n. 2, p. 63-73, 2012.

KÚRAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; GULEWICZ, K. 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. **Chemosphere**, v. 107, p. 211-221, 2006.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária, 2000.

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**, New York, v. 88, p. 214-219, 2008.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutation Research**, v. 650, p. 80–86, 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, 2009.

LEVAN, A. The effect of colchicines in root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, p. 471-486, 1938.

LIU, S. H.; FU, B. Y. ; XU, H. X.; ZHU, L. H.; ZHAI, H. Q.; LI, Z. K. Cell death in response to osmotic and salt stresses in two rice (*Oryza sativa* L.) ecotypes. **Plant Science**, v. 172, p. 897-902, 2007.

LUZ, L. M. N. B. B. **Análise crítica ao modelo de desenvolvimento do sector das pedras naturais: o caso dos mármore no triângulo de estremoz - borba - vila viçosa 1980-2003**. 2005. Dissertação (Mestrado em Economia e Estudos Europeus) - Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Economia e Gestão, Lisboa, Junho de 2005.

MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; McCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185-195, 1995.

MAGACHO, I.; SILVA, R. B. **Indicadores de geração de resíduos do processo de beneficiamento de rochas ornamentais**: Estudo de caso em empresas de Nova Venécia/ES – Janeiro à Junho de 2006. 150 p. Monografia (Especialização em Gestão Ambiental) – Departamento de Engenharia Ambiental – DEA Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória ES, 2006.

MAIA, C. E.; RODRIGUES, K. K. R. P.; LACERDA, V. S. Relação entre bicarbonato e cloreto em águas para fins de irrigação. **Irriga**, Botucatu, Edição Especial, p. 206 - 219, 2012.

MASOOD, F.; MALIK, A. Mutagenicity and genotoxicity assessment of industrial wastewaters. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, p. 7386-7397, 2013.

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluents using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**, v. 69, n. 4, p. 399-408, 2004.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN- MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MCCLINTOCK, B. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. **Genetics**, v. 26, p. 234–282, 1941.

MELO, W. J.; MARQUES, M. O.; MELO, V. P. O uso agrícola do biossólido e as propriedades do solo. **Biossólidos na agricultura**. 2. ed. São Paulo ABES, p. 289-359, 2002.

MURNANE, J. P. Telomeres and chromosome instability. **DNA Repair**, v. 5, p.1082–1092, 2006.

NATARAJAN, A. T. Chromosome Aberrations: past, present and future, **Mutation Research**, v. 504, p. 3-16, 2002.

ODEGAH, P. G.; IJIMAKINWA, J.; LAWAL, B.; OYENIYI, R. Genotoxicity screening of leachates from solid industrial waste evaluated *Allium* test, **Atla**, v. 25, p. 311-321, 1997.

OLORUNFEMI, D. I.; OGIESERI, U. M.; AKINBORO, A. Genotoxicity Screening of Industrial Effluents using Onion bulbs (*Allium cepa* L.). **Journal of Applied Sciences end Environmental Management**, v. 15, p. 211-216, 2011.

PALMIERI, M. J.; LUBERB, J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DAVIDE, L. C. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research**, v. 763, p. 30–35, 2014.

PEITER, C. C. Rochas ornamentais no século XXI: bases para uma política de desenvolvimento sustentado das exportações brasileiras. **Relatório técnico sobre o diagnóstico do setor de rochas ornamentais do Brasil**, CETEM, 2001.

PEIXOTO, P. H. P.; PIMENTA, D. S.; CAMBRAIA, J. Alterações morfológicas e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alumínio. **Bragantia**, v. 66, n. 1, p. 17-25, 2007.

PEREIRA, F. J.; POLO, M. Growth and ion accumulation in seedlings of *Handroanthus serratifolius* (VAHL.) cultivated in saline solution. **Scientia Florestalis**, v. 39, n. 92, p. 441-446, 2011.

PEREIRA, M. P.; PEREIRA, F. J.; RODRIGUES, L. C. A.; BARBOSA, S.; CASTRO, E. M. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 7, n. 1, p. 36-43, 2013.

RADIĆ, S.; STIPANIČEV, D.; VUJČIĆ, V.; RAJČIĆ, M. M.; PEVALEK-KOZLIN, S. Š. B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. **Science of The Total Environment**, v. 408, p. 1228-1233, 2010.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 18, p. 49-53, 1993.

REAPE, T. J.; MCCABE, P. F. Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. **Apoptosis**, v. 15, p. 249–256, 2010.

RIBEIRO L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Eds.), **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. cap. 7, p. 201–219.

RIBEIRO, M. R.; FREIRE, F. J.; MONTENEGRO, A. A. A. Solos halomórficos do Brasil: Ocorrência, gênese, classificação, uso e manejo sustentável. In: CURTI, N.; MARQUES, J. J.; GUILHERME, L. R. G.; LIMA, J. M.; LOPES, A. S.;

ALVAREZ, V. H. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2003. v. 3, 430p.

RODRIGUES, G. D.; SILVA, L. H. M.; SILVA, M. C. H. Alternativas verdes para o preparo de amostra e determinação de poluentes fenólicos em água. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1370-1378, 2010.

RUSSEL, P. J. Chromosomal mutation. In: CUMMINGS, B. (Ed.), **Genetics**, Pearson Education Inc., San Francisco, p. 595–621, 2002.

SAMUEL, O. B.; OSUALA, F.; ODEIGAH, P. G. C. Cytogenotoxicity evaluation of two industrial effluents using *Allium cepa* assay. **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 4, p. 21-27, 2010.

SAURABH CHANDRA, L. K. S.; GUPTA, S.K. Genotoxicity of leachates of tannery solid waste in root meristem cells of *Allium cepa*. **Journal of Ecophysiology and Occupational Health**, v. 2, p. 225-234, 2002.

SAURABH CHANDRA, L. K. S.; CHAUHANA, R. C.; MURTHYB, P. N.; SAXENA, P.N.; PANDEC, S. K.; GUPTA, T. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **Science of the Total Environment**, v. 347, p. 46-52, 2005.

SHANNON, M. C.; GRIEVE, C. M. Tolerance of vegetable crops to salinity. **Scientia Horticultura**, v. 78, p. 5–38, 1999.

SOIKKELIS, S. Comparison of cytological injuries in conifer needles industrial environments in Finland. **Annales Botanici Fennici**, v. 18, p. 47-61, 1981.

SUDHAKAR, R.; NINGE GOWDA, K. N.; VENU, G. Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa*. **Cytologia**, v. 66, p. 235–239, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TORRES, P. M. C. **Reciclagem de Lamas de Granito Ornamental em Pastas Cerâmicas**. 2007. 173 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro - Universidade de Aveiro, Portugal, 2007.

TURKMEN, Z.; ÇAVUŞOĞLU, K.; YAPAR, K.; YALÇIN, E. Protective role of Royal Jelly (honeybee) on genotoxicity and lipid peroxidation, induced by petroleum wastewater, in *Allium cepa* L. root tips. **Environmental Technology**, v. 30, p. 1205-1214, 2009.

TURKOGLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v. 626, p. 4–14, 2007.

VALE, L. S.; MIRANDA, M. F. A.; JUNIOR, R. R. N.; SILVA, M. I. L.; BELTRÃO, N. E. M.; CARDOSO, G. D.; FILHO, C. J. A. Efeito da salinidade na cultura do algodoeiro herbáceo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, n. 5, 2005, Campina Grande. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/211.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2014.

VENTURA, B. C.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 42-51, 2008.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPES, D. Cytogenetic damage in Shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “High-density brines”. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, New York, v. 43, p. 284-291, 2002.

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**, v. 52, p. 369-376, 1990.

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

WANG, H.; LI, J.; BOSTOCK, R. M.; GILCHRIST, D. G. Apoptosis: phytotoxin and invoked during development. **Plant Cell**, v. 8, p. 375–39, 1996.

WÓJCIK, M.; VANGRONSVELD, J.; D’HAEN, J.; TUKIENDORF, A. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 163-171. 2005.

YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutation Research**, v. 537, p. 109-114, 2003.

ZHOU, Q. A.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 2, p. 135-15, 2008.