



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

**FRANCIELEN BARROSO ARAGÃO**

**AVALIAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL DE RESÍDUOS GERADOS  
PELA SUINOCULTURA EM MODELOS VEGETAIS.**

VITÓRIA – ES

2021

FRANCIELEN BARROSO ARAGÃO

**AVALIAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL DE RESÍDUOS GERADOS  
PELA SUINOCULTURA EM MODELOS VEGETAIS.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Tamie Matsumoto

VITÓRIA - ES

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

A659a Aragão, Francielen Barroso, 1992-  
Avaliação do risco ambiental de resíduos gerados pela  
suinocultura em modelos vegetais. / Francielen Barroso Aragão.  
2021.  
125 f. : il.

Orientadora: Silvia Tamie Matsumoto.  
Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e  
Naturais.

1. Lagoa de estabilização. 2. Ciclo Celular. 3. cebola. 4.  
milho. I. Matsumoto, Silvia Tamie. II. Universidade Federal do  
Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. III.  
Título.

CDU: 57

---

FRANCIELEN BARROSO ARAGÃO

**Avaliação do risco ambiental de resíduos gerados pela  
suinocultura em modelos vegetais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Biologia Vegetal.

Aprovada em 1º de dezembro de 2021.

Comissão Examinadora:

**Profa. Dra. Silvia Tamie Matsumoto (UFES)**  
Orientadora e Presidente da Comissão

**Profa. Dra. Diolina Moura Silva (UFES)**  
Examinadora Interna

**Prof. Dr. Elias Terra Werner (UFES)**  
Examinador Interno

**Prof. Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol (Coordenador do PPGBV)**

**Por: Profa. Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira (UFLA)**  
Examinadora Externa

**Por: Prof. Dr. Ian Drumond Duarte (SEDU/ES)**  
Examinador Externo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
SILVIA TAMIE MATSUMOTO - SIAPE 3173298  
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN  
Em 09/12/2021 às 09:11

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/327597?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
ELIAS TERRA WERNER - SIAPE 2864694  
Departamento de Biologia - DB/CCENS  
Em 09/12/2021 às 22:09

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/328698?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
DIOLINA MOURA SILVA - SIAPE 294671  
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN  
Em 10/12/2021 às 10:05

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/328899?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
GERALDO ROGERIO FAUSTINI CUZZUOL - SIAPE 1173398  
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN  
Em 13/12/2021 às 10:57

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/330421?tipoArquivo=O>

*Os sonhos existem para tornarem-se realidade.*

*(Walt Disney)*

*As minhas filhas, Lis e Lara, por serem luz em minha vida.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sua infinita graça, abençoando-me com saúde e sabedoria, proporcionando o desenvolvimento desta pesquisa.

A Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de realizar este trabalho e possibilitar a conclusão desta pós-graduação.

Ao Programa de Biologia Vegetal, pela concessão ao uso dos laboratórios, equipamentos e materiais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Em especial, a minha querida orientadora e amiga Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sílvia Tamie Matsumoto pela paciência, carinho e ensinamentos recebidos na trajetória dessa etapa de minha vida.

Aos companheiros do GEMUT e da Botânica por terem tornado esta caminhada alegre e descontraída; em especial a Iasmini, Monick, Kalia, Enzo, Edvar, Kristian, Ian, Lívia, Dayana e Leonardo.

A minha amada filha Lis, por ressignificar minha vida tornando meus dias mais leves, me ensinando o verdadeiro amor. E a minha filha Lara, que ainda no ventre me acalma e acalenta meu coração com a sua espera.

Ao meu esposo Wesley pelo amor e apoio em todos os momentos bons e difíceis ao longo dessa caminhada, por sonhar junto esse sonho.

*In memoriam* a minha querida avó Maria Del Carmen, por todo amor e ensinamentos sobre a vida.

Aos meus pais, João e Maria, pela minha educação e apoio.

Ao meu sobrinho Iago pelas alegrias que trazes a minha vida, as minhas irmãs queridas, Ana Paula e Fernanda, pelo apoio emocional e companheirismo.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

## RESUMO

O manejo inadequado dos resíduos da produção de suínos pode ocasionar a contaminação de cursos d'água, solo e ar, representando risco ao meio ambiente. O objetivo do trabalho foi avaliar o risco ambiental do resíduo bruto e do efluente da lagoa de estabilização de biodigestor da suinocultura, avaliar a reutilização do efluente da lagoa de estabilização como biofertilizante e a qualidade das amostras de água do rio Santa Maria do Doce, no entorno da granja de suínos. Os efluentes do biodigestor de suinocultura (resíduo bruto e da lagoa de estabilização) e amostras de água do rio foram coletados no município de Santa Tereza-ES, Brasil. A partir dessas amostras foram realizadas a caracterização química e os ensaios em laboratório. Realizou-se diluições a partir dos efluentes puros (C1), e foram feitas sucessivas reduções na quantidade de efluente, 50% (C2), 25% (C3), 12,5% (C4), 6,25% (C5), 3,12% (C6), 0,78% (C7) e 0,39% (C8). As amostras do rio foram coletadas em duas campanhas (maior e menor precipitação), em 3 estações amostrais: a montante da granja de suínos (EA1), próxima à granja de suínos (EA2) e a jusante da granja de suínos (EA3). Sementes de *Lactuca sativa* e *Allium cepa* foram germinadas nos tratamentos, e os seguintes parâmetros foram avaliados: germinação, crescimento radicular, avaliação do potencial toxicogenético e análises da atividade das enzimas SOD, CAT, GST e quantificação da GSH e LPO. Diluições da lagoa de estabilização foram utilizadas para avaliar o efluente como biofertilizante em plantas de milho, por meio de análises de trocas gasosas e de crescimento. Para essa avaliação foram utilizados dois controles: um tratamento contendo apenas água e um tratamento com fertilizante comercial. Todos dados foram submetidos à ANOVA, seguida de teste de média Kruskal Wallis ou Tukey ( $p < 0.05$ ). Os resultados demonstram que os dois efluentes inibiram a germinação de *L. sativa* e *A. cepa*, além de reduzirem o crescimento radicular, e promoverem maiores frequências de alterações cromossômicas nas demais concentrações. Os danos observados possivelmente estão relacionados com os metais pesados encontrados nas amostras estudadas. As amostras do rio apresentaram uma redução no índice mitótico em EA2 e EA3 (segunda campanha) em *A. cepa* em relação ao controle negativo. E em ambos modelos, ocorreram um aumento de alterações cromossômicas (EA2 e EA3). Os danos observados possivelmente estão relacionados com o excesso de alumínio encontrado nas amostras, a atividade humana no entorno do rio, o despejo de efluentes da suinocultura e esgoto doméstico. As plantas de milho submetidas aos tratamentos com os efluentes, quando comparadas com o controle água, apresentaram um aumento significativo na biomassa, porém as maiores concentrações do efluente impediram a germinação das sementes. Possivelmente o excesso de K e Na pode ter causado estresse hídrico nas sementes, impedindo a germinação e desenvolvimento das plantas, nas quais a diluição do efluente reduziu os efeitos do excesso de K e Na e, conseqüentemente, reduziu a disponibilidade de outros nutrientes essenciais para as plantas de milho.

**Palavras-chave:** Lagoa de Estabilização • *Allium cepa* • *Lactuca sativa* • *Zea Mays* • ciclo celular

## ABSTRACT

The inadequate management of residues from swine production can cause contamination of water courses, soil and air, representing a risk to the environment. The objective of this work was to evaluate the environmental risk of the raw residue and effluent from the stabilization pond of swine biodigester, to evaluate the reuse of the effluent from the stabilization pond as a biofertilizer and the quality of water samples from the Santa Maria do Doce River, in the around the pig farm. The effluents from the swine biodigester (raw and stabilization pond waste) and river water samples were collected in the municipality of Santa Tereza-ES, Brazil. From these samples, chemical characterization and laboratory tests were carried out. Dilutions were carried out from the pure effluents (C1), and successive reductions were made in the amount of effluent, 50% (C2), 25% (C3), 12.5% (C4), 6.25% (C5), 3.12% (C6), 0.78% (C7) and 0.39% (C8). The river samples were collected in two campaigns (highest and lowest rainfall), in 3 sampling stations: upstream from the swine farm (EA1), close to the swine farm (EA2) and downstream from the swine farm (EA3). Seeds of *Lactuca sativa* and *Allium cepa* were germinated in the treatments, and the following parameters were evaluated: germination, root growth, evaluation of toxicogenetic potential and analyzes of the activity of enzymes SOD, CAT, GST and quantification of GSH and LPO. Dilutions from the stabilization pond were used to evaluate the effluent as a biofertilizer in corn plants, through gas exchange and growth analyses. For this evaluation, two controls were used: a treatment containing only water and a treatment with commercial fertilizer. All data were submitted to ANOVA, followed by the Kruskal Wallis or Tukey mean test ( $p < 0.05$ ). The results demonstrate that the two effluents inhibited the germination of *L. sativa* and *A. cepa*, in addition to reducing root growth, and promoting higher frequencies of chromosomal alterations in the other concentrations. The observed damages are possibly related to the heavy metals found in the studied samples. The river samples showed a reduction in the mitotic index in EA2 and EA3 (second campaign) in *A. cepa* compared to the negative control. And in both models, there was an increase in chromosomal alterations (EA2 and EA3). The damages observed are possibly related to the excess of aluminum found in the samples, human activity in the surroundings of the river, the dumping of effluents from pig farming and domestic sewage. The maize plants submitted to treatments with effluents, when compared to the water control, showed a significant increase in biomass, but higher effluent concentrations prevented seed germination. Possibly the excess of K and Na may have caused water stress in the seeds, preventing germination and development of plants, in which the dilution of the effluent reduced the effects of excess K and Na and, consequently, reduced the availability of other essential nutrients for the corn plants.

**Keywords:** Stabilization pond • *Allium cepa* • *Lactuca sativa* • *Zea Mays* • cell cycle

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Biodigestor Modelo Fluxo Tubular – Fluxo pistão (Plug Flow) – modelo Canadense. (A) Detalhe do Corte A-A do biodigestor; (B) Imagem externa de um biodigestor (C) Caminho que os dejetos percorrem no biodigestor.....24

Figura 2: Fases do ciclo celular e aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostos aos agentes químicos. (A) Metáfase normal; (A1) Metáfase com quebra cromossômica; (A2) C-metáfase; (A3) Metáfase com perda cromossômica; (A4) Célula binucleada em metáfase; (A5) Metáfase com aderência cromossômica; (B) Anáfase normal; (B1) Anáfase com ponte cromossômica; (B2) Anáfase com quebra cromossômica; (B3) Anáfase com perda cromossômica e ponte; (B4) Anáfase com perda cromossômica; (B5) Anáfase multipolar; (C) Telófase normal; (C1) Telófase com ponte cromossômica; (C2) Telófase com a perda cromossômica e ponte; (C3) Telófase com quebra cromossômica; (C4) Telófase multipolar; (C5) Telófase Multipolar com ponte cromossômica.....28

### **CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DO RISCO TÓXICO DE EFLUENTES PROVENIENTES DE BIODIGESTOR DE SUINOCULTURA, NOS MODELOS VEGETAIS *Lactuca sativa* L. e *Allium cepa* L.**

Figura 1: Germinação e crescimento radicular de *L. sativa* e *A. cepa* em diferentes diluições das amostras do biodigestor de suinocultura.....57

Figura 2: Frequência das alterações cromossômicas observadas em células de *L. sativa* e *A. cepa* expostas a diferentes diluições do resíduo bruto, em relação ao total de células em divisão analisadas.....61

### **CAPÍTULO 2 – EFEITO DO EFLUENTE DA LAGOA DE ESTABILIZAÇÃO DE BIODIGESTOR DE SUINOCULTURA COMO BIOFERTILIZANTE, NO CRESCIMENTO E TROCAS GASOSAS DE PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* L.)**

Figura 1: Altura das plantas e massa seca total (MST) de plantas de milho, expostas a tratamentos com diluições do efluente da lagoa de estabilização, provenientes do biodigestor de suinocultura. As médias seguidas com a mesma letra nas colunas

não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste de Tukey. CA: controle água; CF: controle fertilizante.....87

Figura 2: Área Foliar e Razão área foliar (RAF) de plantas de milho, expostas a tratamentos com diluições do efluente da lagoa de estabilização de biodigestor de suinocultura. As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste de Tukey. CA: controle água; CF: controle fertilizante.....87

Figura 3: Massa seca parte aérea (MSPA) e Massa seca raiz (MSR) de plantas de milho, expostas a tratamentos com diluições do efluente da lagoa de estabilização, provenientes do biodigestor de suinocultura. As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste de Tukey. CA: controle água; CF: controle fertilizante.....88

Figura 4: Razão parte área (RPA) e razão massa radicular (RMR) de plantas de milho, expostas a tratamentos com diluições do efluente da lagoa de estabilização, provenientes do biodigestor de suinocultura. As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste de Tukey. CA: controle água; CF: controle fertilizante.....88

### **CAPÍTULO 3 – SUSCETÍVEL INFLUÊNCIA DA SUINOCULTURA NA QUALIDADE DA ÁGUA DO RIO SANTA MARIA DO DOCE-ES**

Figura 1: Localização e georreferências das estações amostrais no Rio Santa Maria do Doce.....99

Figura 2: Germinação e crescimento radicular de *L. sativa* e *A. cepa*, após exposição às amostras de água do Rio Santa Maria do Doce.....108

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DO RISCO TÓXICO DE EFLUENTES PROVENIENTES DE BIODIGESTOR DE SUINOCULTURA, NOS MODELOS VEGETAIS *Lactuca sativa* L. e *Allium cepa* L.**

Tabela 1: Caracterização química dos efluentes bruto e da lagoa de estabilização, provenientes do biodigestor de suinocultura.....54

Tabela 2: Alterações no ciclo celular em células meristemáticas de *L. sativa* exposta a diferentes diluições do resíduo bruto e lagoa de estabilização.....59

Tabela 3: Alterações no ciclo celular em células meristemáticas de *A. cepa* exposta a diferentes diluições do efluente bruto e lagoa de estabilização.....60

Tabela 4: Análise de biomarcadores bioquímicos em raízes de *L. sativa* e *A. cepa* expostas a diferentes diluições do efluente bruto e lagoa de estabilização.....64

### **CAPÍTULO 2 – EFEITO DO EFLUENTE DA LAGOA DE ESTABILIZAÇÃO DE BIODIGESTOR DE SUINOCULTURA COMO BIOFERTILIZANTE, NO CRESCIMENTO E TROCAS GASOSAS DE PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* L.)**

Tabela 1: Caracterização química do efluente da lagoa de estabilização, provenientes do biodigestor de suinocultura, e do solo antes de receber os tratamentos.....81

Tabela 2: Assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A, μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), condutância estomática (g<sub>s</sub>, mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), concentração intracelular de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>, μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>), transpiração (E, mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), razão entre concentrações de CO<sub>2</sub> intra e extracelular (C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>), eficiência de carboxilação (A/C<sub>i</sub>, μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> .s<sup>-1</sup> .Pa<sup>-1</sup>) de plantas de milho expostas às diluições do efluente do biodigestor de suinocultura.....84

### **CAPÍTULO 3 – SUSCETÍVEL INFLUÊNCIA DA SUINOCULTURA NA QUALIDADE DA ÁGUA DO RIO SANTA MARIA DO DOCE-ES**

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos das amostras de água do rio Santa Maria do Doce.....104

Tabela 2: Metais quantificados em amostras de água do rio Santa Maria do Doce.....106

Tabela 3: Alterações no ciclo celular em células meristemáticas de *L. sativa* e *A. cepa* exposta a amostras do rio Santa Maria do Doce.....109

Tabela 4: Análise de biomarcadores bioquímicos em raízes de *L. sativa* e *A. cepa* expostas a amostras do rio Santa Maria do Doce.....113

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	18
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	20
<b>3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	20
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
4.1 <i>Suinocultura</i> .....	21
4.1.1 <i>Economia e produção de resíduos</i> .....	21
4.1.2 <i>Biodigestores</i> .....	22
4.2 <i>Rio Santa Maria do Doce e Parâmetros Abióticos</i> .....	25
4.3 <i>Modelos Vegetais</i> .....	27
4.3.1 <i>Lactuca sativa e Allium cepa: Toxicogenética e Biomarcadores Bioquímicos</i> .....	27
4.3.2 <i>Zea Mays: Análise de Crescimento e Trocas gasosas</i> .....	31
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	34
<b>CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DO RISCO TÓXICO DE EFLUENTES PROVENIENTES DE BIODIGESTOR DE SUINOCULTURA, NOS MODELOS VEGETAIS <i>Lactuca sativa</i> L. E <i>Allium cepa</i> L.</b> .....	43
<b>RESUMO</b> .....	44
<b>ABSTRACT</b> .....	45
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	46
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	47
2.1 <i>Coleta e processamento dos Efluentes</i> .....	47
2.2 <i>Caracterização Química</i> .....	48
2.3 <i>Crescimento e germinação</i> .....	48
2.4 <i>Análises do ciclo celular</i> .....	49
2.5 <i>Análises de Biomarcadores Bioquímicos</i> .....	49
2.5.1 <i>Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)</i> .....	50
2.5.2 <i>Atividade da enzima Catalase (CAT)</i> .....	50
2.5.3 <i>Atividade da Glutathione s-transferase (GST)</i> .....	51
2.5.4 <i>Quantificação da Glutathione Reduzida (GSH)</i> .....	51
2.5.5 <i>Taxa de Peroxidação de Lipídios (LPO)</i> .....	52
2.6 <i>Análises estatística</i> .....	52
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	52
3.1 <i>Caracterização Química</i> .....	52

3.2 <i>Crescimento e germinação</i> .....	54
3.3 <i>Análises do Ciclo celular</i> .....	56
3.4 <i>Análises de Biomarcadores Bioquímicos</i> .....	62
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	65
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	66
<b>CAPÍTULO 2 – EFEITO DO EFLUENTE DA LAGOA DE ESTABILIZAÇÃO DE BIODIGESTOR DE SUINOCULTURA COMO BIOFERTILIZANTE, NO CRESCIMENTO E TROCAS GASOSAS DE PLANTAS DE MILHO (<i>Zea mays</i> L.)</b> .....	73
<b>RESUMO</b> .....	74
<b>ABSTRACT</b> .....	75
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	76
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	78
2.1 <i>Área de estudo e instalação do experimento</i> .....	78
2.2 <i>Análises químicas</i> .....	78
2.3 <i>Trocas gasosas</i> .....	79
2.4 <i>Análises de crescimento de <i>Zea mays</i></i> .....	79
2.5 <i>Análises estatísticas</i> .....	80
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	80
3.1 <i>Análises químicas</i> .....	80
3.2 <i>Trocas gasosas</i> .....	82
3.3 <i>Análises de crescimento de <i>Zea mays</i></i> .....	85
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	89
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	90
<b>CAPÍTULO 3 – SUSCETÍVEL INFLUÊNCIA DA SUINOCULTURA NA QUALIDADE DA ÁGUA DO RIO SANTA MARIA DO DOCE-ES</b> .....	94
<b>RESUMO</b> .....	95
<b>ABSTRACT</b> .....	96
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	97
<b>2. MATERIAIS E METÓDOS</b> .....	98
2.1 <i>Área de estudo, amostragem e análise abiótica</i> .....	98
2.2 <i>Caracterização química</i> .....	99
2.3 <i>Germinação e crescimento</i> .....	100
2.4 <i>Análises do ciclo celular</i> .....	100

2.5 Análises de Biomarcadores Bioquímicos.....	101
2.5.1 Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) .....	101
2.5.2 Atividade da enzima Catalase (CAT).....	101
2.5.3 Atividade da Glutathione s-transferase (GST).....	102
2.5.4 Quantificação da Glutathione Reduzida (GSH) .....	102
2.5.5 Taxa de Peroxidação de Lipídios (LPO).....	103
2.6 Análises estatística .....	103
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>103</b>
3.1 Caracterização abiótica .....	103
3.2 Análise da germinação, crescimento e ciclo celular.....	106
3.3 Análise de Biomarcadores Bioquímicos.....	110
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>114</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>115</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>121</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A crescente necessidade de uma maior produção de alimento gera o aumento de resíduos produzidos pela agroindústria. A suinocultura pode ser considerada uma atividade agropecuária problemática quando considerada a questão de produção de resíduos. Essa atividade é reconhecida como grande potencial poluidor, devido ao efluente final gerado em forma líquida, com elevada carga de matéria orgânica, nutrientes e metais pesados, principalmente Cu e Zn (STEINMETZ *et al.*, 2009) provenientes de fezes, urina, restos de ração e água dos bebedouros e usada na limpeza das granjas (KUNZ *et al.*, 2009; VIANCELLI *et al.*, 2012).

A digestão anaeróbica é considerada uma forma de destinar os resíduos e produzir energia, realizando a decomposição da matéria orgânica complexa em substâncias solúveis e produzindo metano e CO<sub>2</sub>, reduzindo a emissão de resíduos (WAINAINA *et al.*, 2019). Apesar dos resíduos passarem pelo processo de digestão anaeróbica, um volume final elevado ainda é produzido. Uma maneira eficaz de realizar o reaproveitamento desse efluente se dá pelo seu uso na fertirrigação de lavouras, uma forma de aproveitar os nutrientes presentes nesse resíduo, resultando na redução do custo com fertilizantes convencionais (FACTOR *et al.*, 2008; FREITAS *et al.*, 2015; MENEGHELLI *et al.*, 2016). Destaca-se o uso de biofertilizantes em culturas como feijão, soja e milho (QUEIROZ *et al.*, 2004), o que contribui para o desenvolvimento das raízes (SOUSA *et al.*, 2014), melhorando a absorção de água e nutrientes pela planta (APARECIDO *et al.*, 2017). Como resultado, observa-se um bom desenvolvimento vegetativo, proporcionando uma maior produção da planta (APARECIDO *et al.*, 2015).

Apesar de todas as vantagens do uso como biofertilizante, deve se levar em consideração os problemas que os efluentes de suinocultura podem ocasionar quando descartados de forma errônea. Este efluente possui uma grande quantidade de contaminantes orgânicos, minerais e hormônios. O despejo do efluente diretamente em corpos d'água e sem um tratamento adequado, pode prejudicar o meio ambiente, ocasionando a degradação da qualidade da água, poluindo o solo usado na agricultura e afetando os ecossistemas aquáticos (CHENG *et al.*, 2020).

Dessa forma, torna-se importante a avaliação do risco tóxico desse tipo de efluente, principalmente no que diz respeito a organismos expostos a poluentes

(bioindicadores), utilizando testes em sistemas biológicos (biomarcadores), que propiciam promissoras ferramentas para a identificação de poluentes capazes de causar danos à saúde humana e ao ambiente (SILVA *et al.*, 2003). A utilização de bioensaios vegetais tem o intuito de monitorar o risco tóxico para análises de toxicidade e bioindicação de poluentes ambientais como resíduos industriais, agrotóxicos e metais pesados (SILVEIRA *et al.*, 2017).

Uma avaliação toxicológica utilizando os bioensaios, possibilita avaliar a ação genotóxica dos efeitos da exposição do material genético ao contaminante mediante a avaliação de mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA (VALENTE *et al.*, 2017). De forma complementar, torna-se importante estudos simultâneos da resposta do sistema antioxidante e trocas gasosas das plantas, pois o excesso de metais pesados, podem levar a modificações no metabolismo de plantas, na qual mecanismos fisiológicos toleram o acúmulo de metais, reduzindo a produção de biomassa (KIM *et al.*, 2019). Dessa forma, há o melhor entendimento acerca do efluente e possibilitando ideias e soluções para o reuso adequado do mesmo.

## 2. OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi avaliar o risco ambiental do resíduo bruto e do efluente da lagoa de estabilização de biodigestor da suinocultura, avaliar a reutilização do efluente da lagoa de estabilização como biofertilizante e a qualidade das amostras de água do rio Santa Maria do Doce no entorno da granja de suínos.

## 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar a composição química do resíduo bruto e o do efluente da lagoa de estabilização do biodigestor da produção de suínos;

Avaliar diferentes diluições do resíduo bruto e do efluente da lagoa de estabilização do biodigestor de suinocultura, por meio de testes toxicogenéticos e biomarcadores bioquímicos, nos modelos vegetais *Allium cepa* e *Lactuca sativa*;

Avaliar o uso do resíduo da lagoa de estabilização do biodigestor de suinocultura como biofertilizante por meio análises de crescimento e trocas gasosas em plantas de milho;

Avaliar a qualidade das amostras de água do rio Santa Maria do Doce, no entorno da granja da suinocultura, por meio de parâmetros abióticos, testes toxicogenéticos e biomarcadores bioquímicos, nos modelos vegetais *Allium cepa* e *Lactuca sativa*.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Suinocultura

#### 4.1.1 Economia e produção de resíduos

A suinocultura possui uma grande importância no mercado mundial, sendo a carne suína a segunda proteína mais consumida no mundo, perdendo apenas para os pescados. O consumo de carne suína pela China é responsável por 50,7%, enquanto a União Europeia e Estados Unidos da América, são responsáveis por 19,1% e 8,5%, respectivamente, de toda carne suína produzida no mundo (GUIMARÃES *et al.*, 2017). O mercado para carne suína apresenta-se promissor, tanto para o mercado internacional quanto para o Brasil que é um dos maiores produtores e exportadores mundiais da proteína (MAPA, 2020).

O Brasil ocupa o quarto lugar no ranking mundial na produção e exportação de carne suína e, apenas no primeiro semestre de 2020, as exportações movimentaram mais de 1 bilhão de dólares, ficando atrás apenas da China, União Europeia (EU) e Estados Unidos da América (EUA) (BIASI *et al.*, 2018; MAPA, 2020). Os estados brasileiros com maior produção de suínos são Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Norte, sendo que grande parte da produção ainda está associada a agricultura familiar em pequenas propriedades rurais (MAPA, 2015). Devido à preocupação mundial com o bem-estar animal, cada vez mais a suinocultura depende de um conjunto de insumos como, rações, vacinas, melhoramento genético, equipamentos, instalações e medicamentos, bem como a mecanização das granjas (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

Apesar da grande importância econômica da suinocultura para diversos países, existem os problemas ambientais atrelados a produção que é considerada pelos órgãos de fiscalização e controle ambiental como uma atividade de alto potencial poluidor, gerando diversos impactos ambientais, principalmente associados a água e ao solo em casos de manejo inadequado (BARROS *et al.*, 2019; DOS SANTOS; DOS SANTOS, 2021). Os dejetos da suinocultura podem apresentar um potencial poluidor de até 260 vezes maior quando comparado com o esgoto doméstico (MARTINKOSKI *et al.*, 2017).

Como a produção de carne suína brasileira propende a um aumento na produção, faz-se necessário medidas de sustentabilidade, priorizando a biossegurança, a sanidade, o bem-estar animal, o uso consciente de

antimicrobianos e o investimento em mão de obra qualificada (BARROS *et al.*, 2019). Apesar desse subproduto da produção possuir uma grande quantidade de nutrientes importantes para cultivos vegetais, ele pode se tornar um fator poluidor devido o manejo incorreto, havendo a necessidade de um tratamento adequado antes da utilização desses dejetos (ANIS *et al.*, 2020; BARROS *et al.*, 2019; DOS SANTOS; DOS SANTOS, 2021).

Portanto é necessário que haja um processamento, ou um descarte adequado dos resíduos ao longo do processo produtivo, a fim de reduzir o volume final de resíduos (FATMA, 2014). Desse modo, o volume final de dejetos terá uma relação direta com a quantidade da água perdida nos bebedouros, bem como a quantidade de água utilizado na higienização das granjas e na água disponibilizada para o banho dos animais (BARROS *et al.*, 2019). Além disso, o processo produtivo carece de uma preocupação na qualidade final de resíduos porque, muitas vezes, a composição e concentração de nutrientes está relacionada a alimentação dos suínos, classificada como fonte poluidora em que o balanceamento nutricional, atrelado a estratégias nutricionais, diminuem a concentração de nutrientes com alto potencial poluente como nitrogênio e fósforo, além de diminuir a disponibilidade de metais pesados, como zinco e cobre, proporcionando um menor impacto ambiental (GENOVA *et al.*, 2015).

#### 4.1.2 Biodigestores

A produção de suínos gera uma grande carga de dejetos formados principalmente por fezes, urina, restos de ração, água dos bebedouros e da limpeza da granja. A quantidade de dejetos depende muito do sistema de criação, dos fatores ligados a raça, do sexo e do tamanho dos animais, bem como o tipo de alimentação que os suínos recebem (DA ROS *et al.*, 2017; GENOVA *et al.*, 2015; RIZZONI *et al.*, 2012). Em concordância com esses fatores, os órgãos de fiscalização e controle ambiental classificam a suinocultura como uma atividade com alto potencial poluidor, exigindo o uso de sistemas de tratamento dos dejetos para diminuir os riscos e impactos ao meio ambiente (BARROS *et al.*, 2019).

Parte dos impactos provocados pela suinocultura resulta da falta de manejo adequado dos rejeitos sólidos e líquidos produzidos pela atividade como, por exemplo, a produção de efluentes com alta carga orgânica, que muitas vezes é

lançada diretamente nos mananciais de água e podendo até mesmo entrar em contato com os lençóis freáticos e acarretar a poluição em torno da granja (CARVALHO *et al.*, 2015).

Por outro lado, estes dejetos representam potencial fonte de energia aproveitável, reduzindo o despejo de resíduos no ambiente e permitindo o acesso a fontes de energia de baixo custo (WINCKLER *et al.*, 2017). A utilização de tecnologias que permitem o reaproveitamento dessas fontes de energia vem sendo desenvolvidas e utilizadas como forma de promover a sustentabilidade econômica e ambiental da atividade (ANIS *et al.*, 2020).

Uma alternativa para o tratamento dos dejetos da produção de suínos é a biodigestão anaeróbica que se refere ao processo de decomposição da matéria orgânica por meio de bactérias presentes nas fezes dos animais (KLEINSTEUBER, 2014). O funcionamento do biodigestor anaeróbico consiste na canalização dos dejetos em uma câmara de fermentação subterrânea revestida por material impermeável. Sendo formada por duas partes (Figura 1): uma câmara fechada, onde ocorre a digestão da biomassa, e um gasômetro ou campânula onde é armazenado o biogás (KUNZ *et al.*, 2005; SALES FILHO, 2014).

Com o processo de digestão anaeróbica, é possível obter subprodutos com grande potencial econômico para as propriedades rurais como o biofertilizante rico em nutrientes e o biogás (SILVA, 2016). Além disso, o biodigestor torna-se uma importante ferramenta ambiental, reduzindo a carga de matéria orgânica dos efluentes, além de controlar a proliferação de moscas com a redução de odores, bem como, reduzindo a emissão de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e metano (CH<sub>4</sub>) na atmosfera (MARQUES *et al.*, 2014). Ao fim do processo de biodigestão, os efluentes são armazenados em lagoas de estabilização com a função de reduzir a carga de matéria orgânica e decantar os sólidos em suspensão para que, enfim, ocorra a destinação adequada do efluente final. Apesar de possuírem baixo custo de manutenção e operação, as lagoas de estabilização demandam uma grande área para sua construção (MARA, 2004; VON SPERLING, 2002).

O biofertilizante, produto final do biodigestor, é utilizado pelos produtores rurais na fertirrigação. Além do retorno financeiro que reduz os custos com fertilizantes convencionais, o biofertilizante acarreta benefícios ao meio ambiente (MAPA, 2016). De acordo com Brunetto *et al.* (2012), pode ocorrer um aumento da capacidade de troca catiônica do solo, melhorando as propriedades físicas, físico-

químicos, químicas e biológicas do solo, bem como podem causar o acúmulo de nutriente no solo, pois, muitas vezes, a concentração de nutrientes está acima da capacidade de absorção das plantas (CERETTA *et al.*, 2003; STEINER *et al.*, 2011).

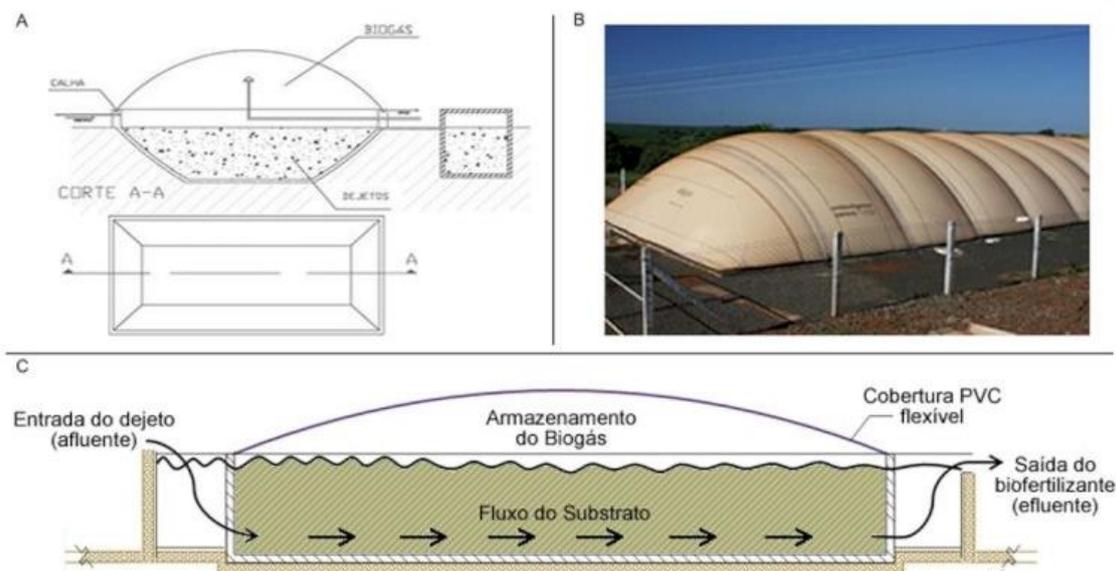


Figura 1: Biodigestor Modelo Fluxo Tubular – Fluxo pistão (Plug Flow) – modelo Canadense. (A) Detalhe do Corte A-A do biodigestor; (B) Imagem externa de um biodigestor (C) Caminho que os dejetos percorrem no biodigestor. Fonte: DE LIMA, 2011.

Apesar dos aspectos positivos, é preciso ter cautela no uso desse efluente como biofertilizante, pois os mesmos possuem alta variabilidade em sua composição química (DOS SANTOS; DOS SANTOS, 2021; VELOSO *et al.*, 2018), e a possibilidade de salinização do solo, uma vez que o uso excessivo do efluente do biodigestor pode aumentar o pH do solo, bem como promover o desequilíbrio da microbiota e, até mesmo, contaminar o lençol freático (DOS SANTOS; DOS SANTOS, 2021) principalmente, devido à alta carga de metais pesados que esse tipo de efluente geralmente possui (VARDHAN *et al.*, 2019). O acúmulo de metais pesados nas plantas interfere em seus processos fisiológicos, principalmente relacionados ao seu metabolismo, reduzindo a capacidade de acumular biomassa e o desenvolvimento adequado a espécie (KIM *et al.* 2019).

#### 4.2 Rio Santa Maria do Doce e Parâmetros Abióticos

A bacia hidrográfica do rio Santa Maria do Doce está situada na região centro-norte do Estado do Espírito Santo, Brasil. Sendo um afluente direto do Rio Doce, abrangendo os municípios de Santa Tereza, São Roque do Canaã e parcialmente o município de Colatina, totalizando uma área de drenagem de aproximadamente 935 km<sup>2</sup>. O rio Santa Maria do Doce nasce na Serra do Gelo, a 1000 metros de altitude, no município de Santa Tereza e percorre cerca de 93 km, atravessando os municípios de São Roque do Canaã, até a desembocadura no Rio Doce, no município de Colatina. Durante o percurso, ocorre a drenagem de seus principais afluentes: os rios Vinte e Cinco de Julho, Mutum, Cinco de Novembro, Taboca, Perdido e Santa Julia, e os córregos Caldeirão, Serra dos Pregos, Santo Hilário, do Gelo, da Onça e Senador (PAHR, 2010).

As águas do rio Santa Maria do Doce são utilizadas principalmente para irrigação da agricultura, representando 93% do uso da água, principalmente, nas lavouras de café, hortaliças, entre outras culturas; o abastecimento humano responsável por apenas 4%; o uso por animais e indústrias são pouco expressivas (MENEHELLI *et al.*, 2016; PARH, 2010).

Ações antropogênicas, agropecuária, silvicultura e o extrativismo mineral vem afetando a qualidade e disponibilidade da água (FERREIRA *et al.*, 2012). Segundo Pahr (2010), ao longo do curso do rio, há predomínio de áreas antropizadas com escassez de cobertura vegetal nas margens do rio, desde o distrito de Alto Santa Maria até a confluência com o rio Doce em Colatina. A ação humana em torno do rio agrava a poluição do rio Santa Maria do Doce e de seus efluentes, principalmente, devido ao lançamento de esgoto doméstico e efluentes industriais como de alambiques, na produção da cachaça (FERREIRA *et al.*, 2011). Há também o uso indiscriminado e abusivo de agroquímicos na produção agrícola, como por exemplo na cultura de café e olerícolas, principalmente, nos municípios de São Roque do Canaã e de Colatina, onde os agroquímicos acabam sendo lixiviados para o leito do rio e de seus efluentes (PAIXÃO *et al.*, 2015).

Estudos de monitoramento do rio Santa Maria do Doce, realizados por Vieira (2020), apresentam resultados que evidenciam a fragilidade do rio, estando diretamente relacionado com o tipo de solo e cobertura vegetal das margens do mesmo, evidenciando a existência de locais mais suscetíveis aos processos de

erosão e perda de solo, demandando maior atenção. Paixão *et al.* (2015), relatam que grande parte do leito do rio Santa Maria do Doce se encontra contaminado, considerado inviável que essa água seja utilizada para o consumo humano.

Existem diferentes metodologias para avaliação da qualidade da água do rio, dentre eles há os parâmetros físicos e químicos por fornecerem, de forma rápida, resposta acerca da situação do rio (CAMPOS, 2009). As análises dos fatores abióticos têm como objetivo quantificar os elementos iônicos presentes nas amostras de água e relacionar os efeitos da presença dos mesmos com questões ambientais, comparando os valores encontrados com padrões que as agências ambientais determinam (PARRON *et al.*, 2011). Destaca-se entre os parâmetros físicos a condutividade elétrica e sólidos (totais, voláteis e solúveis); assim como o pH e a presença de metais são classificados como parâmetros químicos (CAMPOS, 2009).

A condutividade elétrica é a capacidade da amostra em conduzir uma corrente elétrica. Quando maior a concentração de íons, maior a condutividade. Sendo assim, em águas limpas, maior é a resistência e menor a condutividade. Isso é utilizado como parâmetro para avaliação de poluição em ambientes aquáticos, entendendo-se que quanto maior a condutividade elétrica, maior a fonte de despejo poluentes no rio. Diversas substâncias orgânicas são ionizáveis, podendo favorecer no aumento da condutividade da amostra (ESTEVES, 2011). A análise de sólidos representa toda matéria contida na água, podendo ocorrer por processos naturais como erosão e matéria orgânica natural do meio, ou por processos antropogênicos, devido o lançamento de efluentes, esgoto doméstico e lixo sólidos (FUNASA, 2014). O excesso de sólidos nos corpos d'água pode ocasionar prejuízos ao funcionamento da ecologia do rio, bem como prejudicar a vida dos organismos nesse ecossistema (ANA, 2017).

A importância de avaliar o pH se justifica devido os efeitos que o mesmo impõe sobre a fisiologia dos organismos de ecossistemas aquáticos, podendo atuar nos processos de permeabilidade das membranas, intervindo nas trocas iônicas entre a célula e o meio (SILVA, 2012). A presença de metais em amostras de rio, intervém, principalmente, na vida dos organismos aquáticos, pois os mesmos absorvem e acumulam, por meio da superfície do corpo, estruturas respiratórias ou alimentação, interferindo na produtividade de plantas e animais, além de causar doenças em humanos, levando até mesmo à morte (FARIAS, 2014; FERREIRA *et*

*al.*, 2010). Um dos fatores agravante da presença dos metais denota da sua alta toxicidade por não serem degradáveis e se acumularem nos componentes do meio (VOIGH-T *et al.*, 2016).

### 4.3 Modelos Vegetais

#### 4.3.1 *Lactuca sativa* e *Allium cepa*: Toxicogenética e Biomarcadores Bioquímicos

Os bioensaios em modelos vegetais possuem diversas vantagens, principalmente devido ao amplo campo de avaliação do potencial tóxico de diversos poluentes ambientais, em diferentes aspectos de organização, como bioquímico, fisiológico, celular e até a nível de DNA (SILVEIRA *et al.*, 2017). Estudos ecotoxicológicos propõem o uso de bioensaios, teste de toxicidade com organismos vivos, destacando a avaliação genotóxica que avalia os efeitos nos organismos teste expostos a determinado poluente por meio da avaliação mutagênica, alterações cromossômicas e lesões no DNA (VALENTE *et al.*, 2017). Assim, os bioensaios volta-se para a avaliação de citotoxicidade que avalia a ação de determinado agente químico nos processos metabólicos das células, analisando possíveis intervenções no crescimento, ou multiplicação celular, promovendo até mesmo a morte celular (ABREU, 2008), o que possibilita elucidar a relação entre os poluentes químicos com o ambiente, onde esses poluentes são liberados, e a biota local. Sendo importante a realização desse tipo de estudo para evidenciar os potenciais riscos dos contaminantes a biodiversidade, assim como propor medidas para atenuar os possíveis impactos (CARVALHO; PIVOTO, 2011).

A avaliação do ciclo celular pode trazer diversas respostas, até mesmo indicar o mecanismo de ação da substância de interesse nas células. Podendo ser de dois tipos, a ação clastogênica, na qual ocorre quebra do cromossomo, origina danos como pontes e fragmentos cromossômicos; a ação aneugênica, definida por segregação anormal dos cromossomos, dá origem a alterações como perdas cromossômicas, aderência cromossômica, c-metáfase, multipolaridade e atrasos na segregação cromossômica (Figura 2) (FREITAS *et al.*, 2016; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

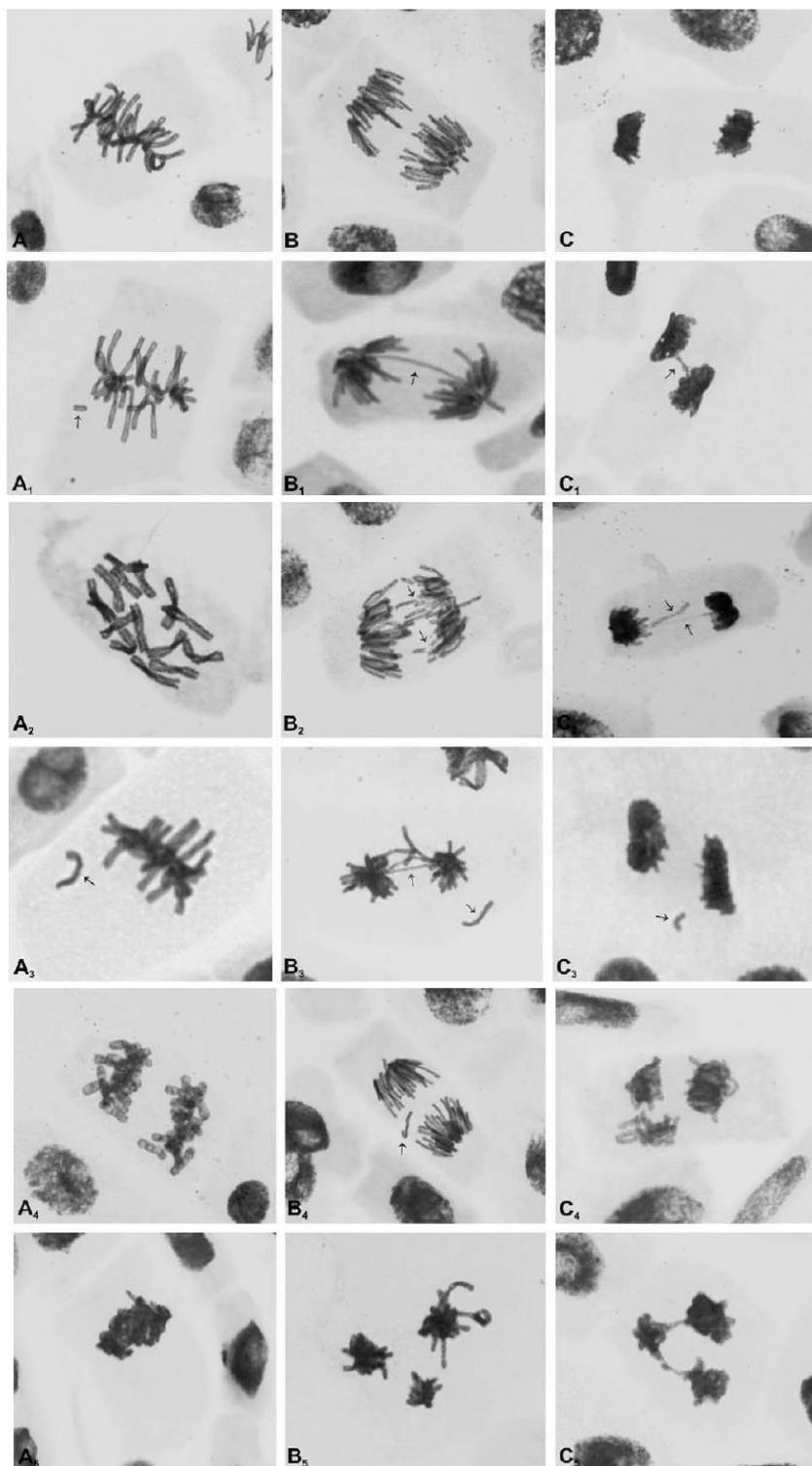


Figura 2: Fases do ciclo celular e aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostos aos agentes químicos. (A) Metáfase normal; (A1) Metáfase com quebra cromossômica; (A2) C-metáfase; (A3) Metáfase com perda cromossômica; (A4) Célula binucleada em metáfase; (A5) Metáfase com aderência cromossômica; (B) Anáfase normal; (B1) Anáfase com ponte cromossômica; (B2) Anáfase com quebra cromossômica; (B3) Anáfase com perda cromossômica e ponte; (B4) Anáfase com perda cromossômica; (B5) Anáfase multipolar; (C) Telófase normal; (C1) Telófase com ponte cromossômica; (C2) Telófase com a perda cromossômica e ponte; (C3) Telófase com quebra cromossômica; (C4) Telófase multipolar; (C5) Telófase Multipolar com ponte cromossômica. (Leme; Marin-Morales, 2009).

A formação do fuso mitótico durante o ciclo celular é passível de sofrer intercorrências como alterações na polimerização, despolimerização dos microtúbulos e a não ligação dos mesmos aos cromossomos na região centromérica. Como consequência, afetam a segregação dos cromossomos para as células filhas, ocasionando a formação de células poliploides; originam C-metáfases devido a interrupção do ciclo celular em metáfase; anáfase multipolar ou segregação anormal/tardia dos cromossomos/cromátides em anáfase/telófase (FERNANDES *et al.*, 2019; FREITAS *et al.*, 2016).

Segundo Fernandes *et al.* (2007) o descontrole na divisão celular pode ocasionar alterações nucleares e, conseqüentemente, a formação de células poliplóides e a eliminação de parte do material genético celular, ocasionando a formação de anomalias nucleares. Alterações nucleares são caracterizadas por alterações morfológicas no núcleo interfásico, resultantes da ação tóxica de compostos. São importantes quando analisadas em conjunto com as alterações cromossômicas, possibilitando uma avaliação confiável dos mecanismos de ação do composto, em relação aos danos causados no DNA dos organismos testes (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Dentre os modelos vegetais mais utilizados em avaliações de toxicidade e genotoxicidade destaca-se o *Allium cepa* com crescimento radicular rápido que permite a investigação da toxicidade pela inibição do crescimento radicular (DORNELLES *et al.*, 2017), assim como a presença de cromossomos grandes e em número reduzido ( $2n=16$ ), propiciando a detecção de alterações cromossômicas e nucleares (genotoxicidade e mutagênicidade) e distúrbios na proliferação celular (citotoxicidade). *A. cepa* ainda apresenta elevada sensibilidade em detectar a ação de diversos agentes químicos e ambientais, como: metais pesados, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, resíduos industriais e domésticos, extratos biológicos, entre outros (BIANCHI *et al.*, 2015; FIRBAS; AMON, 2013; GALTER *et al.*, 2021; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Logo, este bioindicador pode ser utilizado tanto para estudos de mecanismos básicos quanto para indicação de efeitos ocasionados por produtos químicos (FISKESJÖ, 1985).

Outro modelo que vem ganhando destaque é a *Lactuca sativa*, usado como indicador de fitotoxicidade devido à sua alta sensibilidade aos fatores externos, além de possuir cromossomos relativamente grande e em número reduzido ( $2n=18$ ), facilmente observados em microscopia de luz, possibilitando a avaliação

dos potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. Ademais, apresenta grande número de sementes, alta taxa de germinação, fácil manuseio e baixo custo para realizar os experimentos (ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2014; ARAGÃO *et al.*, 2015; ARAGÃO *et al.*, 2021; CAMPOS *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2017).

Os modelos *Allium cepa* e *Lactuca sativa* podem ser utilizados de forma complementar, devido uma maior sensibilidade a fitotoxicidade por parte de *L. sativa*, enquanto *A. cepa*, devido ao tamanho de seus cromossomos, permitem uma melhor visualização dos danos genotóxicos e mutagênicos (SILVEIRA *et al.*, 2017). Trabalhos recentes, com intuito de avaliar poluentes ambientais e a qualidade da água de rios, utilizaram *Allium cepa* ou *Lactuca sativa* como modelos vegetais, reiterando a aplicabilidade deles para esse fim, o que evidencia a sensibilidade dos modelos, tanto a agentes com a alta capacidade de causar danos como agrotóxicos. Também, podem ser utilizados no biomonitoramento de rios, sugerindo os mecanismos de ação de metais pesados por meio de alterações citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas (ARAGÃO *et al.*, 2019; ARAGÃO *et al.*, 2021; GALTER *et al.*, 2021; MACAR, 2021; SOUZA *et al.*, 2021).

As análises de biomarcadores bioquímicos são importantes ferramentas na avaliação do risco tóxico de possíveis poluentes. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas constantemente em baixa concentração e em diversos processos do metabolismo da planta, como no cloroplasto, mitocôndria, peroxissomos, membrana plasmática, apoplasto e núcleo da célula (GILL; TUTEJA, 2010). Apesar das EROs serem constantemente associadas a danos nocivos aos organismos, elas possuem importância como reguladores intrínsecos no decorrer do ciclo celular (VIVANCOS *et al.*, 2010), havendo uma regulação da produção e acúmulo das EROs no decorrer do desenvolvimento e respostas ao estresse, por parte do metabolismo da planta (XIA *et al.*, 2015).

O estresse oxidativo em si, é ocasionado em condições estresse biótico ou abiótico, resultante de um desequilíbrio celular, ocasionado por uma alta produção de EROs em que o sistema antioxidante não consegue eliminar o excedente (GRATÃO *et al.*, 2015). Dentre as principais decorrências do estresse para as plantas, destaca-se o aumento da proliferação celular e lesões celulares, devido a danos a lipídios, DNA, proteínas e carboidratos, levando até mesmo a morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

As superóxidos dismutases (SOD) são consideradas a primeira linha de defesa contra as EROs. Elas catalisam a transformação do superóxido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ), protegendo as células dos efeitos tóxicos desses radicais, evitando a formação do radical hidroxil (OH) (GILL; TUTEJA, 2010; TAIZ *et al.*, 2017). A catalase (CAT) é responsável pela inativação do peróxido de hidrogênio formado na conversão do glicolato a glioxalato durante a fotorrespiração e pela decomposição do peróxido formado na reação de oxidação de ácidos graxos nos glioxissomos. São as únicas enzimas que degradam o  $H_2O_2$  sem a utilização de redutores celulares e sua atividade cresce linearmente de acordo com a concentração do substrato (SCANDALIOS, 2005; TAIZ *et al.*, 2017).

A glutatona reduzida (GSH) possui um papel essencial na biotransformação e eliminação de compostos químicos, bem como na defesa de células contra o estresse oxidativo (HUBER *et al.*, 2008). Além de atuar juntamente com a enzima glutatona S-transferase (GST), nas quais, podem ser conjugadas a xenobióticos, que geralmente são citotóxicos, produzindo compostos solúveis com toxicidade reduzida (KREUZ *et al.*, 1996). Ademais, tende-se a peroxidação de lipídios (LPO), caracterizada pelo processo pelo qual EROs, radicais livres ou não radicais atacam lipídeos poli-insaturados. Estes lipídios possuem duas ou mais ligações duplas, tornando-os propícios a ação dos radicais livres (BARRERA *et al.*, 2018).

Trabalhos testaram o efeito da água residuária da suinocultura no desenvolvimento e qualidade de mudas de eucalipto (BATISTA *et al.*, 2014), a toxicidade do resíduo em minhocas, por meio da avaliação da letalidade, fuga e reprodução (PANIAGO *et al.*, 2015), avaliação da abundância da diversidade da meso e macrofauna do solo em duas lavouras de soja que receberam doses do resíduo (MACIEL *et al.*, 2017). Assim como, Silva (2020) evidenciou danos genotóxicos em girinos de duas espécies de rãs a curto prazo, além disso, os autores relatam o potencial citotóxico e genotóxico do resíduo da suinocultura em *Allium cepa*.

#### 4.3.2 *Zea Mays*: Análise de Crescimento e Trocas gasosas

O milho (*Zea mays* L.) é o principal cereal produzido pelo Brasil, além de ser um alimento de importante fonte de nutrientes para o mundo (CHIEZA *et al.*, 2017; HENG *et al.*, 2009). Pertencente à família Gramineae/Poaceae, do grupo de plantas

com metabolismo C4, caracterizada por ser uma planta de ciclo anual, com baixo ponto de compensação de CO<sub>2</sub>, alta taxa fotossintética, baixo consumo de água para produção de biomassa e grande potencial produtivo (AZEVEDO NETO; TABOSA, 2000; BERGAMASHI *et al.*, 2004); além de ser muito utilizado em diversos ensaios morfofisiológicos como modelo vegetal, devido seu rápido crescimento (MENCH; MARTIN, 1991; USDA, 2018).

As plantas, dentre elas o modelo vegetal milho, realizam a fotossíntese por meio da absorção da energia luminosa pelos complexos coletores de luz (Complexo antena), uma complexa rede de pigmentos incorporados a proteínas, constituindo o fotossistema. Sintetizando, o fotossistema II que transfere a energia de excitação do complexo antena, iniciando a fase fotoquímica, levando a hidrólise da água e a redução das plastoquinonas (STIRBET; GOVINDJEE, 2011). A taxa fotossintética pode ser variável em diversos aspectos, seja entre espécies diferentes e os ambientes na qual os organismos estão presentes, ou fatores intrínsecos da espécie como idade da folha, a condutância estomática e fatores ambientais (luz, temperatura e água) (KOZLOWSKI *et al.*, 1991). Dentre os principais elementos da cadeia transportadora de elétrons, o fotossistema II é considerado um componente extremamente sensível quando exposto a situações de estresse biótico e abiótico, sofrendo mudanças conformacionais e estruturais com a finalidade de preservar a sua função (YUSUF *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010).

Análises de crescimento associadas à avaliação da atividade fotossintética proporcionam uma visão detalhada das mudanças morfológicas nas plantas em função do tempo e avalia até mesmo a produção fotossintética mediante a avaliação do acúmulo de matéria seca (CONCENÇO *et al.*, 2011; FALQUETO *et al.*, 2009). Considerada método de análise acessível, de baixo custo e muito preciso, utilizado para avaliar o crescimento vegetal em múltiplas condições de ambiente de cultivo e manejo.

As análises de crescimento permitem avaliar a produção e armazenamento de biomassa pela planta, e nos diferentes órgãos (folhas, caules, flores, raízes e grãos), bem como a área foliar, principal órgão responsável pela fotossíntese, permitindo assim, atribuir a participação de cada órgão no desenvolvimento da planta (ALVAREZ *et al.*, 2012; BENINCASA, 2003, TAIZ *et al.*, 2017). Condições distintas podem levar à redução do crescimento diretamente relacionado à atividade fotossintética, por isso a importância de realizar os estudos de trocas

gasosas e crescimento, afim de avaliar a adaptação e estabilidade das plantas em determinadas condições ambientais (ANJOS *et al.*, 2014).

Gonçalves (2021) relata a avaliação do crescimento de plantas de milho quando submetidos a tratamento de água residuária da suinocultura, em que foi observado um aumento da massa seca e na produtividade de grãos, sendo que a diluição de 75% da água residuária foi considerada a mais apropriada para o incremento de massa seca e produtividade das plantas. O uso da fertirrigação com água residuária de suinocultura associado a um biocarvão, se mostrou relevante no incremento de nutrientes no solo, nutrição e desenvolvimento da planta de milho (DA CUNHA *et al.*, 2019). Alves *et al.* (2021) avaliaram as trocas gasosas de plantas de milho tratadas com água residuária da suinocultura e verificaram que o resíduo proporciona um maior teor de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *total* no final do ciclo do milho, independente da diluição utilizada.

## 5. REFERÊNCIAS

ABREU, Clarice Lima do Canto et al. **Avaliação de citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3T3**. 2008. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2008.

ALVAREZ, Rita de Cassia Felix et al. Growth analysis and yield of traditional, intermediate and modern upland rice cultivars. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 4, 2012.

ALVES, Daniely Karen Matias et al. Teores de clorofilas do milho submetido a fertirrigação com água residuária de suinocultura e piscicultura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e2510716251-e2510716251, 2021.

ANA, Agência Nacional de Águas. **Indicadores de Qualidade - Índice de Qualidade das Águas (IQA)**. 2017. Disponível em: <<http://portalpnqa.ana.gov.br/indicadores-indice-aguas.aspx>>. Acesso em: 23 maio 2017.

ANDRADE-VIEIRA, Larissa F. et al. Effects of Jatropha curcas oil in Lactuca sativa root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, p. 373-382, 2014.

ANIS, Cintia Ferreira et al. Viabilidade econômica para implantação de um biodigestor: uma alternativa para o pequeno produtor rural suinocultor. **Multitemas**, p. 147-168, 2020.

ANJOS, Danilo et al. Trocas gasosas em plantas de feijoeiro submetidas a fitorreguladores, NPK e micronutrientes. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 10, n. 19, 2014.

APARECIDO, Lucas Eduardo De Oliveira et al. Sensitivity of newly transplanted coffee plants to climatic conditions at altitudes of Minas Gerais, Brazil. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 2, p. 160-167, 2015.

APARECIDO, Lucas Eduardo De Oliveira et al. Agrometeorological models for forecasting coffee yield. **Agronomy Journal**, v. 109, n. 1, p. 249-258, 2017.

ARAGÃO, Francielen Barroso et al. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Allelopathy J**, v. 35, n. 2, p. 259-272, 2015.

ARAGÃO, Francielen Barroso et al. Cyto (geno) toxicity of commercial fungicides based on the active compounds tebuconazole, difenoconazole, procymidone, and iprodione in *Lactuca sativa* L. meristematic cells. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, n. 1, p. 25, 2019.

ARAGÃO, Francielen Barroso et al. Toxicogenetic of tebuconazole based fungicide through *Lactuca sativa* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 213, p. 111985, 2021.

AZEVEDO NETO, André Dias de; TABOSA, José Nildo. Estresse salino em plântulas de milho: parte II distribuição dos macronutrientes catiônicos e suas relações com sódio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, p. 165-171, 2000.

BARRERA, Giuseppina *et al.* Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. **Antioxidants**, v. 7, n. 8, p. 102, 2018.

BARROS, E. C. *et al.* Potencial agrônômico dos dejetos de suínos. **Embrapa Suínos e Aves-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**, 2019.

BATISTA, Raquel Oliveira *et al.* O efeito da água residuária da suinocultura no desenvolvimento e qualidade de mudas de *Eucalyptus urophylla*. **Ciência Florestal**, v. 24, p. 127-135, 2014.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2003.

BERGAMASCHI, Homero *et al.* Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 831-839, 2004.

BIANCHI, Jaqueline *et al.* Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of Environmental Sciences**, v. 36, p. 102-111, 2015.

BIASI, Carlos A.F *et al.* Energias renováveis na área rural da região sul do Brasil. **Foz do Iguaçu: Itaipu Binacional**, 2018.

BRUNETTO, Gustavo *et al.* Changes in soil acidity and organic carbon in a sandy typic hapludalf after medium-term pig-slurry and deep-litter application. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 5, p. 1620-1628, 2012.

CAMPOS, J. M. S. *et al.* Genetic toxicology and environmental mutagenesis in allelopathic interactions. **Plant bioassays. Studium press, Houston**, p. 1-344, 2008.

CAMPOS, CÁSSIA ROBERTA. **Monitoramento da microbiota e dos parâmetros físico-químicos em vinhoto**. 2009. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CARVALHO, Bruno Vieira de *et al.* Avaliação de sistemas de gestão ambiental em granjas de suínos. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, p. 164-171, 2015.

CARVALHO, Nathália Leal; PIVOTO, Thiago Salbego. Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agrônômica. **Revista Monografias Ambientais**, v. 2, n. 2, p. 176-192, 2011.

CERETTA, Carlos Alberto *et al.* Características químicas de solo sob aplicação de esterco líquido de suínos em pastagem natural. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 38, p. 729-735, 2003.

CHENG, Dongle *et al.* A critical review on antibiotics and hormones in swine wastewater: Water pollution problems and control approaches. **Journal of hazardous materials**, v. 387, p. 121682, 2020.

CHIEZA, Emerson Dalla *et al.* Produção e aspectos econômicos de milho consorciado com *Crotalaria juncea* L. em diferentes intervalos de semeadura, sob manejo orgânico 1. **Revista Ceres**, v. 64, p. 189-196, 2017.

CONCENÇÃO, G. *et al.* Photosynthetic characteristics of hybrid and conventional rice plants as a function of plant competition. **Planta daninha**, v. 29, p. 803-809, 2011.

DA CUNHA, E.G. Biocarvão e água residuária de suinocultura: efeitos em atributos do solo, nutrição e desenvolvimento do milho. In: RANGEL, Otacilio José Passos Rangel. **Tópicos em agroecologia**, Alegre: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, 2019.

DA ROS, Clovis Orlando *et al.* Disponibilidade de nutrientes e acidez do solo após aplicações sucessivas de água residuária de suinocultura. **Revista Brasileira de Tecnologia Agropecuária**, v. 1, n. 1, p. 35-44, 2017.

DORNELLES, Rafaela C. *et al.* Antiproliferative and genotoxic potential from extracts and fractions of *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae) by the *Allium cepa* L. test system. **Iheringia. Série Botânica.**, v. 72, n. 3, p. 424-431, 2017.

DOS SANTOS, Maria das Graças Abreu; DOS SANTOS, Ana Paula Maia. Estudo metanalítico da qualidade de águas residuárias da suinocultura. **Diversitas Journal**, v. 6, n. 1, p. 1794-1806, 2021.

ESTEVES, Francisco de Assis. **Fundamentos de limnologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

FACTOR, Thiago L. *et al.* Produção de pimentão em substratos e fertirrigação com efluente de biodigestor. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, p. 143-149, 2008.

FALQUETO, Antelmo Ralph *et al.* Crescimento e partição de assimilados em cultivares de arroz diferindo no potencial de produtividade de grãos. **Bragantia**, v. 68, p. 563-571, 2009.

FARIAS, Yaci Maria Marcondes. **Biossorção De Metais Pesados Pelo Fungo *Penicillium corylophilum***. 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

FATMA. **Instrução Normativa Suinocultura**. Fundação do Meio Ambiente - FATMA, p. 1-37, 2014.

FERNANDES, Thaís Cristina Casimiro *et al.* Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 6, p. 1680-1686, 2009.

FERREIRA, Aldo Pacheco *et al.* Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, na água e nos órgãos de *Nycticorax nycticorax* (Garçada-noite) na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. **Revista de Gestão Costeira Integrada-Journal of Integrated Coastal Zone Management**, v. 10, n. 2, p. 229-241, 2010.

FERREIRA, Elvis *et al.* Evolução e análise das ações do comitê da bacia hidrográfica do Rio Santa Maria do Rio Doce localizado no estado do Espírito Santo. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 13, 2011.

FERREIRA, Elvis *et al.* Diagnóstico ambiental das áreas de extração de argila em município produtor de cerâmica vermelha. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, 2012.

FIRBAS, P.; AMON, T. Allium chromosome aberration test for evaluation effect of cleaning municipal water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, v. 4, n. 4, p. 189, 2013.

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

FREITAS, Gilberto Bernardo *et al.* Resposta de brócolis à adubação de cobertura com biomassa de adubo verde e biofertilizante. **Ceres**, v. 58, n. 5, 2015.

FREITAS, Aline Silva *et al.* Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 124, p. 426-434, 2016.

FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. **Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS**. 2014. Disponível em: [http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files\\_mf/manualcont\\_quali\\_agua\\_tecnicos\\_trab\\_emetas.pdf](http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files_mf/manualcont_quali_agua_tecnicos_trab_emetas.pdf). Acesso em: 15 maio 2017.

GALTER, Iasmini Nicoli *et al.* Water assessment of the Itapemirim River/Espírito Santo (Brazil): abiotic and toxicogenetic aspects. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 8, p. 10175-10191, 2021.

GENOVA, J. L. *et al.* Estratégias para diminuir o impacto ambiental da suinocultura. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 12, p. 3891-3902, 2015.

GILL, Sarvajeet Singh; TUTEJA, Narendra. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GONÇALVES, Maykelle Vieira Mendes *et al.* **FERTIRRIGAÇÃO DE MILHO (*Zea mays* L.) COM ÁGUA RESIDUÁRIA DE SUINOCULTURA E PISCICULTURA**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Ambiental) – Campus Rio Verde, Instituto Federal Goiano, Góias, 2021.

GRATÃO, Priscila Lupino *et al.* Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p. 803-816, 2015.

GUIMARÃES, Diego Duque *et al.* Suinocultura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. **BNDES setorial**, v. 45, p. 85-136, 2017.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press, USA, 2015.

HENG, Lee Kheng *et al.* Validating the FAO AquaCrop model for irrigated and water deficient field maize. **Agronomy journal**, v. 101, n. 3, p. 488-498, 2009.

HUBER, Paula C. *et al.* Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

KIM, Jong-Joo *et al.* Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. **Journal of Trace elements in Medicine and Biology**, v. 54, p. 226-231, 2019.

KLEINSTEUBER, Sabine. Special Issue on "Microbial Ecology of Anaerobic Digestion". **Bioengineering**, v. 1, n. 2, p. 111-2, 2014.

KOZLOWSKI, T.T. *et al.* **The Physiological Ecology of Woody Plants** London: Academic Press, 1991.

KREUZ, Klaus *et al.* Old enzymes for a new job (herbicide detoxification in plants). **Plant physiology**, v. 111, n. 2, p. 349, 1996.

KUNZ, Airton *et al.* Tecnologias de manejo e tratamento de dejetos de suínos estudadas no Brasil. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 22, n. 3, p. 651-665, 2005.

LEME, Daniela Moraes; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

MACAR, Tuğçe Kalefetoğlu. Investigation of cytotoxicity and genotoxicity of abamectin pesticide in Allium cepa L. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 2, p. 2391-2399, 2021.

MACIEL, Ana PC *et al.* Soil meso-and macrofauna in two soybean crops after swine wastewater application. **Engenharia Agrícola**, v. 37, p. 556-564, 2017.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Suínos, 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>>. Acesso em: 31 mar 2015.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Suinocultura de baixa emissão de carbono: tecnologias de produção maislimpae aproveitamento econômico dos resíduos da produção de suínos**. Secretaria de Mobilidade Social, do Produtor Rural e do Cooperativismo -Brasília: 1ª edição, 2016.

MAPA. **Agrostat Suínos**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília. DF, 2020.

MARA, D. **Domestic Wastewater treatment in developing countries**, London – UK: Earthscan, 2004.

MARQUES, Sâmia Mirelly Alexandre de Assis et al. Produção de biofertilizante, adubo orgânico e biogás para agricultura familiar. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.18, n. 3, p. 990-999, 2014.

MARTINKOSKI, Cliceu et al. Portfólio bibliográfico da utilização de resíduos provenientes da suinocultura na geração de bioenergia. **Revista Espacios**, v. 38, n. 18, p. 1-14, 2017.

MENCH, Michel; MARTIN, E. Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates of *Zea mays* L., *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L. **Plant and soil**, v. 132, n. 2, p. 187-196, 1991.

MENEGHELLI, Caroline *et al.* QUALIDADE DA ÁGUA DO RIO SANTA MARIA DO DOCE-ES PARA FINS DE IRRIGAÇÃO. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 24, 2016.

PAIXÃO, Gleides Pulcheira et al. Qualidade das Águas do Rio Santa Maria do Doce. **Natureza Online**, v. 13, n. 3, p. 117-122, 2015.

PANIAGO, Gustavo G. *et al.* Ecotoxicidade da água residual de suinocultura usando minhocas *Eisenia andrei* como bioindicador. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 39, n. 3, p. 447-455, 2016.

PARH Santa Maria do Doce, **Plano de Ação de Recursos Hídricos da Unidade de Análise Santa Maria do Doce**, 2010. Disponível em: <[http://www.cbhdoce.org.br/wp-content/uploads/2014/10/PARH\\_SM\\_Doce.pdf](http://www.cbhdoce.org.br/wp-content/uploads/2014/10/PARH_SM_Doce.pdf)>. Acesso em: 17 jun. 2019.

PARRON, L. M. MUNIZ, D. H. F. Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água. Colombo: **Embrapa Florestas**, 2011.

QUEIROZ, Flávia Martins de *et al.* Características químicas de solo submetido ao tratamento com esterco líquido de suínos e cultivado com gramíneas forrageiras. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1487-1492, 2004.

RIZZONI, Leandro Becaletet *et al.* Biodigestão anaeróbia no tratamento de dejetos de suínos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 18, p. 1-20, 2012.

SALES FILHO, Ivanildo de Oliveira. **Avaliação da toxicidade e remoção de matéria orgânica de efluente de biodigestor de resíduos sólidos orgânicos tratados em Wetlands**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2014.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SILVA, G. M. F. **Zoneamento urbano e qualidade hídrica: monitoramento de alguns parâmetros físico-químicos das águas superficiais da zona urbana de Londrina**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Geografia) - Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2012.

SILVA, J. *et al.* **Biomonitoramento ambiental. Genética toxicológica**. Alcance, Porto Alegre. 2003.

SILVA, Maria Luciene da. **Aplicabilidade de Uma Tecnologia Sustentável no Município de Barreira do Maciço de Baturité**. 2016. Dissertação (Mestrado em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis) – UNILAB, 2016.

SILVA, André Luiz. **Efeitos Genotóxicos Da Água Residuária De Suinocultura Processada Por Biodigestor Em Modelos Animais E Vegetais**. 2020. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Góias, 2020.

SILVEIRA, Graciele Lurdes *et al.* Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359-367, 2017.

SOUSA, Francine Aparecida *et al.* Microbial activity and production of coffee crops after fertilization with pig slurry. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 4, p. 1041-1049, 2014.

SOUZA, Tatiana da Silva *et al.* Cytogenotoxicity of the water and sediment of the Paraopeba River immediately after the iron ore mining dam disaster (Brumadinho, Minas Gerais, Brazil). **Science of The Total Environment**, v. 775, p. 145193, 2021.

STEINER, Fábio *et al.* Atributos químicos do solo em diferentes sistemas de culturas e fontes de adubação. **Global Science And Technology**, v. 4, n. 1, 2011.

STEINMETZ, Ricardo Luis Radis *et al.* Study of metal distribution in raw and screened swine manure. **CLEAN–Soil, Air, Water**, v. 37, n. 3, p. 239-244, 2009.

STIRBET, Alexandrina *et al.* On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 104, n. 1-2, p. 236-257, 2011.

TAIZ, Lincoln *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

USDA - United States Department of Agriculture. **Natural Resources Conservation Service (NRCS)**. Disponível em: <<https://www.usda.gov/>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

VALENTE, Daniel *et al.* Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, 2017.

VARDHAN, Kilaru Harsha *et al.* A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives. **Journal of Molecular Liquids**, v. 290, p. 111197, 2019.

VELOSO, Alessandro Vieira *et al.* Sustentabilidade ambiental da suinocultura com manejo de dejetos em biodigestor-avaliação de parâmetros físico-químicos. **Revista Engenharia na Agricultura**, v. 26, n. 4, p. 322-333, 2018.

VIANCELLI, A. *et al.* Culturing and molecular methods to assess the infectivity of porcine circovirus from treated effluent of swine manure. **Research in veterinary science**, v. 93, n. 3, p. 1520-1524, 2012.

VIEIRA, Rubyana dos Santos. **Fragilidade ambiental da bacia hidrográfica do Rio Santa Maria do Rio Doce—ES**. 2020. Monografia (Especialista e, Educação e Gestão Ambiental) - Instituto Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2020.

VIVANCOS, Pedro Diaz *et al.* Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole-cell redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defence shield. **The Plant Journal**, v. 64, n. 5, p. 825-838, 2010.

VOIGT, Carmen Lúcia *et al.* Avaliação da bioacumulação de metais em *Cyprinus carpio* pela interação com sedimento e água de reservatório. **Química Nova**, v. 39, p. 180-188, 2016.

VON SPERLING, Marcos; OLIVEIRA, Carolina Moreira. Avaliação da influência do tempo de detenção hidráulica e da taxa de aplicação superficial na composição da comunidade fitoplanctônica presente em lagoas de polimento e a influência dessa comunidade nas condições ambientais (pH, OD e amônia) das lagoas. **Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales. Investigación, desarrollo y práctica**, v. 3, n. 1, p. 11-21, 2010.

XIA, Xiao-Jian *et al.* Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 10, p. 2839-2856, 2015.

WAINAINA, Steven *et al.* Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: a critical review. **Bioengineered**, v. 10, n. 1, p. 437-458, 2019.

WINCKLER, Silvana Teresinha *et al.* Impactos socioambientais da suinocultura no oeste catarinense e a iniciativa de implantação de biodigestores pelo Projeto Alto Uruguai. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 41, 2017.

YUSUF, Mohd Aslam *et al.* Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1797, n. 8, p. 1428-1438, 2010.

ZHANG, Mei-Ping *et al.* Changes in chloroplast ultrastructure, fatty acid components of thylakoid membrane and chlorophyll a fluorescence transient in flag leaves of a super-high-yield hybrid rice and its parents during the reproductive stage. **Journal of plant physiology**, v. 167, n. 4, p. 277-285, 2010.

**CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DO RISCO TÓXICO DE EFLUENTES  
PROVENIENTES DE BIODIGESTOR DE SUINOCULTURA NOS MODELOS  
VEGETAIS *Lactuca sativa* L. e *Allium cepa* L.**

Autores: Francielen Barroso Aragão<sup>1</sup> • Iasmini Nicoli Galter<sup>1</sup> • Kalia Dável Grecco<sup>1</sup>  
• Edvar Junior Roncetti Coelho<sup>1</sup> • Tainá Turial da Silva<sup>1</sup> • Marina Marques  
Bonomo<sup>2</sup> • Marisa Narciso Fernandes<sup>2</sup> • Silvia Tamie Matsumoto<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais,  
Departamento de Ciências Biológicas, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

<sup>(2)</sup> Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Humanas,  
Departamento de Ciências Fisiológicas, CEP 13656-905, São Carlos, SP, Brasil.

\*Autor para correspondência: francielenaragao@gmail.com

Periódico a ser submetido: *Water, air and soil pollution*, dezembro de 2021.

## RESUMO

A suinocultura é uma atividade agropecuária importante na alimentação, e na economia do Brasil e do Mundo. O fato desta atividade produzir resíduos com alta carga de matéria orgânica e metais, faz com que seja reconhecida como uma atividade de grande potencial poluidor. O objetivo deste trabalho foi averiguar os possíveis riscos ambientais que os efluentes bruto (EB) e da lagoa de estabilização (LE), provenientes do processo de biodigestão dos efluentes da suinocultura, podem ocasionar. O estudo foi elaborado por meio da caracterização química e avaliação do potencial tóxico de diferentes concentrações dos dois efluentes, nos modelos vegetais *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. Em ambos os modelos, 30 sementes foram germinadas em placas de Petri com papel filtro umedecido com os diferentes tratamentos cujas diluições foram feitas a partir dos efluentes puros (C1), e diluições dos efluentes: 50% (C2), 25% (C3), 12,5% (C4), 6,25% (C5), 3,12% (C6), 0,78% (C7) e 0,39% (C8). A exposição persistiu por 48 horas para o *L. sativa* e 96 horas para *A. cepa*, de acordo com ciclo celular de cada espécie, a 24°C. Como controle negativo foi utilizado água destilada e como controle positivo trifluralina (0,84 gL<sup>-1</sup>). Foram realizadas análises de germinação (GR), crescimento radicular (CR), avaliação do potencial citogenotóxico por meio da análise de ciclo celular e avaliação do estresse oxidativo (EO) por meio da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione s-transferase e quantificação da glutathione reduzida e peroxidação de lipídios. Os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilks verificar a normalidade dos dados, em seguida a análise de variância ANOVA e utilizou-se o teste de Kruskal Wallis ( $P < 0,05$ ), a fim de comparar as médias encontradas entre os tratamentos. Os resultados da análise química demonstraram altos valores de Cobre, Ferro, Manganês e Zinco, acima dos valores estabelecidos pelo CONAMA 430/2011 para efluentes. As diluições (C1, C2, C3 EB) e (C1 e C2 LE) inibiram a germinação de *L. sativa* e *A. cepa*, além de reduzir o CR de outras concentrações. O índice mitótico apresentou redução em C5 (EB), C6 e C7 (LE) de *L. sativa* e C3 e C4 (LE) de *A. cepa*, com relação ao CN. E maiores frequências de alterações cromossômicas foram observadas nos tratamentos de maiores concentrações de EB e LE em ambos modelos. Com relação ao EO, apenas algumas concentrações do tratamento LE, modelo *A. cepa* apresentaram diferença estatística em relação ao CN. Diante dos parâmetros analisados, concluiu-se que os danos observados podem ter relação com os metais pesados encontrados nas amostras estudadas.

**Palavras-chave:** Lagoa de estabilização • metais • fitotoxicidade • biomarcadores bioquímicos • biodigestor.

## ABSTRACT

Pig farming is an important agricultural activity in terms of food, and in the economy of Brazil and the world. The fact that this activity produces residues with a high load of organic matter and metals, makes it recognized as an activity with great polluting potential. The objective of this work was to investigate the possible environmental risks that raw (EB) and stabilization pond (LE) effluents from the biodigestion process of swine effluents can cause. The study was carried out through the chemical characterization and evaluation of the toxic potential of different concentrations of the two effluents, in the plant models *Lactuca sativa* and *Allium cepa*. In both models, 30 seeds were germinated in Petri dishes with filter paper moistened with the different treatments whose dilutions were made from pure effluents (C1), and effluent dilutions: 50% (C2), 25% (C3), 12.5% (C4), 6.25% (C5), 3.12% (C6), 0.78% (C7) and 0.39% (C8). Exposure persisted for 48 hours for *L. sativa* and 96 hours for *A. cepa*, according to the cell cycle of each species, at 24°C. As a negative control, distilled water was used and as a positive control trifluralin (0.84 gL<sup>-1</sup>). Germination (GR), root growth (CR), evaluation of cytogenotoxic potential through cell cycle analysis and evaluation of oxidative stress (EO) through the activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase, glutathione s-transferase and quantification of reduced glutathione and lipid peroxidation. The data were submitted to the Shapiro-Wilks test to verify the normality of the data, then the ANOVA analysis of variance and the Kruskal Wallis test ( $P < 0.05$ ) in order to compare the means found between treatments. The results of the chemical analysis showed high values of Copper, Iron, Manganese and Zinc, above the values established by CONAMA 430/2011 for effluents. The dilutions (C1, C2, C3 EB) and (C1 and C2 LE) inhibited the germination of *L. sativa* and *A. cepa*, in addition to reducing the CR of other concentrations. The mitotic index showed a reduction in C5 (EB), C6 and C7 (LE) of *L. sativa* and C3 and C4 (LE) of *A. cepa*, in relation to CN. And higher frequencies of chromosomal alterations were observed in treatments with higher concentrations of EB and LE in both models. Regarding the EO, only some concentrations of the LE treatment, model *A. cepa* showed statistical difference in relation to the CN. Given the parameters analyzed, it is concluded that the damage observed may be related to the heavy metals found in the samples studied.

**Keywords:** Stabilization pond • metals • phytotoxicity • biochemical biomarkers • biodigester

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca mundialmente na produção de carne suína, sendo o quarto maior produtor do mundo (ABPA, 2018). Apesar da sua grande importância econômica, a suinocultura é considerada pelos órgãos ambientais como a atividade agropecuária com os maiores impactos ambientais (RIZZONI *et al.*, 2012). Um dos principais impactos se deve ao alto consumo de água no processo produtivo, cerca de 72,9 litros de água por dia para cada animal (FATMA, 2014). Além desse agravante, a suinocultura é reconhecida como atividade de grande potencial poluidor em razão de gerar efluentes, geralmente, na forma líquida com elevada quantidade de matéria orgânica, nutrientes e metais pesados como Cu e Zn (STEINMETZ *et al.*, 2009). A concentração destes poluentes varia de acordo com o sistema de manejo adotado (KUNZ; OLIVEIRA, 2006; PERDOMO *et al.*, 2004).

O desenvolvimento tecnológico proporcionou a criação de tecnologias que podem ajudar a mitigar os impactos gerados pelos resíduos da suinocultura (BNDES, 2016). Uma dessas alternativas é a biodigestão na qual todos os resíduos gerados pela granja (água, fezes, urina e ração) passam por um biodigestor, onde ocorre o processo de fermentação anaeróbica da biomassa, gerando, ao final, o biogás e um efluente bruto (biofertilizante) que, posteriormente, são alocados em lagos de estabilização (BARBOSA; LANGER, 2011; RIZZONI *et al.*, 2012). Apesar de diminuir a contaminação do solo, do ar e da água, reduzindo a proliferação de pragas, e de doenças causadas por carência de saneamento básico, o efluente bruto, considerado o produto final da biodigestão, permanece com teores de nutrientes iguais ou até maiores que o material antes do processo de biodigestão (BARBOSA; LANGER, 2011).

Embora ocorra a minimização dos impactos, os efluentes da biodigestão, podem causar sérios problemas ambientais, principalmente a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, devido ao descarte irregular em rios e lagos, ou até mesmo pelo lixiviamento de solos adubados com os efluentes, alterando a composição química, física e inclusive as características biológicas, ocasionando prejuízos ao ambiente (PERDOMO *et al.*, 2004; KUNZ *et al.*, 2006; BARBOSA; LANGER, 2011).

Como ferramenta para complementar as análises físico-químicas de poluentes ambientais, destaca-se o uso de ensaios biológicos com organismos modelos que atuam como sistemas bioindicadores de poluição e toxicidade

(BADERNA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2003). Dentre os organismos teste, os modelos vegetais, apresentam diversas vantagens como baixo custo, rápida resposta ao teste e a sensibilidade aos poluentes (FISKEJÖ, 1985), bem como monitorar o risco tóxico para análises de toxicidade e bioindicação de poluentes ambientes, como resíduos industriais, agrotóxicos e metais pesados (SILVEIRA *et al.*, 2017).

Os modelos vegetais, alface (*Lactuca sativa* L.) e a cebola (*Allium cepa* L.), são utilizados como indicador de agentes mutagênicos devido suas características, de baixo custo e a boa correlação com outros sistemas teste (ARAGÃO *et al.*, 2019; LEME; BERNARDES *et al.*, 2019; MARIN-MORALES, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2017).

O objetivo deste trabalho foi averiguar os possíveis riscos ambientais que os efluentes bruto e da lagoa de estabilização, provenientes do processo de biodigestão dos efluentes da suinocultura, podem ocasionar ao meio ambiente. Para tanto, foram realizadas a caracterização química e avaliado seu potencial tóxico por meio de testes de fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e biomarcadores bioquímicos de diferentes concentrações dos dois efluentes, nos modelos vegetais *A. cepa* e *L. sativa*.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### *2.1 Coleta e processamento dos Efluentes*

O trabalho foi desenvolvido com efluentes oriundos da produção de uma granja de suínos, especificamente, resíduos que são provenientes do biodigestor. O material analisado foi cedido por uma granja localizada no município de Santa Teresa, interior do estado do Espírito Santo. Foram coletados dois efluentes da produção: o resíduo líquido que é liberado após o processo de biodigestão, denominado no trabalho como efluente Bruto (EB); e amostras da lagoa de estabilização (LE) onde o resíduo produzido pelo biodigestor é armazenado. Amostra brutas de ambos os efluentes foram armazenados para análises físico-químicas. Para as demais metodologias foram realizadas diluições com água deionizada, com o intuito de avaliar as respostas dos modelos vegetais. O ponto de partida das diluições foram os efluentes puros (C1) que sofreram sucessivas

reduções na quantidade de efluente: 50% (C2), 25% (C3), 12,5% (C4), 6,25% (C5), 3,12% (C6), 0,78% (C7) e 0,39% (C8).

## 2.2 Caracterização Química

A análise de sólidos foi realizada conforme Matos (2012) onde as amostras foram colocadas em cadinhos previamente pesados, com 15 mL dos dois efluentes (EB e LE). Os mesmos foram levados a estufa a 105 °C e permaneceram até a evaporação de todo líquido (over night). Em seguida, foram resfriados até alcançarem temperatura ambiente e pesados novamente. Posteriormente foram calcinados em mufla a 550 °C por 30 minutos, repetindo-se o processo de resfriamento e pesagem com intuito de obter os resultados de sólidos totais, fixos e voláteis.

Para os elementos traços, os efluentes foram armazenados em frascos de polietileno, antecipadamente higienizados. Inicialmente as amostras possuíam pH na faixa de 8,64 de EB e LE, ainda em campo as amostras foram acidificadas com ácido nítrico P.A., alcançando um pH < 2.

As amostras foram submetidas ao procedimento baseado no método U.S. EPA 200.8. A análise foi realizada pela técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, por meio de dois equipamentos, o ICP OES da Thermo Scientific modelo iCAP6000 e ICP MS em aparelho Nexlon 300 D (Perkin Elmer). Os elementos quantificados foram: Arsênio (As), Bário (Ba), Boro (B), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Enxofre (S), Estanho (Sn), Ferro (Fe), Fósforo (P), Magnésio (Mg), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg), Níquel (Ni), Potássio (K), Prata (Ag), Selênio (Se), Sódio (Na) e Zinco (Zn).

## 2.3 Crescimento e germinação

Os modelos vegetais utilizados no estudo foram *Lactuca sativa* L. (Alface) variedade Mimososa green salad bowl (Feltrin) e *Allium cepa* L. (cebola) variedade Baia periforme (Topseed). Os experimentos foram montados em Delineamento Inteiramente Casualizado, consistindo-se de 5 placas de Petri por tratamento, sendo cada placa com 30 sementes. Em ambos modelos testados, as sementes foram germinadas em placas de Petri com papel filtro umedecido com as oito diluições dos dois efluentes. A exposição persistiu por 48 horas para o *L. sativa* e 96 horas para *A. cepa*, ambas mantidas a 24°C com ausência de luz. Ao fim do

tempo foi estimado a porcentagem de germinação por meio da contagem das sementes com protrusão de raiz e em seguida para análise do crescimento radicular, realizou-se a medição das raízes com o auxílio de paquímetro digital (mm). Como controle negativo foi utilizado água destilada e como controle positivo trifluralina ( $0,84 \text{ gL}^{-1}$ ).

#### 2.4 Análises do ciclo celular

Ao término da avaliação do crescimento radicular, as raízes utilizadas anteriormente foram fixadas em fixador Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético), por no mínimo 24 horas. Para o preparo das lâminas, as raízes foram lavadas com água deionizada, três vezes por cinco minutos, e submetidas a uma reação de hidrólise ácida (HCl 1M) a  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 9 minutos. A hidrólise foi interrompida com água deionizada e as raízes coradas em Reativo de Schiff por uma hora, em ausência de luz.

Após a coloração, as lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento utilizando ácido acético 45%, sendo posteriormente retiradas por congelamento em nitrogênio líquido, finalizadas com bálsamo do Canadá e cobertas com lamínulas.

Foram avaliadas 1000 células por lâminas, considerando cinco lâminas por tratamento, totalizando 5000 células, conforme descrito por Aragão *et al.* (2015). Foram consideradas as seguintes variáveis: índice mitótico (IM), a porcentagem de cada fase da mitose, frequência de alterações cromossômicas (AC%), e porcentagem de alterações nucleares (AN%). Levando em consideração cromossomos perdidos, quebrados, aderentes, pontes, c-metáfases e núcleos condensados, como alterações.

#### 2.5 Análises de Biomarcadores Bioquímicos

A análise de biomarcadores bioquímicos foi realizada por meio da quantificação de proteínas totais, enzimas ativadas pela produção de espécies reativas de oxigênio (CAT, SOD e GST), concentração da glutathiona reduzida (GSH) e taxa de peroxidação lipídica (LPO). A germinação do material vegetal ocorreu conforme descrito no tópico 2.3 e foram utilizadas nas análises ambos modelos vegetais para os dois efluentes. Para quantificação de proteínas totais, o método de Bradford (1976) foi utilizado, contudo adaptado para microplaca, onde 2

$\mu\text{L}$  do homogeneizado foi adicionado em 240  $\mu\text{L}$  de Coomassie Blue. A leitura das amostras foi realizada com absorvância a  $\lambda = 595 \text{ nm}$ , utilizando-se a albumina de soro bovino como proteína padrão.

### 2.5.1 Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada por espectrofotometria, seguindo o protocolo de McCord e Fridovich (1969), que analisa o radical superóxido gerado por meio do sistema xantina/xantina oxidase e a redução do citocromo *c*. O extrato foi preparado por meio da maceração de 0,3 g de amostra vegetal (raiz), solubilizando-as em 900  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) a 1 mM. As amostras foram homogeneizadas (ULTRA- TURRAXR, IKA) e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a uma temperatura de 4°C. Ao término, o sobrenadante foi retirado para a realização das análises.

A reação foi realizada em microplacas, onde em cada poço foram adicionadas 5  $\mu\text{L}$  do sobrenadante com 285  $\mu\text{L}$  de meio de reação (Xantina 50  $\mu\text{M}$ , KCN 20  $\mu\text{M}$ , Citocromo *c* 10  $\mu\text{M}$ , EDTA 100  $\mu\text{M}$ ). Para o branco, utilizou-se 5  $\mu\text{L}$  de meio de reação. As leituras foram realizadas por um minuto, com intervalos de 15 segundos, em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation). A partir da leitura do branco, determinou-se o volume de xantina oxidase, incidindo em uma leitura a cada sete amostras. Os resultados foram apresentados por unidade de SOD, portanto uma unidade de SOD corresponde a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do citocromo *c*, por minuto, por mg de proteína a 25°C e pH 7,8.

### 2.5.2 Atividade da enzima Catalase (CAT)

Para preparar o extrato, foi utilizado 0,2g de amostra vegetal (raiz) juntamente com 600  $\mu\text{L}$  de solução tampão de homogeneização (Tris-base 20 mM, EDTA 1mM, Sacarose 0,5 M e Ditioneitol - DTT 1 mM) com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) a 1 mM. Em seguida, foi centrifugado a 9000 rpm a 4°C, por 30 minutos. Ao término, o sobrenadante foi retirado para a realização das análises posteriores (CAT, GST, GSH e LPO).

A atividade da catalase (CAT) foi analisada por meio do método descrito por Beutler (1975), no qual a decomposição enzimática de peróxido de hidrogênio é

mensurada pelo decaimento da absorvância a 240 nm. A reação foi realizada em microplaca, composta por 15  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e 245  $\mu\text{L}$  de meio de reação (45  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 47 mL de água destilada e 2,5 mL de tampão de reação -Tris-base 1 M, EDTA 5 mM). A leitura foi efetuada em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation), durante dois minutos, com intervalos de 15 segundos. Os resultados foram expressos em  $\text{nmol mg}^{-1}$  de proteína  $\text{min}^{-1}$ .

### 2.5.3 Atividade da Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da Glutathione S-transferase (GST) foi realizada conforme metodologia descrita por Habig e Jakoby (1981) com modificações realizadas por Gallagher et al. (1992) que consiste na unidade da atividade da enzima como a relação da taxa inicial da reação, com o valor do coeficiente de extinção molar para o 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene Solution (CDNB) de  $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , com valor de absorvância a 340 nm. Em microplaca foram incorporados 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante a 235  $\mu\text{L}$  de meio de reação (tampão fosfato e CDBN 0,05 M) e 10  $\mu\text{L}$  de GSH a 25 mM. Como branco foi utilizado 15  $\mu\text{L}$  de tampão de homogeneização. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation), por quatro minutos, com intervalos de 30 segundos.

### 2.5.4 Quantificação da Glutathione Reduzida (GSH)

A concentração de glutathione reduzida (GSH) foi quantificada conforme metodologias descritas por White et al. (2003) e Gallagher et al. (1992). A avaliação da concentração de GSH foi realizada mediante a separação dos dipeptídeos, por meio de centrifugação e seguido de reação dos complexos dipeptídicos com o 2,3 naftalenedicarboxialdeído (NDA), na qual origina um complexo fluorescente que foi medido a 528 nm após excitação a 472 nm.

As reações foram compostas por 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e 20  $\mu\text{L}$  de ácido sulfosalicílico (200 mM), e acondicionadas em microplacas de centrifugação, onde permaneceram incubados por 20 minutos. Ao fim do tempo de incubação, a placa foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos. Foram transferidos 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante para microplaca branca e adicionados 180  $\mu\text{L}$  de solução fluorescente (Trisbase 50 mM, NaOH 500 mM e 2,3-naftalenedicarboxialdeído-NDA 10 mM) e mesma foi incubada por 30 minutos. Para o branco, utilizou-se 20  $\mu\text{L}$  de tampão de homogeneização. Para a constituição de uma curva padrão,

utilizou-se diferentes diluições de GSH (40, 20, 10, 5 e 2,5 nM). Com a leitura realizada em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation). A concentração de GSH foi expressa  $\mu\text{M}$  por mg de proteína.

#### 2.5.5 Taxa de Peroxidação de Lipídios (LPO)

A avaliação da taxa de peroxidação lipídica (LPO) foi embasada no método de FOX (Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method), descrito por Jiang *et al.* (1991, 1992). Este se baseia rápida oxidação do  $\text{Fe}^{+2}$  intermediada por peróxidos em condições ácidas, e conseqüentemente a formação do complexo  $\text{Fe}^{+3}$ -laranja de xilenol, mediante o estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve luz a 550-570 nm. A leitura foi feita em microplaca, onde foi disposto 100 $\mu\text{L}$  do sobrenadante, 240  $\mu\text{L}$  de meio de reação e 15  $\mu\text{L}$  de PBS. Para o branco foram adicionados 60  $\mu\text{L}$  de tampão de homogeneização. A leitura foi realizada em espectrofotometro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation).

#### 2.6 Análises estatística

Os resultados obtidos para os dois modelos vegetais, *L. sativa* e *A. cepa*, foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão. Com a finalidade de verificar a normalidade dos dados foi utilizado o teste Shapiro-Wilks, em seguida realizada a análise de variância ANOVA e utilizado o teste de Kruskal Wallis ( $P < 0,05$ ), a fim de comparar as médias dos tratamentos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização Química

Os resultados dos parâmetros químicos para as duas amostras avaliadas (EB e LE) estão representados na Tabela 1 na qual os mesmos são comparados com os valores permitidos pela resolução CONAMA 430/2011 que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Destaca-se os elementos cobre (Cu), enxofre (S), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) que, neste trabalho, apresentaram valores acima do permitido pela legislação sobretudo nas amostras do EB. Esses resultados são condizentes com outros trabalhos que relatam a presença de metais pesados em efluentes de suinocultura (HUANG *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2019; MENEGHETTI *et al.*, 2012; PASSARIN *et al.*, 2016), bem como

a elevada carga de cobre e zinco, devido a suplementação comumente feita na ração disponibilizada aos animais (MENG *et al.*, 2017; ROSA *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2013). A presença desses metais nas amostras se dá pela dificuldade de remover os metais pesados no processo de digestão anaeróbica (WU *et al.*, 2017).

Os elementos fósforo (P), magnésio (Mg), potássio (K) e sódio (Na), não possuem padrões regulamentados por meio do CONAMA. Apesar de não haver padrões da agência fiscalizadora, é evidente a necessidade de avaliar os riscos desses elementos ao ambiente. Os problemas devido ao acúmulo desses elementos no ambiente vêm sendo relatados, como o fósforo que está diretamente relacionado com o processo de eutrofização quando lixiviado para corpos d'água (GLEBER *et al.*, 2014).

Por meio da avaliação dos sólidos foi possível averiguar uma alta carga de matéria orgânica, representado pelos sólidos voláteis (Tabela 1). A matéria orgânica em si é importante para a agricultura, pois atua diretamente, melhorando as características físicas e químicas do solo, caracterizando o aumentando dos valores de pH, diminuição da densidade aparente, elevação da microporosidade do solo, bem como elevando a taxa de infiltração e armazenamento de água (LUCAS, 2011; SEDIYAMA *et al.*, 2000). Porém, existe os problemas relacionados a essa elevada carga de matéria orgânica na suinocultura, principalmente quando relacionado ao cobre e zinco, devido à sua forte adsorção em função do pH elevado e que, conseqüentemente, são retidos pela matéria orgânica (RAIJ, 1996; RAMACHANDRAN; D'SOUZA, 1998). Apesar de haver a fixação desses elementos na fração orgânica do solo, o pH interfere na disponibilidade dos nutrientes para as raízes das plantas, onde a maior disponibilidade de cobre e zinco é geralmente em torno de 5,5 a 6,5 (TAIZ *et al.*, 2017).

Foi observado diminuição na quantificação de alguns elementos (Cu, S, Fe, P, Mg, Mn, K, Na e Zn) e dos teores de sólidos no efluente da lagoa de estabilização quando comparado com os valores observados no efluente bruto. Possivelmente, devido às características funcionais de uma lagoa de estabilização que funciona como reservatório de águas residuais por um longo tempo com o objetivo de diminuir a carga de matéria orgânica, nutrientes e patógenos, devido à interação de microrganismos e plantas aquáticas, pois essas promovem a modificação química do ambiente aquático (CORDERO, 2016; GRAY, 2004; MAHMOOD *et al.*, 2013). Li *et al.* (2019) relatam que o uso de lagoas de estabilização em associação a

biofiltros possibilitaram a diminuição da concentração de nitrogênio e fósforo, derivados de efluentes da suinocultura.

Tabela 1: Caracterização química dos efluentes bruto e da lagoa de estabilização, provenientes do biodigestor de suinocultura.

<b>Parâmetros Inorgânicos</b>	<b>Efluente Bruto</b>	<b>Lagoa de estabilização</b>	<b>Valores máximos permitidos CONAMA 430/2011</b>
Arsênio (As)	0,0015 mg/L	<LQ	0,5 mg/L
Bário (Ba)	0,3019 mg/L	0,0508 mg/L	5 mg/L
Boro (B)	1,1104 mg/L	1,0314 mg/L	5 mg/L
Cádmio (Cd)	0,0015 mg/L	<LQ	0,2 mg/L
Chumbo (Pb)	0,0202 mg/L	<LQ	0,5 mg/L
Cobre (Cu)	5,8688 mg/L	0,5876 mg/L	1 mg/L
Cromo (Cr)	0,030 mg/L	<LQ	1mg/L
Enxofre (S)	45,8780 mg/L	19,5633 mg/L	1 mg/L
Estanho (Sn)	<LQ	<LQ	4 mg/L
Ferro (Fe)	29,7273 mg/L	2,2563 mg/L	15 mg/L
Fósforo (P)	209,1 mg/L	20,736 mg/L	-
Magnésio (Mg)	134,9397 mg/L	9,1040 mg/L	-
Manganês (Mn)	3,3049 mg/L	0,3369 mg/L	1 mg/L
Mercúrio (Hg)	<LQ	<LQ	0,01 mg/L
Níquel (Ni)	0,07110 mg/L	0,0454 mg/L	2 mg/L
Potássio (K)	1175,00 mg/L	670,17 mg/L	-
Prata (Ag)	<LQ	<LQ	0,1 mg/L
Selênio (Se)	0,02506 mg/L	<LQ	0,30 mg/L
Sódio (Na)	285,51 mg/L	237,02 mg/L	-
Zinco (Zn)	15,9013 mg/L	1,8299 mg/L	5 mg/L
<b>Sólidos</b>			
Sólidos Totais	10876,67 mg/L	5677,78 mg/L	-
Sólidos Fixos	6524,44 mg/L	3764,44 mg/L	-
Sólidos Voláteis	4322,22 mg/L	1913,33 mg/L	-

<LQ: menor que o limite de quantificação.

### 3.2 Crescimento e germinação

O potencial fitotóxico foi observado com a inibição da germinação e redução do crescimento das raízes em relação com controle negativo, nas maiores concentrações dos efluentes bruto e da lagoa de estabilização em ambos modelos

vegetais. Em *L. sativa*, ocorreu a inibição da germinação nas concentrações C1, C2 e C3 em tratamentos com o efluente bruto, e apenas C1 e C2 para o efluente da lagoa de estabilização. Foi observada uma redução da germinação em C4 (EB) e C3 (LE) (Figura 1). O modelo *A. cepa* apresentou inibição da germinação nas concentrações C1, C2 e C3 (EB), enquanto nos tratamentos com LE apenas as concentrações C1 e C2 apresentaram inibição da germinação (Figura 1).

O potencial fitotóxico reduziu com o aumento das diluições e foi possível observar que apenas as concentrações C4 e C5 (EB), C3 e C4 (LE) em *L. sativa* apresentou diminuição significativa no crescimento das raízes (Figura 1). Assim como em *A. cepa*, foi evidenciado uma redução significativa no crescimento radicular, nas concentrações C4 (EB) e C3 (LE) em relação ao controle negativo (Figura 1).

Os resultados observados sugerem que a inibição da germinação e crescimento radicular em ambos tratamentos podem estar relacionados com a presença de metais pesados nas amostras. A fitotoxicidade dos metais pesados em plantas foi evidenciada por outros autores, em plantas como *Lactuca sativa* (GABUR-GONZÁLES *et al.*, 2010), *Allium cepa* (RESENDE, 2018), *Phaseolus vulgaris* (LEITE; ZAMPIERON, 2012) e *Passiflora alata* (FREITAS, 2016).

A toxicidade dos metais sobre as plantas é mensurada em diferentes intensidades, que podem variar da espécie e órgão, ou tecido da planta, bem como o tipo de metal, a concentração dos mesmos e o ambiente na qual a planta é exposta ao metal, variando as condições de pH e solo (BENAVIDES *et al.*, 2005; NAGAJYOTI *et al.*, 2010). Desse modo, é necessário conhecer os riscos dos metais ao meio ambiente, levando em conta que as plantas podem absorver e acumular os metais, em folhas e frutos, intensificando as mudanças fisiológicas e morfológicas (FREITAS, 2016).

A fitotoxicidade observada também pode estar relacionada com a quantidade de sódio (Na) encontrado nos efluentes que, possivelmente, proporciona a fitotoxicidade, principalmente quando se observa a evidente inibição na germinação das sementes em ambos modelos e nas diluições onde a concentração dos efluentes é maior. Altas concentrações de sais ocasionam o estresse osmótico, causando desnaturação de proteínas e desestabilização de membranas por meio da redução da hidratação dessas moléculas. Isso, conseqüentemente, pode afetar diretamente a germinação das sementes,

impedindo o desenvolvimento do embrião (LIMA; TORRES, 2009; TAIZ *et al.*, 2017).

Desse modo, destaca-se a atuação conjunta, pois o estresse por salinidade provoca efeitos iônicos específicos resultando na acumulação de íons que alteram a absorção de nutrientes, derivando a citotoxicidade (MUNNS; TESTER, 2008; TAIZ *et al.*, 2017). Segundo Taiz *et al.* (2017), o  $\text{Na}^+$  desloca o  $\text{Ca}^{2+}$  de sítios na parede celular, reduzindo a atividade do  $\text{Ca}^{2+}$  no apoplasto, aumentando o influxo de  $\text{Na}^+$ . Essa redução de  $\text{Ca}^{2+}$  no apoplasto, resulta em uma diminuição de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, essencial para desintoxicação celular e, por consequência, o acúmulo evidente de elementos traços potencialmente tóxicos, como Fe, Zn, Cu, Cd, Ni e As (TAIZ *et al.*, 2017).

### 3.3 Análises do Ciclo celular

Foi possível observar em *L. sativa*, que os dois efluentes interferiram no índice mitótico das células. Nas concentrações C5 (EB), C6 e C7 (LE), foi observado uma diminuição significativa em relação ao observado no controle negativo. Não houve diferença quando observado as fases da mitose. Em relação alterações cromossômicas, houve aumento significativo na porcentagem de alterações nas concentrações C5 e C6 (EB), e todas as concentrações da lagoa de estabilização, com exceção da C8, quando comparadas ao controle negativo. Assim, foi possível notar uma diminuição das alterações com o aumento da diluição dos efluentes (Tabela 2).

*A. cepa* apresentou uma redução significativa no índice mitótico apenas nas concentrações C3 e C4 do efluente da lagoa de estabilização. A fase mitótica prófase apresentou diferença apenas nas concentrações C6 e C8 do efluente bruto, e na concentração C7 da lagoa de estabilização, assim como na anáfase, na qual o aumento ocorreu somente na concentração C3 (LE) (Tabela 3). As alterações cromossômicas foram evidenciadas nas duas maiores concentrações onde houve germinação (C5 e C6) nos tratamentos com o efluente bruto, enquanto, na lagoa de estabilização, as diluições que foram significativamente diferentes ao controle negativo, foram C4 e C6.

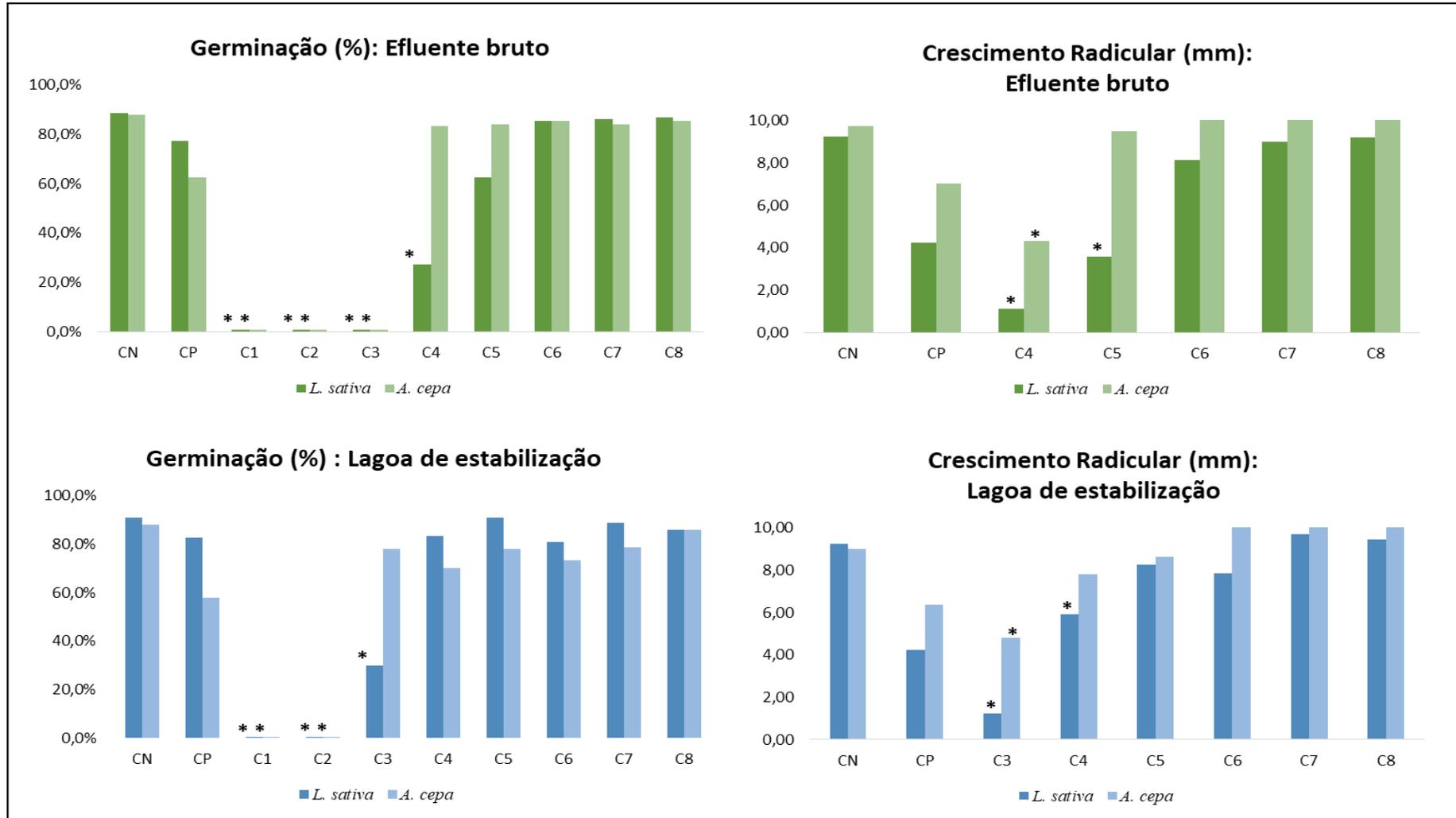


Figura 1: Germinação e crescimento radicular de *L. sativa* e *A. cepa* em diferentes diluições das amostras do biodigestor de suinocultura. As médias seguidas de (\*) diferem estatisticamente do controle negativo a 5% de significância.

O índice mitótico, que é a verificação da atividade de divisão celular do tecido meristemático, atua como fator que influencia diretamente no crescimento das raízes (HARASHIMA; SCHNITTGER, 2010). A redução do crescimento radicular, observado no trabalho, pode estar associada à diminuição do índice mitótico.

Segundo Salehzadeh *et al.* (2003), a fase de síntese de DNA (S) e o ponto de checagem G2 são facilmente alteradas por substâncias químicas que promovem a produção de radicais livres, o que pode causar danos ao DNA e proteínas. As alterações nas fases da mitose podem ocorrer devido aumento ou diminuição da duração delas, muitas vezes causadas pelo acúmulo de danos, consequência de modificações em proteínas específicas que controlam a transição do ciclo celular (RAHMAN *et al.*, 2013; ROY *et al.*, 2006).

Ambos modelos vegetais, apresentaram-se sensíveis na avaliação de alterações cromossômicas, evidenciando uma possível ação aneugênica dos efluentes, devido ao alto índice de alterações do tipo cromossomo aderentes e c-metáfase (Figura 2). Segundo Palmieri *et al.* (2014), as alterações cromossômicas e nucleares são prejudiciais à célula, podendo desencadear o processo de morte celular.

As aderências cromossômicas são mencionadas por Fiskesjo (1997) como resultantes de alterações na porção proteica da cromatina que ocasionam lesões no aparelho mitótico do fuso (VENTURA-CAMARGO *et al.*, 2011). A interrupção na polimerização do fuso mitótico pode ocasionar uma ligação entre os cromossomos e o fuso, impedindo a movimentação para os polos, induzindo as perdas cromossômicas (SHAMINA *et al.*, 2003), considerada uma anormalidade irreversível (FISKESJO, 1988).

Em relação a avaliação de alterações nucleares, apenas o modelo vegetal *A. cepa* foi sensível, ao ponto de apresentar uma diferença significativa na concentração C3 do tratamento com o efluente da lagoa de estabilização em relação ao controle negativo. Esse tipo de alteração é caracterizado por alterações morfológicas do núcleo interfásico, muitas vezes, consequência da ação tóxica de compostos químicos. Sendo de grande importância a avaliação juntamente com as alterações cromossômicas, tornando a análise em relação aos danos causados no DNA de organismos teste, mais precisa e assertiva (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Tabela 2: Alterações no ciclo celular em células meristemáticas de *L. sativa* exposta a diferentes diluições do resíduo bruto e lagoa de estabilização.

Concentrações	Índice mitótico (IM %)	Prófase (%)	Metáfase (%)	Anáfase (%)	Telófase (%)	Alterações Cromossômicas (%)	Alterações Nucleares (%)
CN	10,60 ± 1,21 bcd	55,40 ± 3,89 bc	26,25 ± 8,18 ab	14,10 ± 8,70 bc	10,96 ± 3,49 b	1,02 ± 0,77 a	0 ± 0 a
CP	17,46 ± 1,10 d	31,60 ± 3,27 a	80,52 ± 4,17 c	0,47 ± 0,76 a	1,92 ± 2,29 a	79,63 ± 4,19 d	0,12 ± 0,18 a
C5 EB	7,78 ± 1,03 a	62,32 ± 6,49 c	20,89 ± 1,72 a	6,34 ± 3,55 ab	11,51 ± 5,70 b	10,30 ± 3,94 cd	0,02 ± 0,04 a
C6 EB	10,62 ± 0,96 cd	48,94 ± 5,78 b	31,67 ± 5,09 bc	12,76 ± 2,15 bc	9,59 ± 1,68 b	8,54 ± 2,61 bcd	0,02 ± 0,04 a
C7 EB	8,40 ± 1,06 ab	46,37 ± 1,86 ab	31,40 ± 2,17 b	14,64 ± 2,75 c	8,77 ± 5,53 b	5,72 ± 3,25 abc	0 ± 0 a
C8 EB	9,04 ± 1,61 abc	46,61 ± 2,56 ab	30,03 ± 3,72 b	16,42 ± 4,78 c	8,77 ± 4,40 b	2,49 ± 0,62 ab	0 ± 0 a
CN	9,62 ± 0,48 bcd	51,41 ± 3,19 b	31,98 ± 2,63 a	9,78 ± 1,67 a	9,04 ± 2,29 a	0,62 ± 0,57 a	0 ± 0 a
CP	14,92 ± 3,06 d	13,19 ± 8,49 a	79,12 ± 11,77 b	5,45 ± 3,21 a	4,38 ± 2,63 a	72,78 ± 12,58 d	0 ± 0 a
C4 LE	10,06 ± 0,86 cd	45,7 ± 2,66 ab	33,75 ± 1,40 ab	12,92 ± 2,64 a	10,41 ± 2,49 a	10,18 ± 2,44 cd	0 ± 0 a
C5 LE	8,6 ± 0,64 abc	51,74 ± 6,90 b	30,98 ± 4,02 a	12,52 ± 4,17 a	5,75 ± 3,55 a	7,30 ± 2,43 bc	0 ± 0 a
C6 LE	8,04 ± 0,92 a	52,37 ± 7,33 b	30,49 ± 7,42 a	11,52 ± 3,08 a	6,03 ± 2,08 a	7,42 ± 2,73 bc	0 ± 0 a
C7 LE	7,74 ± 0,83 a	49,03 ± 7,62 b	34,37 ± 8,37 a	11,12 ± 2,19 a	6,03 ± 4,06 a	6,80 ± 1,37 bc	0 ± 0 a
C8 LE	8,36 ± 1,17 ab	53,22 ± 5,44 b	29,25 ± 2,83 a	11,13 ± 4,61 a	7,12 ± 1,50 a	5,44 ± 1,66 ab	0 ± 0 a

As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste Kruskal Wallis. CN: controle negativo; CP: controle positivo.

Tabela 3. Alterações no ciclo celular em células meristemáticas de *A. cepa* exposta a diferentes diluições do efluente bruto e lagoa de estabilização.

Concentrações	Índice mitótico (IM %)	Prófase (%)	Metáfase (%)	Anáfase (%)	Telófase (%)	Alterações Cromossômicas (%)	Alterações Nucleares (%)
CN	9,14 ± 1,28 b	56,08 ± 5,26 b	18,1 ± 3,88 a	17,74 ± 4,76 a	10,41 ± 6,02 a	0,67 ± 0,62 a	0 ± 0 a
CP	5,19 ± 1,83 a	45,62 ± 5,94 a	32,82 ± 8,56 c	11,68 ± 2,86 a	7,67 ± 5,00 a	34,61 ± 16,02 c	0 ± 0 a
C5 EB	7,98 ± 1,14 b	49,49 ± 7,81 ab	21,70 ± 6,36 ab	17,85 ± 6,49 a	12,05 ± 3,55 a	12,03 ± 4,20 bc	0,24 ± 0,53 a
C6 EB	8,04 ± 1,40 b	43,67 ± 7,06 a	26,49 ± 2,48 bc	19,92 ± 2,23 a	10,96 ± 5,22 a	10,68 ± 2,49 bc	0 ± 0 a
C7 EB	8,72 ± 1,14 b	49,46 ± 2,53 ab	23,56 ± 4,2 abc	18,93 ± 4,29 a	9,59 ± 5,03 a	4,00 ± 1,48 ab	0 ± 0 a
C8 EB	7,88 ± 0,90 b	46,98 ± 4,45 a	23,51 ± 4 abc	17,38 ± 4,81 a	12,88 ± 3,95 a	4,05 ± 0,92 ab	0 ± 0 a
CN	9,00 ± 0,80 c	50,53 ± 9,10 cd	22,91 ± 3,90 a	19,58 ± 8,58 bc	8,77 ± 4,60 a	0,65 ± 0,92 a	0 ± 0 a
CP	7,62 ± 0,87 abc	40,19 ± 1,29 ab	27,74 ± 5,51 a	20,62 ± 7,69 bc	12,05 ± 6,38 a	26,38 ± 8,11 d	0,24 ± 0,29 ab
C3 LE	2,40 ± 3,09 a	59,78 ± 39,64 d	12,26 ± 13,43 a	4,25 ± 5,92 a	2,74 ± 4,22 a	5,44 ± 5,34 abc	1,12 ± 0,74 b
C4 LE	7,38 ± 0,96 ab	50,09 ± 7,91 cd	22,11 ± 7,96 a	13,67 ± 2,11 ab	14,52 ± 5,00 a	12,63 ± 4,37 cd	0,04 ± 0,09 a
C5 LE	8,6 ± 1,93 bc	46,92 ± 6,4 bcd	20,09 ± 5,95 a	22,00 ± 7,16 c	12,88 ± 4,06 a	5,82 ± 1,94 abc	0 ± 0 a
C6 LE	7,58 ± 0,99 abc	39,10 ± 7,6 abc	29,30 ± 11,25 a	18,84 ± 6,03 bc	13,15 ± 3,3 a	8,60 ± 3,63 bcd	0 ± 0 a
C7 LE	7,74 ± 0,88 bcd	36,98 ± 5,08 a	28,05 ± 4,74 a	22,61 ± 6,00 c	13,15 ± 4,71 a	5,97 ± 1,23 abc	0 ± 0 a
C8 LE	7,82 ± 0,93 bcd	44,44 ± 7 abcd	26,21 ± 5,15 a	18,42 ± 4,72 bc	11,51 ± 3,15 a	4,05 ± 1,63 ab	0 ± 0 a

As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste Kruskal Wallis. CN: controle negativo; CP: controle positivo.

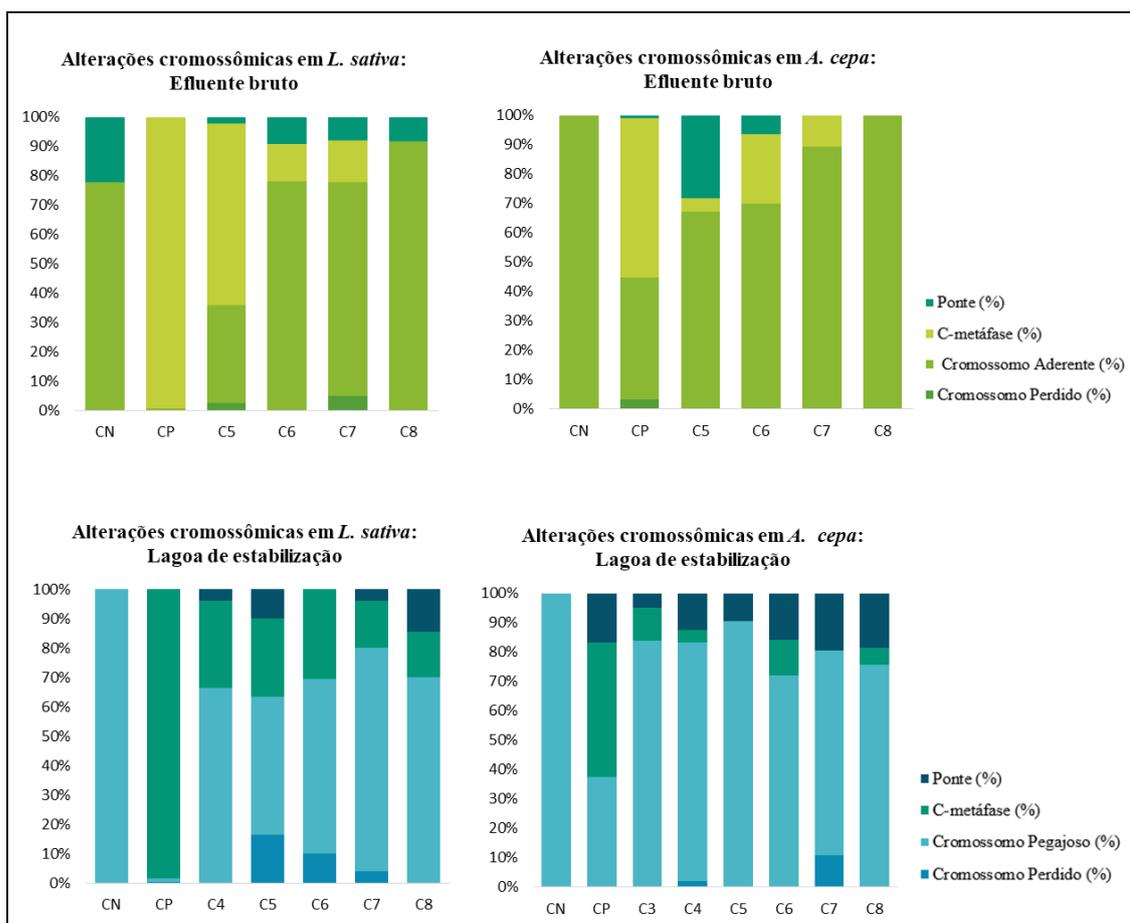


Figura 2: Frequência das alterações cromossômicas observadas em células de *L. sativa* e *A. cepa* expostas a diferentes diluições do resíduo bruto, em relação ao total de células em divisão analisadas.

Foi possível observar que o número das alterações cromossômicas e nucleares, bem como o índice mitótico, apresentaram alterações nos tratamentos com o efluente da lagoa de estabilização, porém essa toxicidade não foi relacionada com a concentração dos metais, mas aos níveis de estocagem, ou seja, suas formas de ligação a compostos ou tipos de partícula (BELADEL *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2015). A efetiva biodisponibilização depende de fatores ambientais como a composição iônica, mudanças de pH e a presença de matéria orgânica. Dessa forma, um metal pode apresentar concentração similar em amostras diferentes, apresentando toxicidade diferente, devido a biodisponibilidade do contaminantes (BEVILACQUA, 1996; SOUZA *et al.*, 2015).

### 3.4 Análises de Biomarcadores Bioquímicos

A análise do estresse oxidativo foi realizada indiretamente por meio da quantificação da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST), concentração da glutathiona reduzida (GSH) e taxa de peroxidação lipídica (LPO), para os dois modelos vegetais (tabela 4).

Os resultados obtidos para *L. sativa*, explanam que não houve diferença significativa nas raízes tratadas com o efluente bruto para nenhum biomarcador bioquímico. Contudo, os tratamentos realizados com o efluente da lagoa de estabilização, demonstram que, quando comparadas com o controle, a concentração de GSH foi maior nas concentrações C5 e C8, assim como a taxa de LPO nos tratamentos C7, diferindo significativamente ao controle.

*A. cepa* apresentou resultados semelhantes quando analisado os tratamentos com o efluente bruto, na qual nenhuma concentração apresentou diferença, nos biomarcadores bioquímicos avaliados, quando comparados com o controle negativo. Entretanto, nos tratamentos com o efluente da lagoa de estabilização, quando avaliado a atividade da SOD, observa-se maior atividade em relação ao controle negativo nas concentrações C3 e C4, assim como esse aumento na atividade também foi constatado nas diluições C4, C5 e C6 da GST. A concentração da GSH foi significativa nos tratamentos C5 e C8, notando-se um aumento da concentração da glutathiona reduzida. Apenas na atividade da CAT ocorreu uma redução significativa quando comparada ao controle negativo nas concentrações C3 e C7.

O metabolismo antioxidante atua no combate de espécies reativas de oxigênio (EROs) com um sistema complexo, formado principalmente por diversas enzimas. Assim, a produção de EROs ativa os sistemas de defesa das células, minimizando os danos oxidativos. As enzimas SOD e CAT são consideradas a primeira linha de defesa (BATISTA-GALLEP *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), onde a SOD inicia desmutando os radicais superóxidos ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Em seguida, ocorre a atuação da CAT que consiste em decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (BARREIROS; DAVID, 2006). As Glutathiona S-Transferases (GST) são enzimas com papel fundamental de proteção contra o estresse oxidativo, além de catalisar o ataque nucleofílico, importante na biotransformação e excreção de xenobióticos (HUBER; ALMEIDA, 2008).

Existem outros métodos de avaliar o estresse oxidativo como a quantificação da glutathiona (GSH) que é um tripeptídeo encontrado dentro de células de organismos aeróbicos e que atua como antioxidante diretamente na defesa das células contra o estresse oxidativo, biotransformando e eliminando xenobióticos (OSTROWSKI; KISTLER, 1980). E a peroxidação da membrana (LPO) avalia o estresse oxidativo por meio da oxidação da membrana celular (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

*L. sativa* apresentou diferença estatística apenas para GSH e LPO, porém em tratamentos com o efluente da lagoa de estabilização, possivelmente evidenciando falhas nas enzimas antioxidante, pois o mesmo, apresentou danos e alterações de fitotóxicidade e genotoxicidade no material analisado.

As EROs produzidas pelo metabolismo celular podem causar danos a várias estruturas da célula, como membranas, proteínas e DNA (KOHANSKI *et al.*, 2007; SALMON *et al.*, 2004). De acordo com Belenky *et al.* (2013) a produção de EROs está diretamente ligada à fragmentação de DNA, induzindo a ruptura da fita dupla de DNA, o que impede o reparo do DNA lesado, além de outros danos celulares como até mesmo promovendo a morte celular (DWYER *et al.*, 2012; FOTI *et al.*, 2012).

O aumento da atividade enzimáticas de SOD e GST, bem como o aumento da quantificação de GSH em diferentes concentrações tratadas com o efluente da lagoa de estabilização, evidencia o provável estresse oxidativo nas raízes de *A. cepa*, possivelmente ocasionado devido à presença de metais pesados em que as quantidades traço são essenciais para os mais diversos processos do metabolismo da planta. Porém, em excesso, eles afetam negativamente o metabolismo vegetal (HALL, 2002), corroborando com outros autores, que citam a ação dos metais que induzem o estresse oxidativo de plantas, seja em plantas medicinais (MALEKI *et al.*, 2017), leguminosas como *Vigna mungo* (CHOWRA *et al.*, 2017), em plantas aquáticas como *Lemna minor* L. (HOREMANS *et al.*, 2015), bem como nos modelos usados nesse estudo, a *Lactuca sativa* (DUARTE, 2017; HAGHIGHI *et al.*, 2010; HONG *et al.*, 2015) e *Allium cepa* (COELHO, 2017).

Tabela 4. Análise de biomarcadores bioquímicos em raízes de *L. sativa* e *A. cepa* expostas a diferentes diluições do efluente bruto e lagoa de estabilização.

	Concentrações	SOD (U/mg)	CAT (nM/mg)	GST (nM/mg)	GSH ( $\mu$ mol/mg)	LPO (nM/mg)
<i>L. sativa</i>	Controle Negativo	1,36 $\pm$ 0,2 a	27,62 $\pm$ 17,2 a	21,22 $\pm$ 13,0 a	54,16 $\pm$ 30,3 ab	20,0 $\pm$ 10,9 a
	C5 EB	7,90 $\pm$ 2,3 a	38,32 $\pm$ 23,1 a	32,28 $\pm$ 3,9 a	15,17 $\pm$ 7,0 a	28,17 $\pm$ 6,2 a
	C6 EB	4,21 $\pm$ 3,4 a	22,04 $\pm$ 0 a	46,28 $\pm$ 20,6 a	15,29 $\pm$ 0,3 a	30,95 $\pm$ 0,2 a
	C7 EB	1,15 $\pm$ 1,6 a	19,87 $\pm$ 11,5 a	70,13 $\pm$ 2,0 a	56,54 $\pm$ 0 ab	49,57 $\pm$ 18,6 a
	C8 EB	2,67 $\pm$ 2,3 a	28,03 $\pm$ 25,1 a	39,60 $\pm$ 21,1 a	76,17 $\pm$ 29,3 a	31,28 $\pm$ 11,8 a
	Controle Negativo	1,36 $\pm$ 0,2 a	27,62 $\pm$ 17,2 a	21,22 $\pm$ 13,0 a	54,16 $\pm$ 30,3 ab	20,0 $\pm$ 10,9 ab
	C4 LE	8,58 $\pm$ 6,5 a	17,12 $\pm$ 2,9 a	17,03 $\pm$ 3,6 a	58,49 $\pm$ 12,0 ab	19,32 $\pm$ 9,2 ab
	C5 LE	2,25 $\pm$ 0,7 a	39,81 $\pm$ 5,2 a	48,82 $\pm$ 6,2 a	74,41 $\pm$ 0,3 b	34,45 $\pm$ 3,7 abc
	C6 LE	8,08 $\pm$ 2 a	34,89 $\pm$ 16,3 a	15,93 $\pm$ 4,1 a	36,88 $\pm$ 11,4 ab	15,89 $\pm$ 2,6 a
	C7 LE	0,61 $\pm$ 0,3 a	39,59 $\pm$ 11,4 a	52,20 $\pm$ 22,4 a	25,53 $\pm$ 4,8 a	46,96 $\pm$ 8,6 c
C8 LE	2,46 $\pm$ 1,6 a	35,01 $\pm$ 15,0 a	45,85 $\pm$ 25,8 a	101,05 $\pm$ 54,1 b	43,97 $\pm$ 25,3 bc	
<i>A. cepa</i>	Controle negativo	20,61 $\pm$ 1,7 a	194,83 $\pm$ 28,6 a	23,21 $\pm$ 4,2 a	0,48 $\pm$ 0,1 a	28,55 $\pm$ 7,2 a
	C5 EB	51,41 $\pm$ 14,1 a	122,54 $\pm$ 51,6 a	82,80 $\pm$ 12,3 a	1,41 $\pm$ 0,7 a	14,45 $\pm$ 4,6 a
	C6 EB	41,25 $\pm$ 11,0 a	111,79 $\pm$ 33,5 a	52,43 $\pm$ 32,0 a	1,23 $\pm$ 0,3 a	17,46 $\pm$ 3,1 a
	C7 EB	28,28 $\pm$ 8,3 a	102,37 $\pm$ 28,7 a	66,62 $\pm$ 16,5 a	0,93 $\pm$ 0,1 a	15,34 $\pm$ 4,7 a
	C8 EB	24,91 $\pm$ 20,6 a	139,73 $\pm$ 55,8 a	97,44 $\pm$ 27,6 a	1,27 $\pm$ 0,7 a	16,71 $\pm$ 8,6 a
	Controle negativo	20,61 $\pm$ 1,7 a	194,83 $\pm$ 28,6 c	23,21 $\pm$ 4,2 a	0,48 $\pm$ 0,1 a	28,55 $\pm$ 7,2 a
	C3 LE	67,04 $\pm$ 18,2 c	13,09 $\pm$ 3,1 a	65,76 $\pm$ 26,9 ab	0,75 $\pm$ 0,1 a	9,60 $\pm$ 1,6 a
	C4 LE	39,84 $\pm$ 0,5 bc	138,16 $\pm$ 36 bc	84,26 $\pm$ 12,0 bc	1,18 $\pm$ 0,1 ab	19,12 $\pm$ 3,9 a
	C5 LE	20,97 $\pm$ 6,45 ab	193,55 $\pm$ 88,6 bc	135,65 $\pm$ 4,7 c	2,34 $\pm$ 1,3 b	27,46 $\pm$ 0,7 a
	C6 LE	25,4 $\pm$ 5,2 ab	115,45 $\pm$ 17,4 abc	84,36 $\pm$ 12,1 bc	1,14 $\pm$ 0,2 ab	27,37 $\pm$ 6,2 a
C7 LE	36,81 $\pm$ 16,8 abc	84,05 $\pm$ 24,4 b	80,31 $\pm$ 7,4 abc	1,12 $\pm$ 0,2 ab	20,01 $\pm$ 2,6 a	
C8 LE	21,88 $\pm$ 7,25 a	102,50 $\pm$ 26,8 abc	36,07 $\pm$ 18,4 ab	1,75 $\pm$ 0,5 b	31,81 $\pm$ 4,9 a	

As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste Kruskal Wallis.

Desse modo, pode-se sugerir que a fitotoxicidade e genotoxicidade observada, nos dois modelos vegetais e tratadas com os efluentes bruto e da lagoa de estabilização podem estar atreladas ao estresse oxidativo, possivelmente ocasionado pelos metais presentes nas amostras, principalmente o zinco e cobre que, que associados a matéria orgânica, os torna biodisponíveis, causando alterações nas raízes.

#### **4. CONCLUSÕES**

Os resultados permitem concluir que os efluentes bruto e da lagoa de estabilização oferecem riscos ambientais, sendo necessário cautela e acompanhamento no uso desses efluentes. Principalmente, quando se observa os altos valores de Cobre, Ferro, Manganês e Zinco, estes acima dos valores estabelecidos pela legislação para efluentes. Os dois efluentes apresentaram características de fitotóxicidade por meio da inibição da germinação das sementes e redução do crescimento das raízes nas maiores concentrações em ambos modelos vegetais, bem como, citotoxicidade e genotoxicidade, respectivamente, observadas nas alterações do índice mitótico e alterações cromossômicas nas maiores concentrações. Todas as alterações indicam uma alteração no metabolismo dos modelos, evidenciado com a análise do estresse oxidativo, avaliado indiretamente pela atividade das enzimas SOD, CAT e GST, e a quantificação da GSH e LPO. Visto que essas alterações no metabolismo estão relacionadas, possivelmente, aos metais pesados encontrados nas amostras, sobretudo a presença de zinco e cobre.

## 5. REFERÊNCIAS

ABPA. 2018. **Relatório Anual- Associação Brasileira de proteína animal**. Disponível em: <http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2018/10/relatorio-anual-2018.pdf>. Acesso em: 28 de nov. de 2019.

APEL, Klaus; HIRT, Heribert. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.

ARAGÃO, Francielen Barroso *et al.* Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Allelopathy J**, v. 35, n. 2, p. 259-272, 2015.

ARAGÃO, Francielen Barroso *et al.* Cyto (geno) toxicity of commercial fungicides based on the active compounds tebuconazole, difenoconazole, procymidone, and iprodione in *Lactuca sativa* L. meristematic cells. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, n. 1, p. 25, 2019.

BARBOSA, George; LANGER, Marcelo. Uso de biodigestores em propriedades rurais: uma alternativa à sustentabilidade ambiental. **Unoesc & Ciência-ACSA, Joaçaba**, v. 2, n. 1, p. 87-96, 2011.

BADERNA, D. *et al.* A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. **Environmental research**, v. 111, n. 4, p. 603-613, 2011.

BARREIROS, André LBS *et al.* Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BATISTA-GALLEP, Tatiane Balbo *et al.* Effects of commercial nanoparticles of iron oxide (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>): Cytotoxicity, Genotoxicity and oxidative stress. **Química Nova**, v. 41, n. 9, p. 974-981, 2018.

BELADEL, B. *et al.* Trace elements determination in Algerian wheat by instrumental neutron activation analysis (INAA). **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 293, n. 2, p. 497-501, 2012.

BELENKY, Peter *et al.* Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway. **Cell reports**, v. 3, n. 2, p. 350-358, 2013.

BENAVIDES, María P. *et al.* Cadmium toxicity in plants. **Brazilian journal of plant physiology**, v. 17, p. 21-34, 2005.

BERNARDES, Paula Mauri *et al.* Toxicological effects of comercial formulations of fungicides based on procymidone and iprodione in seedlings and root tip cells of *Allium cepa*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 20, p. 21013-21021, 2019.

BEUTLER, Ernest. Red cell metabolism. **A manual of biochemical methods**, p. 11-12, 1975.

BEVILACQUA José Eduardo. **Estudos sobre a Caracterização e Estabilidade de Amostras de Sedimentos do Rio Tietê, SP.** 1996. Tese (Doutorado no Instituto de Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

BNDES. 2016. **Impactos ambientais da suinocultura: desafios e oportunidades.** Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/9974>. Acesso em: 27 de nov. de 2019.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CARVALHO, Cleoni Dos Santos *et al.* Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 89, n. 1, p. 60-69, 2012.

CHOWRA, Umakanta *et al.* Aluminium-induced excessive ROS causes cellular damage and metabolic shifts in black gram *Vigna mungo* (L.) Hepper. **Protoplasma**, v. 254, n. 1, p. 293-302, 2017.

COELHO, Edvar Junior Roncetti. **Respostas fisiológicas e citogenéticas em raízes de *Allium cepa* L. expostas às amostras de água e sedimento de três represas da bacia do rio Santa Maria da Vitória (ES, Brasil).** 2017. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2017.

CORDERO, Maria Fernanda Espinosa. **Avaliação do desempenho e da influência das condições ambientais e operacionais de lagoas de estabilização, com base em um banco de dados internacionais.** 2016. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2016.

DUARTE, Ian Drumond. **Rio Santa Maria da Vitoria (ES, Brasil): Avaliações ecofisiológicas e toxicogenéticas em amostras de água, sedimento e elutriado do sedimento.** 2017. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2017.

DWYER, Daniel J. *et al.* Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. **Molecular cell**, v. 46, n. 5, p. 561-572, 2012.

FATMA. 2014. **Fundação do meio ambiente. Instrução normativa II: suinocultura.** Disponível em: [https://static.fecam.net.br/uploads/273/arquivos/654746\\_in\\_11\\_Suinocultura.pdf](https://static.fecam.net.br/uploads/273/arquivos/654746_in_11_Suinocultura.pdf). Acesso em: 27 de nov. de 2019.

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

FISKESJÖ, Geirid. The Allium test—an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 197, n. 2, p. 243-260, 1988.

FISKESJO, Geirid. Allium test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. **Plants for environmental studies**, v. 11, p. 307-333, 1997.

FREITAS, Aline Silva *et al.* Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 124, p. 426-434, 2016.

FOTI, James J. *et al.* Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 315-319, 2012.

GALLAGHER, Evan P. *et al.* The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish. **Aquatic toxicology**, v. 23, n. 3-4, p. 155-168, 1992.

GEBLER, Luciano *et al.* Transferência superficial de fósforo reativo potencialmente contaminante por chuvas simuladas intensas. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 19, p. 393-399, 2014.

GRAY, N. F. **Nature of Wastewater. Biology of Wastewater Treatment**. 2.ed. Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da UFMG. 2004.

HABIG, William H.; JAKOBY, William B. Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1981. p. 398-405.

HAGHIGHI, Maryam *et al.* Humic acid decreased hazardous of cadmium toxicity on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Vegetable Crops Research Bulletin**, v. 72, p. 49, 2010.

HALL, J. áL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 366, p. 1-11, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; **Free Radicals in Biology and Medicine**, 5.ed, Oxford: United Kingdom, 2007.

HARASHIMA, Hirofumi; SCHNITTGER, Arp. The integration of cell division, growth and differentiation. **Current opinion in plant biology**, v. 13, n. 1, p. 66-74, 2010.

HONG, Jie *et al.* Toxic effects of copper-based nanoparticles or compounds to lettuce (*Lactuca sativa*) and alfalfa (*Medicago sativa*). **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 17, n. 1, p. 177-185, 2015.

HOREMANS, Nele *et al.* Uranium and cadmium provoke different oxidative stress responses in *Lemna minor* L. **Plant biology**, v. 17, p. 91-100, 2015.

HUANG, H. *et al.* Influence of process parameters on the heavy metal (Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Cr<sup>3+</sup>) content of struvite obtained from synthetic swine wastewater. **Environmental Pollution**, v. 245, p. 658-665, 2019.

HUBER, Paula C. *et al.* Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

JIANG, Zhen-Yue *et al.* Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853-856, 1991.

JIANG, Zhen-Yue *et al.* Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384-389, 1992.

KOHANSKI, Michael A. *et al.* A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 797-810, 2007.

KUNZ, Airton; OLIVEIRA, Paulo Armando V. de. Aproveitamento de dejetos de animais para geração de biogás. **Revista de Política Agrícola**, v. 15, n. 3, p. 28-35, 2006.

LEITE, Paulo Régis Viana; ZAMPIERON, João Vicente. Avaliação da cultura de feijão (*Phaseolus vulgaris* cv carioquinha) em solo contaminado por metais pesados, utilizando técnicas de microscopia eletrônica de varredura e espectrometria por dispersão de energia. **Revista Agrogeoambiental**, v. 4, n. 3, 2012.

LEME, Daniela Moraes; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008.

LEME, Daniela Moraes; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LI, Dan *et al.* Multiphasic assessment of effects of design configuration on nutrient removal in storing multiple-pond constructed wetlands. **Bioresource technology**, v. 290, p. 121748, 2019.

LIMA, Bráulio Gomes; TORRES, Salvador Barros. Estresses hídrico e salino na germinação de sementes de *Zizyphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae). **Revista Caatinga**, v. 22, n. 4, p. 93-99, 2009.

LIMA, Carlos José Gonçalves de Souza *et al.* Soil changes and yield of maize fertilized with swine wastewater. **Revista Caatinga**, v. 32, p. 167-178, 2019.

LUCAS, Shaiane Dal'Maso. **Água residuária da suinocultura nos teores de cobre e zinco em sistema de plantio direto a longo prazo**. 2011. Dissertação (Mestrado em engenharia Agrícola) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2011.

MAHMOOD, Qaisar *et al.* Natural treatment systems as sustainable ecotechnologies for the developing countries. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

MALEKI, Mahmood *et al.* Physiological and antioxidative responses of medicinal plants exposed to heavy metals stress. **Plant Gene**, v. 11, p. 247-254, 2017.

MATOS, A. T. de. **Qualidade do meio físico ambiental: práticas de laboratório**. Viçosa: Ufv, 2012.

MCCORD, Joe M.; FRIDOVICH, Irwin. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MENEGHETTI, Adriana M. *et al.* Mineral composition and growth of babycorn under swine wastewater combined with chemical fertilization. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, p. 1198-1205, 2012.

MENG, Jun *et al.* Contrasting effects of composting and pyrolysis on bioavailability and speciation of Cu and Zn in pig manure. **Chemosphere**, v. 180, p. 93-99, 2017.

MUNNS, Rana; TESTER, Mark. Mechanisms of salinity tolerance. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 651-681, 2008.

NAGAJYOTI, P. *et al.* Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, n. 3, p. 199-216, 2010.

OSTROWSKI, Michael C.; KISTLER, W. S. Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. **Biochemistry**, v. 19, n. 12, p. 2639-2645, 1980.

PALMIERI, Marcel José *et al.* Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 763, p. 30-35, 2014.

PASSARIN, Olga M. *et al.* Soybean nutritional status and seed physiological quality with swine wastewater. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, p. 16-21, 2016.

PERDOMO, C. C. *et al.* **Sistemas de tratamento de dejetos de suínos: inventario tecnológico**. Concórdia: EMBRAPA- CNPA, 2004.

RAHMAN, Md Atiar *et al.* Antioxidative, antimicrobial and cytotoxic effects of the phenolics of *Leea indica* leaf extract. **Saudi journal of biological sciences**, v. 20, n. 3, p. 213-225, 2013.

RAIJ, B. V. **Fertilidade de solos e adubação**. Piracicaba: Ceres, POTAFOS, 1996.

RAMACHANDRAN, V.; D'SOUZA, T. J. Plant uptake of cadmium, zinc, and manganese in soils amended with sewage sludge and city compost. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 61, n. 3, p. 347-354, 1998.

REZENDE, Camilla de Oliveira. **Avaliação ambiental do Córrego Brejo Alegre, em Araguari (MG), utilizando Allium Cepa e Astyanax Altiparanae como sistemas-teste**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2018.

RIBEIRO, Luciene De Oliveira *et al.* Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em bioensaio com alface. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 2, p. 220, 2012.

RIZZONI, Leandro Becalet *et al.* Biodigestão anaeróbia no tratamento de dejetos de suínos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 18, p. 1-20, 2012.

ROSA, Danielle M. *et al.* Corn fertilization using swine wastewater and soil-water environmental quality. **Engenharia Agrícola**, v. 37, p. 801-810, 2017.

ROUT, Gyana Ranjan; DAS, Premananda. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. **Sustainable agriculture**, p. 873-884, 2009.

ROY, Molay Kumar *et al.* Inhibition of colon cancer (HT-29) cell proliferation by a triterpenoid isolated from *Azadirachta indica* is accompanied by cell cycle arrest and up-regulation of p21. **Planta medica**, v. 72, n. 10, p. 917-923, 2006.

SALEHZADEH, A. *et al.* The antimetabolic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 33, n. 7, p. 681-689, 2003.

SALMON, Tiffany B. *et al.* Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 12, p. 3712-3723, 2004.

SCHNEIDER, Cláudia Dornelles; OLIVEIRA, Alvaro Reischak de. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, p. 308-313, 2004.

SEDIYAMA, Maria Aparecida Nogueira *et al.* Nutrientes em compostos orgânicos de resíduos vegetais e dejetos de suínos. **Scientia Agrícola**, v. 57, p. 185-189, 2000.

SILVA, J. da *et al.* **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SILVEIRA, Graciele Lurdes *et al.* Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359-367, 2017.

SHAMINA, N. V.; SILKOVA, O. G.; SERIUKOVA, E. G. Monopolar spindles in meiosis of intergeneric cereal hybrids. **Cell biology international**, v. 27, n. 8, p. 657-664, 2003.

SOUZA, Vivianne LB *et al.* Biodisponibilidade de metais-traço em sedimentos: uma revisão. **Brazilian journal of radiation sciences**, v. 3, n. 1A, 2015.

STEINMETZ, Ricardo Luis Radis *et al.* Study of metal distribution in raw and screened swine manure. **CLEAN–Soil, Air, Water**, v. 37, n. 3, p. 239-244, 2009.

TAIZ, Lincoln *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VENTURA-CAMARGO, B. de C. *et al.* The use of the cytogenetic to identify mechanisms of action of an azo dye in *Allium cepa* meristematic cells. **Journal Environment Analytic Toxicology**, v. 1, n. 3, p. 1-12, 2011.

XU, Y. *et al.* Accumulation of copper and zinc in soil and plant within ten-year application of different pig manure rates. **Plant, soil and environment**, v. 59, n. 11, p. 492-499, 2013.

WHITE, Collin C. *et al.* Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. **Analytical biochemistry**, v. 318, n. 2, p. 175-180, 2003.

WU, Shaohua *et al.* Role of biochar on composting of organic wastes and remediation of contaminated soils—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 20, p. 16560-16577, 2017.

YANG, Yingli *et al.* Lead-induced phytotoxicity mechanism involved in seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 8, p. 1982-1987, 2010.

**CAPÍTULO 2 – EFEITO DO EFLUENTE DA LAGOA DE ESTABILIZAÇÃO DE  
BIODIGESTOR DE SUINOCULTURA COMO BIOFERTILIZANTE, NO  
CRESCIMENTO E TROCAS GASOSAS DE PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* L.)**

Autores: Francielen Barroso Aragão<sup>1</sup> • Iasmini Nicoli Galter<sup>1</sup> • Monick Berbet<sup>1</sup> •  
Dayana Effgen<sup>1</sup> • Leonardo Zanetti<sup>1</sup> • Romário Junior<sup>1</sup> • Silvia Tamie Matsumoto<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais,  
Departamento de Ciências Biológicas, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

\*Autor para correspondência: francielenaragao@gmail.com

Periódico a ser submetido: *Water, air and soil pollution*, abril de 2022.

## RESUMO

O manejo inadequado dos dejetos suínos pode levar à contaminação de cursos d'água, lençóis freáticos, solo e ar, representando risco à sustentabilidade e expansão da suinocultura como atividade econômica. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes diluições do efluente da lagoa de estabilização do biodigestor de suinocultura como biofertilizante em plantas de milho, por meio de análises de crescimento e trocas gasosas. O efluente foi coletado na lagoa de estabilização do biodigestor em uma granja de suínos situada no município de Santa Tereza, Espírito Santo, Brasil. A partir do efluente puro, considerado a primeira diluição (C1), foram realizadas diluições sucessivas estabelecendo as seguintes diluições: 50% (C2), 25% (C3), 12,5% (C4), 6,25% (C5), 3,12% (C6), 0,78% (C7) e 0,39% (C8). Foram utilizados dois controles: um tratamento contendo apenas água (CN) e um tratamento com fertilizante comercial (Forth, NPK 15-05-10) (CF). As sementes de milho foram germinadas em solo Latossolo vermelho amarelo distrófico em vasos de 7 litros, seguindo um delineamento inteiramente ao acaso, em casa de vegetação com exposição aos tratamentos durante 31 dias. Foram quantificados os elementos químicos (Al, B, Ca, Cu, S, Fe, P, Mg, Mn, K, Na e Zn) nas amostras de solo e efluente de suinocultura. Foram realizadas análises de trocas gasosas, obtendo os dados de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A), concentração intracelular de CO<sub>2</sub> (Ci), condutância estomática (gs), transpiração (E), eficiência de carboxilação (A/Ci) e razão entre concentrações de CO<sub>2</sub> intra e extracelular (Ci/Ca). Com as análises de crescimento, obteve-se a massa seca total (MST), massa seca da raiz (MSR), da parte aérea (MSPA), relação parte aérea/raiz (RPA), razão massa radicular (RMR) e a razão da área foliar (RAF). Os dados foram submetidos ANOVA, seguida do teste de Tukey (P < 0,05), a fim de comparar as médias entre os tratamentos. Na análise química do efluente foram observadas concentrações de nutrientes que supririam a necessidade das plantas de milho como fósforo e enxofre, mas outros como Ca, Cu, Mg, Mn e Zn não atenderam as necessidades mínimas exigidas pelas plantas. Foram encontrados valores acima do recomendado para plantas de milho, dos nutrientes S, K e Na. As sementes submetidas as C1 e C2 não germinaram. Na análise de crescimento apenas a diluição C6 proporcionou um aumento significativo na altura das plantas, MSR e MST, em relação ao controle água. Já na diluição C3, houve aumento significativo em RPA, RMR e RAF em relação ao controle negativo. Para análises de trocas gasosas foi possível observar um aumento significativo nos resultados encontrados em todos os tratamentos nas variáveis Ci, E e Ci/Ca. A variável A/Ci apresentou diferença estatística quando comparada ao controle água na maioria dos tratamentos (exceto C7) reduzindo a carboxilação. Possivelmente o excesso de K e Na pode ter causado estresse hídrico nas sementes, impedindo a germinação e desenvolvimento das plantas em C1 e C2. Todavia, a partir das diluições foi observado redução dos efeitos do excesso de K e Na, reduzindo também a disponibilidade de outros nutrientes essenciais para as plantas de milho.

**Palavras-chave:** Lagoa de estabilização • biofertilizante • área foliar • nutrientes • transpiração

## ABSTRACT

The inadequate management of swine manure can lead to contamination of water courses, groundwater, soil and air, representing a risk to the sustainability and expansion of pig farming as an economic activity. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of different dilutions of the effluent from the stabilization pond of the swine biodigester as a biofertilizer in maize plants, through growth and gas exchange analysis. The effluent was collected in the biodigester stabilization pond in a swine farm located in the municipality of Santa Tereza, Espírito Santo, Brazil. From the pure effluent, considered the first dilution (C1), successive dilutions were carried out establishing the following dilutions: 50% (C2), 25% (C3), 12.5% (C4), 6.25% (C5), 3.12% (C6), 0.78% (C7) and 0.39% (C8). Two controls were used: a treatment containing only water (CN) and a treatment with commercial fertilizer (Forth, NPK 15-05-10) (CF). Corn seeds were germinated in a dystrophic red-yellow Latosol soil in 7 liter pots, following a completely randomized design, in a greenhouse with exposure to treatments for 31 days. The chemical elements (Al, B, Ca, Cu, S, Fe, P, Mg, Mn, K, Na and Zn) were quantified in the soil and swine effluent samples. Gas exchange analyzes were performed, obtaining data on net CO<sub>2</sub> assimilation (A), intracellular CO<sub>2</sub> concentration (C<sub>i</sub>), stomatal conductance (g<sub>s</sub>), transpiration (E), carboxylation efficiency (A/C<sub>i</sub>) and concentration ratio of intra and extracellular CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>). With the growth analyses, the total dry mass (MST), root dry mass (MSR), shoot dry mass (MSPA), shoot/root ratio (RPA), root mass ratio (RMR) and the ratio were obtained. of the leaf area (RAF). Data were submitted to ANOVA, followed by Tukey's test ( $P < 0.05$ ), in order to compare means between treatments. In the chemical analysis of the effluent, concentrations of nutrients that would meet the needs of corn plants, such as phosphorus and sulfur, were observed, but others such as Ca, Cu, Mg, Mn and Zn did not meet the minimum requirements required by the plants. Values above recommended for maize plants were found for nutrients S, K and Na. Seeds submitted to C1 and C2 did not germinate. In the growth analysis, only the C6 dilution provided a significant increase in plant height, MSR and MST, compared to the water control. In the C3 dilution, there was a significant increase in RPA, RMR and RAF compared to the negative control. For gas exchange analysis it was possible to observe a significant increase in the results found in all treatments in the variables C<sub>i</sub>, E and C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>. The variable A/C<sub>i</sub> showed a statistical difference when compared to the control water in most treatments (except C7), reducing carboxylation. Possibly the excess of K and Na may have caused water stress in the seeds, preventing germination and development of plants in C1 and C2. However, from the dilutions, a reduction in the effects of excess K and Na was observed, also reducing the availability of other essential nutrients for corn plants.

**Keywords:** Stabilization pond • biofertilizer • leaf area • nutrients • transpiration

## 1. INTRODUÇÃO

As agroindústrias, de modo geral, produzem quantidade considerável de resíduos, tanto sólidos como líquidos. Grande parte desses resíduos são orgânicos, possibilitando a sua reutilização em propostas mais sustentáveis como, por exemplo, seu uso como fertilizante orgânico (MARCHI; GONÇALVES, 2020), destacando-se como uma alternativa na substituição de fertilizantes químicos (SILVA *et al.*, 2019). De acordo com a origem do resíduo, a composição do biofertilizante pode variar, diferindo conforme com o método de preparo, tempo de decomposição, micro-organismos presentes, temperatura e pH do composto (BENEGA *et al.*, 2018; MARROCOS *et al.*, 2012). Muitas vezes, o biofertilizante contém macro e micronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2017), bem como fornece ao solo e às plantas uma quantidade variável de nutrientes, promovendo um melhor desenvolvimento. Quando comparado a fertilizantes industriais, o biofertilizante, não favorece o crescimento vegetativo da planta, porém não reduz significativamente a produtividade final da cultura (DUARTE *et al.*, 2021; ZANUNCIO *et al.*, 2020).

A produção de suínos, reconhecida por ser uma grande geradora de resíduos líquidos, demanda maior atenção no processamento dos resíduos ao final do processo produtivo, a fim de reduzir o risco de contaminação do solo e de águas superficiais e subterrâneas (SANTOS; SILVA, 2018). Todo o volume de resíduos pode ser utilizado na fertilização das lavouras, devido as suas características químicas, principalmente pela grande quantidade de nutrientes e minerais essenciais ao desenvolvimento e crescimento das plantas, além de minimizar a poluição provocada pelo descarte irregular do resíduo (GOMES *et al.*, 2021). Mas, seu uso deve ser feito com cuidado, evitando-se possíveis alterações nas características naturais do solo, poluição dos corpos d'água por meio da lixiviação dos componentes do composto, assim como a poluição do ar pelos gases liberados na decomposição da matéria orgânica e proliferação de micro-organismos, naturalmente presentes nesse tipo de resíduos (SANTOS; SILVA, 2018).

Apesar de todos os benefícios as plantas, faz-se necessário a avaliação do biofertilizante, principalmente para determinar uma dose adequada a ser aplicado em cada cultura, pois, muitas vezes, baixas concentrações do composto podem não atender às necessidades nutricionais básicas da planta. Da mesma forma, em altas doses, a concentração de determinados componentes pode levar à

intoxicação das plantas, reduzindo sua produtividade e até mesmo causando sua morte (GOMES *et al.*, 2021). Dependendo da composição do biofertilizantes, muitos deles possuem grande potencial contaminante, principalmente devido à presença de determinados nutrientes e metais pesados (RAMIRES *et al.*, 2019), reiterando, assim, a importância de determinar a dose adequada a diferentes culturas (AZEVEDO *et al.*, 2020).

Uma forma de avaliar os efeitos dos biofertilizantes é por meio da análise do crescimento vegetativo da planta, pois, ao ser tratada com o composto de interesse, espera-se que ela responda aos efeitos benéficos ou maléficos ao seu desenvolvimento e crescimento. Sendo assim, a análise de crescimento permite esclarecer as condições morfofisiológicas da planta em diferentes situações, avaliando o crescimento da planta como um todo e a colaboração dos variados órgãos para o crescimento total (BARBERO *et al.*, 2013). Essa avaliação fisiológica auxilia na compreensão de diferenças no comportamento das plantas, provenientes da capacidade fotossintética, respiração, fotorrespiração, alocação e partição de fotoassimilados (PEDÓ *et al.*, 2013). Desse modo, a análise de trocas gasosas se faz importante como forma de auxiliar na compreensão dos processos fisiológicos da planta. Diferentes condições levam à redução do crescimento vegetativo, diretamente relacionado à atividade fotossintética, permitindo avaliar a adaptação e estabilidade das plantas em determinados ambientes (ANJOS *et al.*, 2014).

A espécie *Zea mays*, popularmente conhecida como milho, é uma planta muito utilizada como modelo de avaliação de biofertilizantes (DINESHKUMAR *et al.*, 2019; DORNAS *et al.*, 2020; MUNISWAMI *et al.*, 2021; NASCIMENTO *et al.*, 2020; SARAIVA *et al.*, 2020). Caracterizado como um bom modelo vegetal, por ser uma planta de ciclo anual com baixo ponto de compensação de CO<sub>2</sub>, alta taxa fotossintética, baixo consumo de água para produção de biomassa, rápido crescimento e grande potencial produtivo (BERGAMASHI *et al.*, 2004; USDA, 2018). Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes diluições do efluente da lagoa de estabilização do biodigestor de suinocultura como biofertilizante em plantas de milho, por meio de análises de crescimento e trocas gasosas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Área de estudo e instalação do experimento

O efluente foi coletado em uma granja de suínos, situada no município de Santa Tereza, interior do estado do Espírito Santo, Brasil. Foram coletadas amostras da lagoa de estabilização na qual os resíduos provenientes do biodigestor são alocados. O experimento foi conduzido em condição de casa de vegetação, no período de abril a maio de 2019, pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil. Para realização do experimento utilizou-se solo com baixo teor de nutrientes, classificado como Latossolo Vermelho Amarelo distrófico, coletado na localidade de Paraju, distrito do município de Domingos Martins, ES. O mesmo foi peneirado e acondicionado em vasos com capacidade de 7 litros de solo, os quais foram distribuídos sobre uma bancada, seguindo um delineamento inteiramente ao acaso.

Para avaliar as respostas de diferentes diluições do efluente, foram realizadas diluições com água deionizada, na qual o ponto de partida foi o efluente puro (C1), seguido por sucessivas reduções na quantidade de efluente: 50% (C2), 25% (C3), 12,5% (C4), 6,25% (C5), 3,12% (C6), 0,78% (C7) e 0,39% (C8). Foram utilizados dois controles: um tratamento apenas com água (CN) e um tratamento com fertilizante comercial (Forth, NPK 15-05-10) (CF). Em resumo foram avaliadas 8 diluições do efluente e 2 controles, com 5 repetições para cada tratamento. Os vasos com solo foram regados com os tratamentos até atingirem 100% da capacidade de campo do solo.

Foram semeadas três sementes de milho híbrido BR 206 por vaso à, aproximadamente, um cm de profundidade. Após 5 dias de germinação, foi realizado o desbaste mantendo-se apenas uma plântula por vaso. Os vasos foram regularmente regados com água até atingirem 90% da capacidade de campo do solo, de forma que não houvesse extravasamento de água. Após 31 dias do início do experimento foram realizadas as análises de crescimento e de trocas gasosas.

### 2.2 Análises químicas

A caracterização química do solo utilizado no experimento, foi realizada antes de receber os tratamentos, sendo quantificados os elementos: Alumínio (Al),

Boro (B), Cálcio (Ca), Cobre (Cu), Enxofre (S), Ferro (Fe), Fósforo (P), Magnésio (Mg), Manganês (Mn), Potássio (K), Sódio (Na) e Zinco (Zn).

Para análise química do efluente, as amostras foram armazenadas em frascos de polietileno previamente higienizados. As amostras foram acidificadas com ácido nítrico P.A., alcançando um  $\text{pH} < 2$ , e refrigeradas a  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para quantificar a presença de metais e outros elementos, as amostras foram submetidas ao procedimento baseado no método U.S. EPA 200.8. Foi utilizada a técnica espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado por meio de dois equipamentos, o ICP OES da Thermo Scientific modelo iCAP6000 e ICP MS em aparelho Nexlon 300 D (Perkin Elmer). Os elementos quantificados foram os mesmos realizados para análise do solo.

### 2.3 Trocas gasosas

As análises de trocas gasosas foram realizadas no início da manhã, no 31<sup>o</sup> dia de exposição, utilizando-se o analisador de gás infravermelho (Opti-Sciences, LCpro-T) com a câmara de leitura "Narrow" estreita, para folhas aciculadas. O sistema foi mantido constante com radiação fotossinteticamente ativa de  $1300\text{ }\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $\text{CO}_2$  ambiente, temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  e vapor e \u00e1gua 27 MBar – milibar. Foram obtidos os dados de assimila\u00e7\u00e3o l\u00edquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2\text{ m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), concentra\u00e7\u00e3o intracelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2\text{ mol}^{-1}$ ), condut\u00e2ncia estom\u00e1tica ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), transpira\u00e7\u00e3o ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), efici\u00eancia de carboxila\u00e7\u00e3o ( $A/C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2\text{ m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$ ) e raz\u00e3o entre concentra\u00e7\u00f5es de  $\text{CO}_2$  intra e extracelular ( $C_i/C_a$ ).

### 2.4 An\u00e1lises de crescimento de *Zea mays*

Ao final do experimento, as plantas foram retiradas dos vasos e foram realizadas medidas da altura dos \u00f3rg\u00e3os vegetativos da planta (raiz, caule e folha), di\u00e2metro do caule (DC) e \u00e1rea foliar (AF) obtida por meio de um scanner de gera\u00e7\u00e3o de imagens (Area Meter, LI-COR 3100, Nebraska, EUA). Em seguida, as plantas foram alocadas em sacos de papel e acondicionadas em estufa para a secagem a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  at\u00e9 que o material atingisse um peso constante. Posteriormente, foi obtida a massa seca das plantas, obtendo os dados da massa seca da raiz (MSR) e da parte \u00e1erea (MSPA). Com os dados da massa seca da parte \u00e1erea, massa seca da raiz e parte \u00e1erea, calculou-se as raz\u00f5es alom\u00e9tricas, rela\u00e7\u00e3o parte \u00e1erea/raiz (RPA)

obtida pela razão MSPA/MSR, razão massa radicular (RMR) calculada com a matéria seca da raiz / matéria seca total e foi realizada a razão área foliar (RAF), utilizando-se a área foliar/ matéria seca total.

### 2.5 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão. Com a finalidade de verificar a normalidade dos dados foi utilizado o teste Shapiro-Wilks. Os dados foram submetidos a análise variância ANOVA e foi utilizado o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), a fim de comparar as médias encontradas entre os tratamentos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Análises químicas

Os resultados da análise química do solo estão disponíveis na Tabela 1, indicando que as amostras representam solo com baixos teores de nutrientes, não apresentando, na maior parte dos elementos analisados, a quantidade mínima de nutrientes necessários para o desenvolvimento da cultura de milho. Em contrapartida, os valores encontrados nos efluentes sugerem que alguns nutrientes como o fósforo ( $21,73 \text{ mg/dm}^3$ ), por exemplo, poderiam suprir a carência do solo, atendendo as necessidades básicas da planta quando realizado o uso do efluente puro. Alguns elementos foram encontrados em altas concentrações, acima dos valores ideais de referência para o milho, como enxofre ( $19,53 \text{ mg/dm}^3$ ), potássio ( $670,17 \text{ mg/dm}^3$ ) e sódio ( $273,02 \text{ mg/dm}^3$ ). Assim, quando utilizado, o efluente puro poderia trazer malefícios às plantas, mas quando diluído pode propiciar valores ideais para fertilização das plantas.

Enfatiza-se que alguns elementos não foram encontrados em concentrações mínimas no efluente puro, para suprir a necessidade de nutrientes detectada no solo, como o cálcio ( $0,18 \text{ cmol c/ dm}^3$ ), cobre ( $0,59 \text{ mg/dm}^3$ ), magnésio ( $0,07 \text{ cmol c/ dm}^3$ ), manganês ( $0,34 \text{ mg/dm}^3$ ) e zinco ( $1,83 \text{ mg/dm}^3$ ). Os elementos alumínio, boro e ferro já se encontravam em concentrações mínimas no solo utilizado no estudo. O solo utilizado tem por natureza um pH ácido (5), principalmente, devido à presença de alumínio e ferro, enquanto o efluente possui um pH básico (8,5), podendo ser útil na correção da acidez do solo, cuja faixa ótima de pH para o plantio

de milho é em torno de 5,8 e 6,8 (NATIONAL GARDENING ASSOCIATION EDITORS, 2019).

Tabela 1: Caracterização química do efluente bruto da lagoa de estabilização, provenientes do biodigestor de suinocultura, e do solo antes de receber os tratamentos.

Parâmetro	Valores de referência*			Solo	Efluente bruto
	Baixo	Médio	Alto		
Alumínio (Al) (mg/dm <sup>3</sup> )	< 0,4	0,4 - 1	> 1	0,5	0,25
Boro (B) (mg/dm <sup>3</sup> )	0,16-0,35	0,36-0,60	0,61-0,90	0,58	1,03
Cálcio (Ca) (cmol c/dm <sup>3</sup> )	< 1,5	1,5 - 4	> 4	0,7	0,18
Cobre (Cu) (mg/dm <sup>3</sup> )	0,6 - 1,5	1,6 - 20	> 20	0,3	0,59
Enxofre (S) (mg/dm <sup>3</sup> )	< 5	5 - 10	>10	10	19,56
Ferro (Fe) (mg/dm <sup>3</sup> )	21 - 31	31 - 200	> 200	174	2,26
Fósforo (P) (mg/dm <sup>3</sup> )	< 10	10 - 20	> 20	2	20,73
Magnésio (Mg) (cmol c/dm <sup>3</sup> )	< 0,6	0,6 - 1	> 1	0,2	0,07
Manganês (Mn) (mg/dm <sup>3</sup> )	6 - 11	12 - 130	> 130	5	0,34
Potássio (K) (mg/dm <sup>3</sup> )	< 60	60 -150	> 150	17	670,17
Sódio (Na) (mg/dm <sup>3</sup> )	< 40	40 - 80	> 80	2	237,02
Zinco (Zn) (mg/dm <sup>3</sup> )	4,1 - 6,9	7 - 40	> 40	0,2	1,83
pH	-	-	-	5	8,85

\*Valores de referência de nutrientes para plantas de milho.

Apesar da quantidade de enxofre ter sido alta, o mesmo pode não ser prejudicial as plantas de milho, pois é um macronutriente essencial às plantas, devido a sua importância na constituição de proteínas, além de melhorar a assimilação de nitrogênio (ANDRADE *et al.*, 2019). Assim como ocorre com o potássio, sendo o segundo nutriente mais requerido pelas plantas que participa de diversos complexos enzimáticos, atuando na translocação de carboidratos, participa da fosforilação oxidativa e está relacionado com a redução da fotossíntese e aumento da respiração em casos de carência de P (CARVALHO *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2013).

Por outro lado, o excesso de sódio no efluente pode ocasionar estresse salino nas plantas, causando redução na abertura estomática, na atividade fotossintética e na transpiração, bem como na absorção e equilíbrio de nutrientes, levando a danos no crescimento da planta (PRISCO *et al.*, 2016; TAGLIAFERRE *et al.*, 2016). O Na pode levar a planta à deficiência de outros nutrientes, devido à redução da capacidade da planta em absorver os nutrientes do solo (LACERDA *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2012;).

Análise química do efluente de lagoa de estabilização de biodigestor revela que o efluente não possui nutrientes em quantidades suficientes para o bom desenvolvimento do milho. Mesmo não atendendo a concentrações de nutrientes necessárias, podem melhorar a produtividade final das plantas submetidas a tratamentos com biofertilizantes (LIMA *et al.*, 2019; MENEZES *et al.*, 2018). A concentração dos elementos quantificados pode variar de acordo com a variação da alimentação dos suínos (ração e suplementação alimentar) e ao modo de confinamento dos animais (águas de limpeza das baias, excrementos dos animais e água dos bebedouros), gerando resíduos com composições diferentes (MORAIS *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2019).

### 3.2 Trocas gasosas

As análises de trocas gasosas em milho, após o tratamento com diluições do efluente, permitiram identificar alterações nas variáveis fotossintéticas das trocas gasosas quando comparadas ao controle água e ao controle fertilizante comercial (Tabela 2). Ao comparar os tratamentos do efluente com o controle água, foi possível observar aumento significativo nas variáveis concentração intracelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ), transpiração ( $E$ ) e razão entre concentrações de CO<sub>2</sub> intra e extracelular ( $C_i/C_a$ ) em todos os tratamentos. A variável eficiência da carboxilação ( $A/C_i$ ) apresentou diferença significativa quando comparada ao controle água na maioria das diluições, reduzindo a carboxilação, porém, na diluição C7, essa redução significativa não foi observada, sugerindo que o biofertilizante contribuiu na melhor abertura dos estômatos, permitindo a entrada de CO<sub>2</sub>, bem como a transpiração.

Resultados similares foram relatados por Moreira *et al.* (2020) que demonstraram que o milho, quando adubado com fertilizantes de origem orgânica, aumentou sua capacidade fotossintética. Diversos fatores influenciam as trocas gasosas ao longo do crescimento da planta que variam com as condições ambientais como irradiância, água, temperatura, disponibilidade de CO<sub>2</sub> e nutrientes (MOHOTTI; LAWLOR, 2012).

A nutrição mineral influencia no desenvolvimento das plantas, podendo estar ligada a funções estruturais, compõem enzimas e pigmentos fotossintéticos, acomete diversos processos fisiológicos importantes da fotossíntese (ARAÚJO; MACHADO, 2006). Como exemplo o Mg, um cofator de quase todas as enzimas

fosforilativas (VITTI *et al.*, 2006). Possivelmente, sendo uma explicação para a redução na carboxilação dos tratamentos, supostamente causada pela falta de Mg, que inibe a fixação de CO<sub>2</sub>, pois o mesmo é exigido em reações de fosforilação que limitam a fotossíntese (FARHAT *et al.*, 2016).

Foi possível observar que o efluente da lagoa de estabilização não supriu as necessidades mínimas de magnésio para as plantas de milho em que, apesar de melhorar algumas variáveis analisadas nas trocas gasosas, a fotossíntese líquida não apresentou diferença significativa quando comparada com o controle água, reforçando a evidencia da deficiência nutricional específicos no efluente.

Em contrapartida, ao comparar os tratamentos do efluente com o tratamento que recebeu o fertilizante comercial, observou-se uma redução significativa em todas as diluições nas taxas de fotossíntese líquida (*A*), condutância estomática (*g<sub>s</sub>*) e transpiração (*E*). Esses resultados evidenciam que, possivelmente, ocorreu uma deficiência nutricional nas plantas que foram submetidas aos tratamentos com o efluente. Assim, o excesso de sódio no efluente pode ter sido um agravante que, possivelmente, promoveu uma menor taxa de fotossíntese líquida, interferindo diretamente no crescimento das plantas. Silva *et al.* (2011) discutem que o excesso de sais podem causar danos na estrutura de enzimas e membranas, prejudicando a assimilação líquida de CO<sub>2</sub> pelas plantas. Destarte, a fotossíntese é um dos processos mais afetados sob condições salinas, não apenas devido ao fechamento de estômatos, mas por comprometer a integridade de enzimas e reduzir o teor de clorofilas e carotenoides (TAIZ *et al.*, 2017).

Os parâmetros avaliados indicam que os processos fotossintéticos nas plantas de milho avaliadas foram reduzidos, conseqüentemente a fixação de CO<sub>2</sub> e a produção de fotoassimilados, corroborando os resultados de Freire *et al.* (2015) em que a aplicação de biofertilizante via solo aumentou os teores de sódio. Desse modo, reitera-se a importância de avaliar a diluição adequada de biofertilizante a ser aplicado em cada cultura, a fim de não afetar o crescimento e desenvolvimento da planta, comprometendo a produção (AZEVEDO *et al.*, 2020).

Tabela 2. Assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), condutância estomática (gs,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), concentração intracelular de CO<sub>2</sub> (Ci,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ), transpiração (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), razão entre concentrações de CO<sub>2</sub> intra e extracelular (Ci/Ca), eficiência de carboxilação (A/Ci,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ ) de plantas de milho expostas às diluições do efluente do biodigestor de suinocultura.

	<b>A</b>	<b>gs</b>	<b>Ci</b>	<b>E</b>	<b>Ci/Ca</b>	<b>A/Ci</b>
<b>Água</b>	10,35 ± 1,43 a	0,07 ± 0,01 a	129,2 ± 35,1 a	0,94 ± 0,05 a	0,35 ± 0,09 a	0,13 ± 0,06 b
<b>Fertilizante</b>	22,29 ± 1,99 b	0,73 ± 0,15 b	266,8 ± 14,2 bc	7,23 ± 0,70 c	0,79 ± 0,04 bc	0,09 ± 0,01 ab
<b>C3</b>	4,32 ± 0,22 a	0,19 ± 0,01 a	335,6 ± 3,4 c	2,61 ± 0,08 b	0,88 ± 0,01 bc	0,01 ± 0 a
<b>C4</b>	6,04 ± 0,75 a	0,23 ± 0,03 a	319,8 ± 7,6 bc	2,88 ± 0,10 b	0,85 ± 0,02 bc	0,02 ± 0 a
<b>C5</b>	7,05 ± 2,19 a	0,18 ± 0,02 a	299,4 ± 21,6 bc	2,51 ± 0,16 b	0,80 ± 0,05 bc	0,03 ± 0,01 a
<b>C6</b>	7,14 ± 1,06 a	0,21 ± 0,01 a	305,2 ± 12,7 bc	2,79 ± 0,13 b	0,82 ± 0,03 bc	0,02 ± 0 a
<b>C7</b>	10,18 ± 1,52 a	0,16 ± 0,03 a	242,4 ± 12,5 b	2,99 ± 0,37 b	0,67 ± 0,03 b	0,04 ± 0,01 bc
<b>C8</b>	7,40 ± 1,31 a	0,18 ± 0,03 a	287,8 ± 14,3 bc	2,87 ± 0,25 b	0,77 ± 0,03 bc	0,03 ± 0,01 a

As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste de Tukey.

### 3.3 Análises de crescimento de *Zea mays*

Nos tratamentos com as maiores concentrações do efluente C1 e C2 não foi possível realizar as análises de crescimento em decorrência da não germinação das sementes de milho expostas a esses tratamentos. A ausência da germinação nessas diluições pode estar relacionada ao excesso de íons como o sódio. Soares *et al.* (2015) relatam que a germinação das sementes pode ser afetada com a baixa disponibilidade de água nos tecidos e, conseqüentemente, reduzindo o potencial hídrico, especialmente em solos que exibem maiores teores de sais. O déficit hídrico com cloreto de sódio reduz a germinação de sementes de milho por meio da redução do potencial osmótico do solo, afetando significativamente o vigor das sementes, assim como o crescimento das plântulas de milho (HENRIQUE *et al.*, 2021).

Nos demais tratamentos, foi possível observar alterações na análise de crescimento (Figuras 1, 2, 3 e 4), como na diluição C6 que apresentou um aumento significativo na altura das plantas, na massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST), em relação ao controle água. As plantas submetidas ao tratamento com a diluição C3 obtiveram um aumento significativo nos valores encontrados na razão parte aérea/raiz (RPA), razão massa radicular (RMR) e na razão área foliar (RAF), em relação ao controle água.

Foi possível observar que grande parte dos tratamentos não diferiram do controle água. Possivelmente, o efluente não apresenta todos os nutrientes necessários, ou em quantidades mínimas requeridas pelas plantas de milho. Apesar de alguns autores descreverem que o uso de fertilizantes de origem orgânica melhora a produtividade das plantas (DE SOUZA *et al.*, 2021; MATOS *et al.*, 2017; SARAIVA *et al.*, 2020), há relatos que o biofertilizante necessita de adequações ou complementações para atender a demanda nutricional exigida pelas plantas (PASSARIN, 2016), considerando principalmente nutrientes limitantes para seu uso como nitrogênio e sódio (MORETTI, 2017).

O excesso de alguns nutrientes, como o potássio pode prejudicar a absorção de cálcio e magnésio em plântulas de milho (GOMES *et al.*, 2018), assim como a salinidade proporcionada pelo excesso de sódio, observado no trabalho, pode reduzir a altura, área foliar, diâmetro do caule e massa seca em plantas de milho (DE SOUSA *et al.*, 2018). Foi possível observar que a diluição do efluente resultou

em uma redução das concentrações de alguns nutrientes que, em excesso são maléficis, mas podem reduzir ainda mais a concentração de outros elementos essenciais para as plantas como, por exemplo, zinco, boro e fósforo (CASTRO *et al.*, 2016; FANCELLI; DE ALMEIDA, 2015; DOS SANTOS *et al.*, 2019).

Em contrapartida, quando comparados os tratamentos com o controle fertilizante, observa-se que a maior parte das diluições tiveram alterações nos parâmetros da análise de crescimento. As variáveis área foliar (AF) e massa seca da parte aérea (MSPA) apresentaram uma redução significativa em todos os tratamentos. A redução na taxa massa da raiz (MSR) foi significativa nas diluições C3, C4, C5 e C8, enquanto as variáveis razão parte aérea/raiz (RPA), razão massa radicular (RMR) e na razão área foliar (RAF) apresentaram diferença significativa nos tratamentos C5, C6, C7 e C8. Os tratamentos realizados com as diluições do efluente não fornecem as quantidades de nutrientes necessários para o desenvolvimento e crescimento das plantas como o fertilizante comercial, e com esses resultados podem estar relacionados com a falta de alguns nutrientes essenciais, da mesma forma que o aumento da diluição leva à redução de alguns nutrientes importantes para o desenvolvimento das plantas, promovendo carência nutricional (PASSARIN *et al.*, 2016). França (2019), ao estudar os efeitos de resíduos de biodigestor da suinocultura no solo, evidenciou que o mesmo proporciona uma maior disponibilidade de fósforo e magnésio, além de reduzir a concentração de alumínio e a acidez no solo, em contrapartida ele não oferece aumento na disponibilidade de cálcio e potássio.

Outro fator limitante, encontrado nesse trabalho e que pode ter levado a essa diferença quando comparados às diluições com o fertilizante comercial, seria o estresse hídrico, provocado, provavelmente, pelo excesso de alguns elementos como o sódio (MORETTI, 2017) que, mesmo com as diluições, a concentração se apresentou alta. Passarin *et al.* (2016) relatam que altas doses do resíduo do biodigestor de suinocultura acarretam sintomas de toxicidade na cultura de soja, levando a uma redução na qualidade fisiológica das sementes.

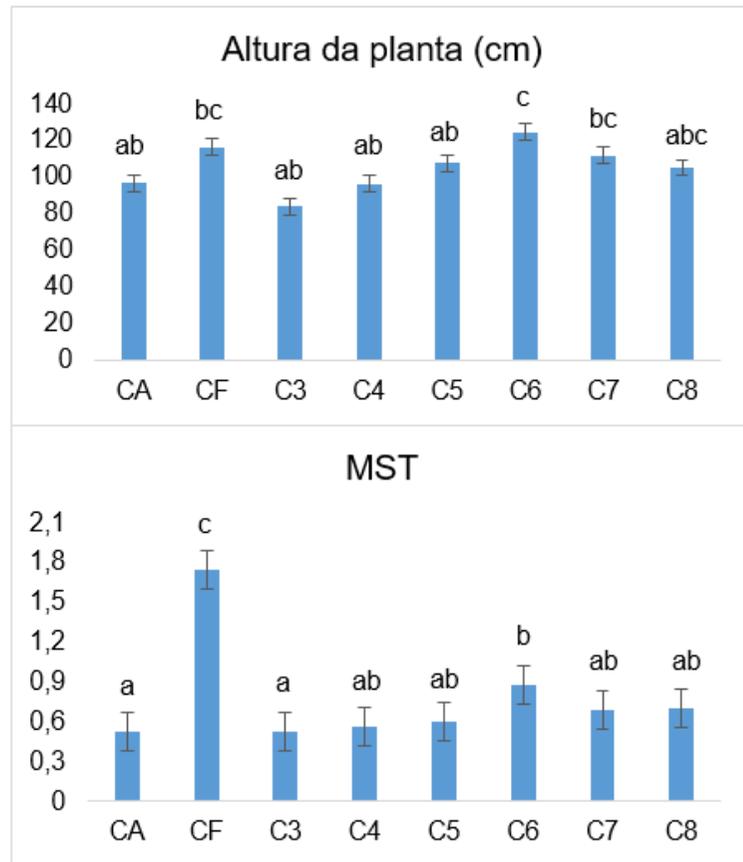


Figura 1: Altura das plantas e massa seca total (MST) de plantas de milho, expostas a tratamentos com diluições do efluente da lagoa de estabilização, provenientes do biodigestor de suinocultura. As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste de Tukey. CA: controle água; CF: controle fertilizante.

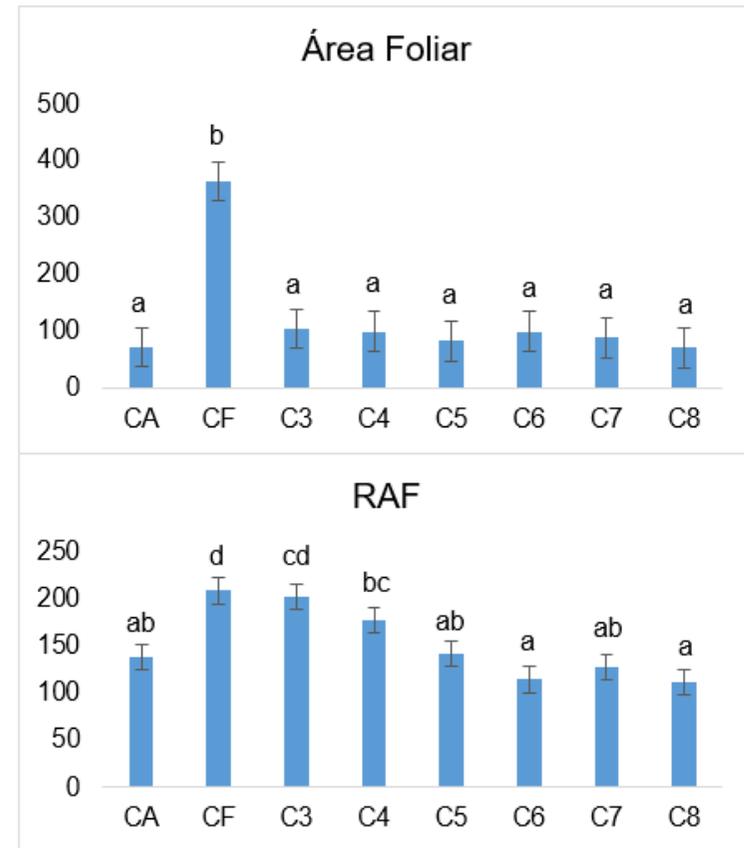


Figura 2: Área Foliar e Razão área foliar (RAF) de plantas de milho, expostas a tratamentos com diluições do efluente da lagoa de estabilização de biodigestor de suinocultura. As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste de Tukey. CA: controle água; CF: controle fertilizante.

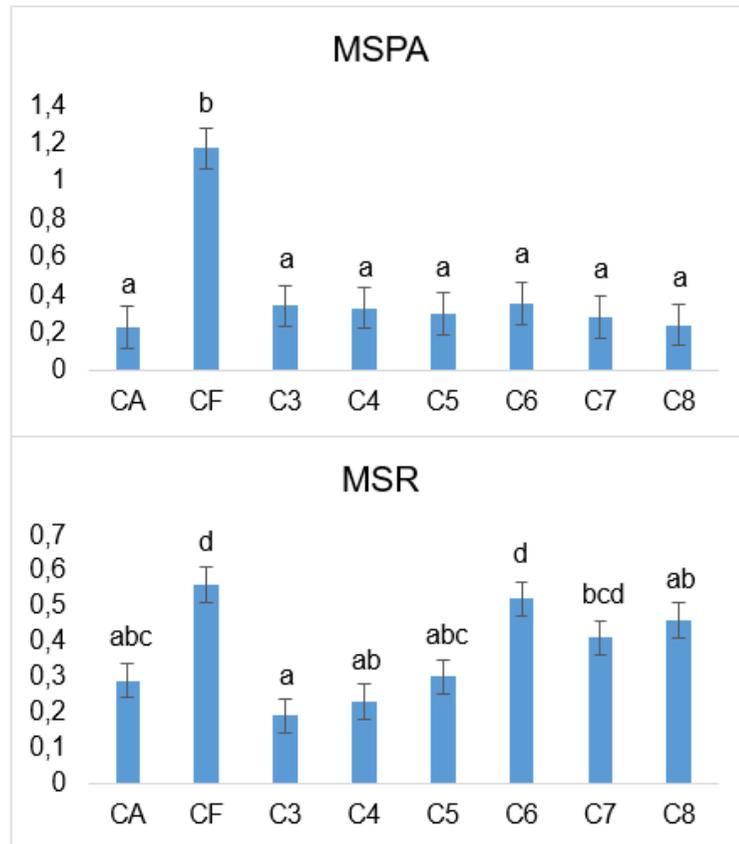


Figura 3: Massa seca parte aérea (MSPA) e Massa seca raiz (MSR) de plantas de milho, expostas a tratamentos com diluições do efluente da lagoa de estabilização, provenientes do biodigestor de suinocultura. As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste de Tukey. CA: controle água; CF: controle fertilizante.

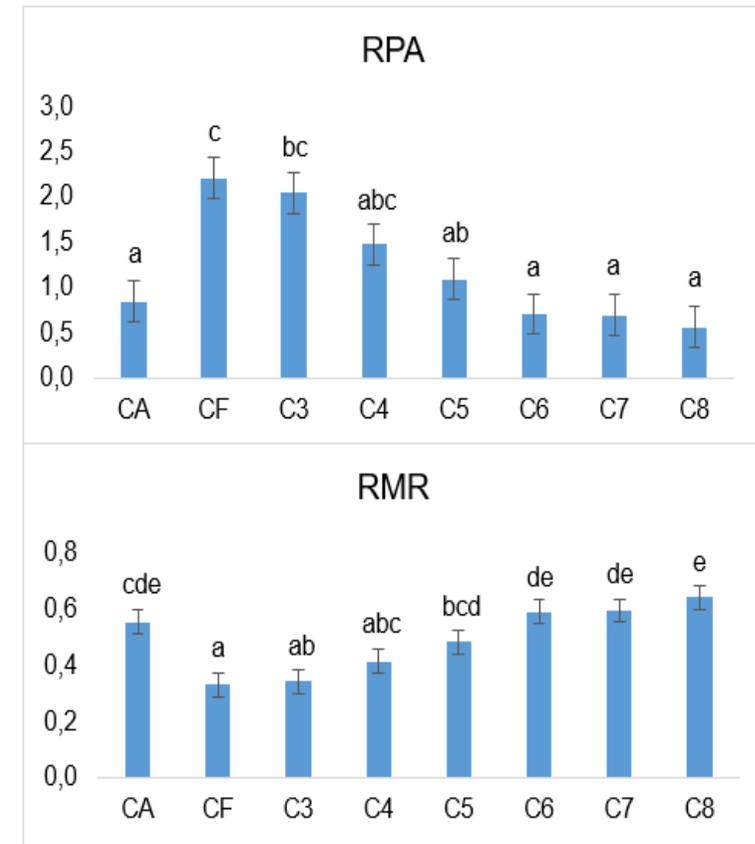


Figura 4: Razão parte área (RPA) e razão massa radicular (RMR) de plantas de milho, expostas a tratamentos com diluições do efluente da lagoa de estabilização, provenientes do biodigestor de suinocultura. As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste de Tukey. CA: controle água; CF: controle fertilizante.

#### **4. CONCLUSÕES**

Foi possível evidenciar que o efluente da lagoa de estabilização de biodigestor de suinocultura, deve ser utilizado com cautela como biofertilizante. Quando utilizado puro, pode levar as plantas a estresse salino, devido a altas doses de potássio e sódio, afetando a germinação de sementes e o desenvolvimento das plantas. Quando o efluente foi diluído, houve redução dos efeitos do excesso de K e Na, mas, conseqüentemente, reduziu a disponibilidade de outros nutrientes essenciais para as plantas de milho. Além disso, alguns nutrientes (cálcio, cobre, magnésio, manganês e zinco) não foram encontrados em quantidade suficientes para suprir a necessidade requerida por plantas de milho.

## 5. REFERÊNCIAS

ANDRADE, Rafael De Paiva *et al.* Fontes, modo de aplicação e translocação de enxofre no desenvolvimento inicial do milho. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 12, p. 32019-32032, 2019.

ANJOS, Danilo *et al.* Trocas gasosas em plantas de feijoeiro submetidas a fitorreguladores, NPK e micronutrientes. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 10, n. 19, 2014.

ARAUJO, A. P; MACHADO, C.T. T. Fósforo. In: FERNANDES, M.S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**, Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006.

AZEVEDO, Josimar *et al.* Produção de biomassa e teores foliares de macronutrientes em abobrinha adubada com fertilizantes orgânicos em diferentes solos. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, 2020.

BARBERO, Leandro Martins *et al.* Análise de crescimento em plantas forrageiras aplicada ao manejo de pastagens. **Veterinária Notícias**, v. 19, n. 2, 2013.

BENEGA, Rodrigo Muziol *et al.* Utilização do biodigestor para tratamento de dejetos da suinocultura. **Ciência Veterinária UniFil**, v. 1, n. 1, p. 136-144, 2018.

BERGAMASCHI, Homero *et al.* Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 831-839, 2004.

CARVALHO, Diego de Oliveira *et al.* Adubação nitrogenada e potássica na severidade da antracnose em dois cultivares de milho. **Revista Ceres**, v. 60, p. 380-387, 2013.

CASTRO, L. R. *et al.* Doses e formas de aplicação de fósforo na cultura do milho. **Revista Agraria**. V.9, n. 31, p. 4-54, 2016.

DE SOUSA, Geocleber Gomes *et al.* Estresse salino e cobertura vegetal morta na cultura do milho. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 12, n. 7, p. 3078-3089, 2018.

DE SOUZA, Eliziete Pereira *et al.* BIOINSUMOS NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PLANTAS DE MILHO. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 12, n. 8, 2021.

DINESHKUMAR, R. *et al.* The impact of using microalgae as biofertilizer in maize (*Zea mays* L.). **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 5, p. 1101-1110, 2019.

DORNAS, Marlos Ferreira *et al.* Eficiência Nutricional e Produtividade de Milho pelo Uso de Biofertilizante Orgânico. **UNICIÊNCIAS**, v. 24, n. 1, p. 14-19, 2020.

DUARTE, Jéssica Rodrigues de M. *et al.* Produtividade e qualidade de sementes de feijão em resposta a fertilizante mineral, biofertilizante e pó de rocha. **Revista Cultura Agrônômica**, v. 30, n. 1, p. 78-92, 2021.

FANCELLI, Antonio Luiz; DE ALMEIDA, Rodrigo Estevam Munhoz. Programa racional para fertilizantes deve considerar fatores que afetam cultivo. **Embrapa Pesca e Aquicultura-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2015.

FARHAT, Nejia *et al.* Effects of magnesium deficiency on photosynthesis and carbohydrate partitioning. **Acta physiologiae plantarum**, v. 38, n. 6, p. 145, 2016.

FRANÇA, Danilo Marques. **Impacto do curto tempo de aplicação de biodigestado sobre a fertilidade do solo e a distribuição das frações humificadas**. 2019. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

FREIRE, J. L. O. *et al.* Teores de micronutrientes no solo e no tecido foliar do maracujazeiro amarelo sob uso de atenuantes do estresse salino. **Agropecuária Técnica**, v. 36, n. 1, p. 65-81, 2015.

GOMES, MATEUS DE PAULA *et al.* Desenvolvimento inicial do milho em resposta a doses de potássio. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 17, n. 1, p. 27-36, 2018.

GOMES, Krishna Ribeiro *et al.* Biofertilizante de codorna nos parâmetros de crescimento de plantas de melão. **REVISTA BRASILEIRA DE AGRICULTURA IRRIGADA-RBAI**, v. 14, n. 5, p. 4248–4257, 2021.

HENRIQUE, Ivanildo Guilherme *et al.* Déficit hídrico e a germinação de sementes de híbridos de milho. **Nativa**, v. 9, n. 3, p. 240-246, 2021.

LACERDA, C. F de *et al.* Evapotranspiration as a criterion to estimate nitrogen requirement of maize under salt stress. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 202, n. 3, p. 192-202, 2016.

LIMA, Carlos José Gonçalves de Souza *et al.* Alterações no solo e produtividade de milho-verde adubado com água residuária da suinocultura. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 1, p. 167-178, 2019.

MARCHI, Cristina Maria Dacach Fernandez; GONÇALVES, Isadora De Oliveira. Compostagem: a importância da reutilização dos resíduos orgânicos para a sustentabilidade de uma instituição de ensino superior. **Revista Monografias Ambientais**, v. 1, p. 1, 2020.

MARROCOS, Saulo de Tácio Pereira *et al.* Composição química e microbiológica de biofertilizantes em diferentes tempos de decomposição. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 4, p. 34-43, 2012.

MATOS, C. F. *et al.* Avaliação do potencial de uso de biofertilizante de esterco bovino resultante do sistema de manejo orgânico e convencional da produção de leite. **Embrapa Solos-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2017.

MENEZES, June Faria Scherrer *et al.* Extração e exportação de nitrogênio, fósforo e potássio pelo milho adubado com dejetos de suínos. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 5, n. 3, p. 55-59, 2018.

MENG, Jun *et al.* Contrasting effects of composting and pyrolysis on bioavailability and speciation of Cu and Zn in pig manure. **Chemosphere**, v. 180, p. 93-99, 2017.

MOHOTTI, Anoma Janaki; LAWLOR, David W. Diurnal variation of photosynthesis and photoinhibition in tea: effects of irradiance and nitrogen supply during growth in the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 367, p. 313-322, 2002.

MORAIS, Naassom Wagner Sales *et al.* Kinetic modeling of anaerobic carboxylic acid production from swine wastewater. **Bioresource technology**, v. 297, p. 122520, 2020.

MOREIRA, Vanessa Ohana Gomes *et al.* Crescimento e fotossíntese do milho cultivado sob estresse salino com esterco e polímero superabsorvente. **IRRIGA**, v. 25, n. 3, p. 603-616, 2020.

MORETTI, Sarah Mello Leite. **Irrigação de dois cultivos de milho com efluente de suinocultura tratado em biodigestor anaeróbio: avaliações no sistema solo-água-ar-planta**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

MUNISWAMI, Durai Murugan *et al.* Comparative assessment of different biofertilizers in maize (*Zea mays* L.) cultivation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-19, 2021.

NASCIMENTO, Andressa de matos *et al.* Biofertilizer application on corn (*Zea mays*) increases the productivity and quality of the crop without causing environmental damage. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 8, p. 1-10, 2020.

NATIONAL GARDENING ASSOCIATION EDITORS. **Corn Growing: Getting Started**. 2019. Disponível em: <https://garden.org/learn/articles/view/400/>. Acesso em: 11 nov. 2020.

OLIVEIRA, F. I. F. *et al.* Crescimento e produção do maracujazeiro amarelo fertirrigado com esterco bovino líquido fermentado. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 38, p. 191-199, 2017.

PASSARIN, Olga M. *et al.* Soybean nutritional status and seed physiological quality with swine wastewater. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, p. 16-21, 2016.

PEDÓ, Tiago *et al.* Growth analysis and assimilate partitioning in physalis plants under leaf fertilization intervals. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 5, p. 2247-2256, 2013.

PRISCO, J. T. *et al.* Physiology and biochemistry of plants growing under salt stress. In: Gheyi, H. R. *et al.* **Manejo da salinidade na agricultura: Estudo básico e aplicados**. 2.ed. Fortaleza: INCTSal, 2016. Cap.12, p.163-180.

RAMIRES, Maiara Figueiredo *et al.* Ecotoxicology of Pig Slaughterhouse Waste Using *Lactuca sativa* L., *Raphanus sativus* L., and *Oryza sativa* L. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 43, 2019.

RAMOS, T. B. *et al.* Two-dimensional modeling of water and nitrogen fate from sweet sorghum irrigated with fresh and blended saline waters. **Agricultural Water Management**, v. 111, p. 87-104, 2012.

ROSA, Danielle M. *et al.* Corn fertilization using swine wastewater and soil-water environmental quality. **Engenharia Agrícola**, v. 37, p. 801-810, 2017.

SANTOS, Marília Cristina *et al.* Efeito do silício, nitrogênio e potássio na incidência da traça-do-tomateiro em plantas para processamento industrial. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, Viçosa, v. 3, n. 2, p. 19-24, 2013.

DOS SANTOS, Débora Teresinha; DA SILVA, Valeska Martins. A suinocultura e os impactos ao meio ambiente. **CIÊNCIA & TECNOLOGIA**, v. 2, n. 2, p. 43-48, 2019.

SANTOS, A. F. *et al.* Tratamento de sementes de milho com zinco semeadas em diferentes profundidades. **Revista Engenharia na Agricultura**.V.27, n.2, p.111-121. 2019.

SARAIVA, Kleiton Rocha *et al.* Efeitos de biofertilizante sobre o crescimento e a biomassa do milho agroecológico no piauí. **Centro de Pesquisas do Cacau Ilhéus-Bahia**, p. 67, 2020.

SILVA, Francisco LB *et al.* Interação entre salinidade e biofertilizante bovino na cultura do feijão-de-corda. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, p. 383-389, 2011.

DA SILVA, Francisca Lacerda *et al.* Biofertilizantes na produção da videira Isabel. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, v. 14, n. 2, p. 211-217, 2019.

SOARES, Marcos Morais *et al.* Estresse hídrico e salino em sementes de soja classificadas em diferentes tamanhos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, p. 370-378, 2015.

TAGLIAFERRE, Cristiano *et al.* Absorption of nutrients by cowpea irrigated with saline water under different leaching fractions. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, p. 1067-1071, 2016.

TAIZ, Lincoln *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

USDA - United States Department of Agriculture. **Natural Resources Conservation Service (NRCS)**. Disponível em: <<https://www.usda.gov/>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

VITTI, G.C *et al.* Cálcio, magnésio e enxofre. In: FERNANDES, M.S(Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.299-324.

XU, Y. *et al.* Accumulation of copper and zinc in soil and plant within ten-year application of different pig manure rates. **Plant, soil and environment**, v. 59, n. 11, p. 492-499, 2013.

XU, Shaoe *et al.* Hydrogen and methane production by co-digesting liquid swine manure and brewery wastewater in a two-phase system. **Bioresource technology**, v. 293, p. 122041, 2019.

ZANUNCIO, Angelita dos S. *et al.* Biofertilizante orgânico na cultura do feijoeiro comum. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, 2020.

### **CAPÍTULO 3 – SUSCETÍVEL INFLUÊNCIA DA SUINOCULTURA NA QUALIDADE DA ÁGUA DO RIO SANTA MARIA DO DOCE-ES**

Autores: Francielen Barroso Aragão<sup>1</sup> • Iasmini Nicoli Galter<sup>1</sup> • Edvar Junior Roncetti Coelho<sup>1</sup> • Tainá Tural da Silva<sup>1</sup> • Marina Marques Bonomo<sup>2</sup> • Marisa Narciso Fernandes<sup>2</sup> • Silvia Tamie Matsumoto<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>) Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

(<sup>2</sup>) Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Humanas, Departamento de Ciências Fisiológicas, CEP 13656-905, São Carlos, SP, Brasil.

\*Autor para correspondência: francielenaragao@gmail.com

Periódico a ser submetido: Environmental Science and Pollution Research, Junho de 2022.

## RESUMO

O crescimento populacional e o uso inapropriado do entorno de rios, trazem prejuízos a qualidade da água, bem como ao funcionamento desses ambientes. Dessa forma se torna importante o monitoramento do rio com associação de parâmetros abióticos com análises biológicas, possibilitando mitigar danos futuros ao ambiente. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto ambiental sobre a qualidade da água do rio pela influência de uma suinocultura localizada na bacia hidrográfica Santa Maria do Doce, ES-Brasil, por meio de parâmetros abióticos de amostras de água do rio e análises toxicogenéticas e bioquímicas em modelos vegetais. Foram realizadas coletas em duas campanhas (maior e menor precipitação) em 3 estações amostrais: a montante da granja de suínos (EA1), próxima da granja de suínos (EA2), a jusante da granja de suínos (EA3). Nas amostras de água foram realizadas as análises de pH, condutividade, amônia, sólidos (totais, fixos e voláteis) e metais pesados. Para as análises biológicas, foram germinadas sementes de *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. em placas de Petri com papel filtro umedecido. A exposição persistiu por 48 horas para o *L. sativa* e 96 horas para *A. cepa*, de acordo com ciclo celular de cada espécie, a 24°C. Como controle negativo (CN) foi utilizado água destilada e como controle positivo trifluralina (0,84 gL<sup>-1</sup>). A partir do material vegetal, foram realizadas análises de germinação (GR), crescimento radicular (CR), análises toxicogenéticas e avaliação de biomarcadores bioquímicos: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione s-transferase (GST), glutathione reduzida (GSh) e peroxidação de lipídios (LPO). Os dados foram submetidos à ANOVA, seguida de teste de média Kruskal Wallis ( $p < 0.05$ ). A análise química demonstrou que apenas o alumínio apresentou valores acima do estabelecido pela legislação em todas as estações amostrais nas duas campanhas. Maior quantidade de matéria orgânica foi observado devido ao aumento dos sólidos voláteis nas estações amostrais EA2 e EA3. Observou-se um aumento da condutividade na EA3 em ambas campanhas. Em relação as análises toxicogenéticas, foi possível observar uma redução significativa no índice mitótico nos EA2 e EA3 (segunda campanha) em *A. cepa* em relação ao CN. Ambos os modelos se apresentaram sensíveis as alterações cromossômicas, onde as estações amostrais EA2 e EA3 apresentaram os maiores índices, principalmente aderência cromossômica. Com relação aos biomarcadores bioquímicos, *L. sativa* apresentou uma diminuição da GSH na 1ª campanha (EA3) e 2ª campanha (EA2 e EA3). Para o sistema de *A. cepa* foi observado um aumento significativo na SOD 1ª campanha (EA1 e EA2) e 2ª campanha (EA2 e EA3), e GST apenas na 2ª campanha em todas as estações amostrais. Os danos observados possivelmente estão relacionados com a atividade humana ao entorno do rio, após receber efluentes da suinocultura (EA2) e esgoto doméstico (EA3). Mas a situação hídrica do rio pode estar corroborando com os resultados, devido à baixa pluviosidade nas duas campanhas.

**Palavras-chave:** Ciclo celular • enzimas • *Allium cepa* • *Lactuca sativa* • Alumínio

## ABSTRACT

Population growth and the inappropriate use of river surroundings damage water quality, as well as the functioning of these environments. Thus, it is important to monitor the river with the association of abiotic parameters with biological analysis, making it possible to mitigate future damage to the environment. The objective of this work was to evaluate the environmental impact on river water quality by the influence of a swine farm located in the Santa Maria do Doce hydrographic basin, ES-Brazil, through abiotic parameters of river water samples and toxicogenetic and biochemical analyses in plant models. Collections were carried out in two campaigns (highest and lowest rainfall) in 3 sampling stations: upstream from the swine farm (EA1), close to the swine farm (EA2), downstream from the swine farm (EA3). In the water samples, analyzes of pH, conductivity, ammonia, solids (total, fixed and volatile) and heavy metals were performed. For biological analysis, seeds of *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. were germinated in Petri dishes with moistened filter paper. Exposure persisted for 48 hours for *L. sativa* and 96 hours for *A. cepa*, according to the cell cycle of each species, at 24°C. As negative control (CN) was used distilled water and as positive control trifluralin (0.84 gL<sup>-1</sup>). From the plant material, analyzes of germination (GR), root growth (CR), toxicogenetic analyzes and evaluation of biochemical biomarkers were performed: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione s-transferase (GST), reduced glutathione (GSh) and lipid peroxidation (LPO). Data were submitted to ANOVA, followed by the Kruskal Wallis mean test ( $p < 0.05$ ). The chemical analysis showed that only aluminum presented values above those established by legislation at all sampling stations in the two campaigns. Greater amount of organic matter was observed due to the increase in volatile solids in sampling stations EA2 and EA3. An increase in EA3 conductivity was observed in both campaigns. Regarding toxicogenetic analyzes, it was possible to observe a significant reduction in the mitotic index in EA2 and EA3 (second campaign) in *A. cepa* in relation to CN. Both models were sensitive to chromosomal alterations, where the sampling stations EA2 and EA3 presented the highest indexes, mainly chromosomal adherence. Regarding biochemical biomarkers, *L. sativa* showed a decrease in GSH in the 1st campaign (EA3) and 2nd campaign (EA2 and EA3). For the *A. cepa* system, a significant increase was observed in SOD 1st campaign (EA1 and EA2) and 2nd campaign (EA2 and EA3), and GST only in the 2nd campaign in all sampling stations. The damages observed are possibly related to human activity around the river, after receiving effluents from swine production (EA2) and domestic sewage (EA3). But the water situation of the river may be corroborating the results, due to the low rainfall in both campaigns.

**Keywords:** Cell cycle • enzymes • *Allium cepa* • *Lactuca sativa* • aluminum

## 1. INTRODUÇÃO

Os rios sempre tiveram papel importante na história da humanidade, devido a necessidade de água para manter as cidades e a subsistências de comunidades na zona rural, principalmente, no emprego de sua água na agricultura, pecuária e consumo humano. O uso desordenado dos seus recursos hídricos e o aumento da descarga de matéria orgânica e de poluentes, conseqüentemente, prejudicam a biodiversidade e a capacidade dos mais diversos usos do rio (BAPTISTA; CARDOSO, 2013; WU *et al.*, 2021).

O rio Santa Maria do Doce nasce na Serra do Gelo no município de Santa Teresa, ES-Brasil a 1000 metros de altitude e percorre os demais municípios de São Roque do Canaã e Colatina, onde desagua no Rio Doce, percorrendo cerca de 93 Km. Seus principais afluentes são rios Santa Júlia, Taboca, Perdido e Vinte e Cinco de Julho (ECOPLAN, 2010). Além da ação humana, muito marcante na região, longos períodos de seca acarretaram grandes prejuízos ao rio e à população local (FERREIRA *et al.*, 2020).

Uma das atividades econômicas desenvolvidas na região é a suinocultura, de grande importância econômica, mas avaliada pelos órgãos ambientais como a atividade agropecuária com os maiores impactos ambientais (RIZZONI *et al.*, 2012). Devido à dificuldade do descarte adequado dos resíduos da suinocultura, composta por restos de ração, água de limpeza das baias, excrementos dos animais e água dos bebedouros (MORAIS *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2019). Desse modo, o descarte irregular pode acarretar graves problemas ambientais como a eutrofização da água e poluição do solo local (CHENG *et al.*, 2019).

Devido à grande importância dos rios, faz-se relevante o biomonitoramento, permitindo conhecer a situação dos recursos hídricos locais e seu padrão de comportamento ao longo do tempo (FINOTTI *et al.*, 2009; GALTER *et al.*, 2021). Uma forma de realizar o monitoramento é com amostragens da água em pontos específicos, por meio de avaliações físicas, química e biológicas que permitem obter informações iniciais da qualidade da água e suas alterações. Complementar essas avaliações, se faz importante associar esses parâmetros com a sistemática de vazão do rio e medidas climatológicas que permitem entender a dinâmica do rio por completo (GALTER *et al.*, 2021; LOVETT *et al.*, 2007; PAIVA; PAIVA, 2016).

O biomonitoramento, associado as análises físico-químicas do ambiente, mostra-se eficaz para identificar os estresses que os ambientes vêm sofrendo, bem

como indicar os possíveis estressores ambientais por meio de respostas bioquímicas, toxicogenéticas, morfológicas e fisiológicas dos organismos expostos a água (COELHO, 2017; DUARTE, 2017; GALTER *et al.*, 2021). Organismos que possuem a capacidade de responder a estresses desse tipo são as plantas, utilizadas com esse intuito, devido as características de baixo custo, rápida resposta ao teste e a sensibilidade aos poluentes (FISKEJÖ, 1985), podendo ser utilizados com a finalidade de monitorar o risco tóxico para análises de toxicidade e bioindicação de poluentes, como resíduos industriais, agrotóxicos e metais pesados (ARAGÃO *et al.*, 2021; SILVEIRA *et al.*, 2017).

Caracterizadas, assim, por uma alta sensibilidade em estudos de fitotoxicidade, citotóxicidade, e até mesmo permitindo visualizar a resposta da ação do poluente a nível de DNA, possibilitando inferir a ação genotóxica dos efeitos da exposição do material genético ao contaminante, mediante a avaliação de mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA (ARAGÃO *et al.*, 2021; VALENTE *et al.*, 2017).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto ambiental da suinocultura localizada nos arredores do Rio Santa Maria do Doce, ES- Brasil, por meio da avaliação da qualidade da água desse ambiente. Para tanto foram utilizadas análises de parâmetros abióticos da água e biomarcadores toxicogenéticos e bioquímicos mensurados nos modelos vegetais *A. cepa* e *L. sativa* expostos as amostras deste ambiente.

## **2. MATERIAIS E METÓDOS**

### *2.1 Área de estudo, amostragem e análise abiótica*

As amostras de água foram coletadas no Rio Santa Maria do Doce, no município de Santa Tereza, Espírito Santo, Brasil, em três estações amostrais: a montante da granja de suínos (EA1) (-19.841292, -40.69815), próxima da granja de suínos (EA2) (-19.830969,-40.681679), a jusante da granja de suínos (EA3) (-19.816185,-40.676743) (Figura 1). Foram realizadas duas campanhas, a primeira no dia 27 de novembro de 2017 (maior precipitação), e a segunda no dia 13 de julho de 2018 (menor precipitação).

Foram avaliados durante a amostragem em campo os parâmetros abióticos: condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), sólidos totais em suspensão ( $\text{mg}/\text{L}$ ) e pH

da água. A amônia (mg/L) presente na água foi quantificada pelo teste rápido. As amostras foram armazenadas em frascos de polietileno, previamente higienizados com solução de ácido nítrico 10%.

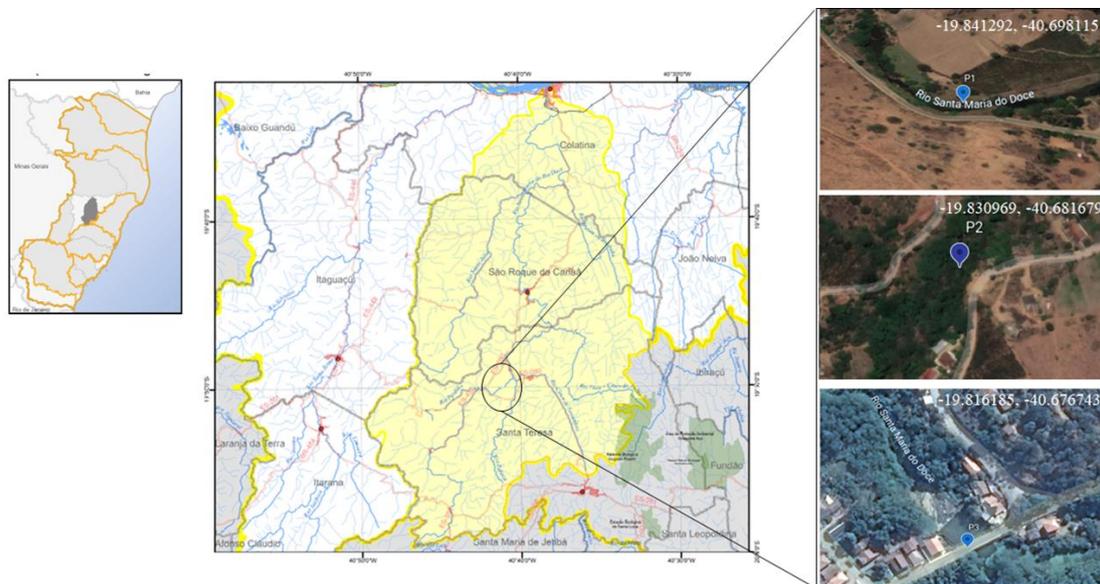


Figura 1: Localização e georreferências das estações amostrais no Rio Santa Maria do Doce.

## 2.2 Caracterização química

Para avaliação dos sólidos totais, fixos e voláteis, foi realizada a metodologia descrito por Matos (2012) onde as amostras foram colocadas em cadinhos previamente pesados com 15 ml de cada amostra, permanecendo em estufa a 105 °C até a evaporação de todo líquido (over night). Em seguida, os cadinhos com as amostras foram resfriados até alcançarem temperatura ambiente e pesados novamente. Posteriormente, foram calcinados em mufla a 550 °C por 30 minutos, repetindo-se o processo de resfriamento e pesagem.

Com intuito de quantificar a presença de metais, as amostras foram submetidas ao procedimento baseado no método U.S. EPA 200.8. A análise foi realizada pela técnica espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, por meio de dois equipamentos, o ICP OES da Thermo Scientific modelo iCAP6000 e ICP MS em aparelho Nexlon 300 D (Perkin Elmer). Os elementos quantificados foram: Alumínio (Al), Arsênio (As), Bário (Ba), Cádmi (Cd), Chumbo (Pb), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Níquel (Ni), Selênio (Se) e Zinco (Zn).

### 2.3 Germinação e crescimento

Foram utilizadas sementes de dois modelos vegetais, *Lactuca sativa* (Alface) variedade Mimosa green salad bowl (Feltrin) e *Allium cepa* (cebola) variedade Baia periforme (Topseed), as sementes eram do mesmo lote em todas as análises. Trinta sementes foram expostas aos tratamentos em placas de petri forradas com papel filtro e embebidas nas amostras de água, abrangendo três estações amostrais para cada campanha (período mais chuvoso e menos chuvoso). O experimento foi montado em Delineamento Inteiramente Casualizado, consistindo-se de 5 placas de Petri por tratamento, sendo cada placa uma repetição. A exposição ocorreu por 48 horas para o *L. sativa* e 96 horas para *A. cepa*, a 24°C sem a presença de luz. Após a exposição, foi avaliado o índice de germinação por meio da contagem das sementes com protrusão de raiz e o crescimento radicular com o auxílio de paquímetro digital (mm). Como controle negativo (CN) foi utilizado água destilada, e trifluralina (0,84 g/L) como controle positivo (CP).

### 2.4 Análises do ciclo celular

As radículas foram fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por no mínimo 24 horas. Para o preparo das lâminas, as raízes foram lavadas com água deionizada, três vezes por cinco minutos, e submetidas a reação de Feulgen onde as raízes foram submetidas a hidrólise ácida com HCl 1M por 9 minutos a 60 °C, foram lavadas em seguida com água deionizada e colocadas em Reativo de Schiff por 45 minutos em ausência de luz, conforme descrito por Mello e Vidal (1978). As lâminas foram confeccionadas pela técnica de esmagamento suave, sendo as lamínulas posteriormente retiradas por congelamento em nitrogênio líquido. As lâminas foram finalizadas com bálsamo do Canadá e cobertas com lamínulas.

Foram avaliadas 1000 células por lâminas, considerando cinco lâminas por tratamento, totalizando 5000 células, conforme descrito por Aragão *et al.* (2015). Foram consideradas as seguintes variáveis: índice mitótico (IM), a porcentagem de cada fase da mitose, frequência de alterações cromossômicas (AC%) (perda cromossômica, quebra cromossômica, aderência cromossômica, pontes cromossômicas e c-metáfase), e a porcentagem de alterações nucleares (AN%) (núcleo condensado e micronúcleo).

## 2.5 Análises de Biomarcadores Bioquímicos

O material vegetal foi germinado como descrito no tópico 2.3. A análise incidiu na quantificação de proteínas totais, enzimas ativadas pela produção de espécies reativas de oxigênio (CAT, SOD e GST), concentração da glutathiona reduzida (GSH) e taxa de peroxidação lipídica (LPO).

Foi utilizado o método de Bradford (1976) para quantificação de proteínas totais, adaptado para microplaca, onde 2  $\mu\text{L}$  da amostra homogeneizada foi adicionado em 240  $\mu\text{L}$  de Coomassie Blue. A leitura das amostras foi realizada com absorvância a  $\lambda = 595 \text{ nm}$ , utilizando-se a albumina de soro bovino como proteína padrão.

### 2.5.1 Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (SOD) foi avaliada por espectrofotometria, seguindo o protocolo de McCord e Fridovich (1969). Realizou-se o preparo do extrato por meio da maceração de 0,3 g de radículas, solubilizando-as em 900  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) a 1 mM. As amostras foram homogeneizadas (ULTRA- TURRAXR, IKA) e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a uma temperatura de 4°C o sobrenadante foi utilizado nas análises.

A reação ocorreu em microplacas onde foram adicionadas 5  $\mu\text{L}$  do sobrenadante com 285  $\mu\text{L}$  de meio de reação (Xantina 50  $\mu\text{M}$ , KCN 20  $\mu\text{M}$ , Citocromo c 10  $\mu\text{M}$ , EDTA 100  $\mu\text{M}$ ). Para o branco, utilizou-se 5  $\mu\text{L}$  de meio de reação. As leituras foram realizadas por um minuto, com intervalos de 15 segundos, em espectrofotômetro com absorvância a 550 nm (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation).

### 2.5.2 Atividade da enzima Catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) foi analisada por meio do método descrito por Beutler (1975). Utilizou-se 0,2g de radículas maceradas em 600  $\mu\text{L}$  de solução tampão (Tris-base 20 mM, EDTA 1mM, Sacarose 0,5 M e Ditiotretol - DTT 1 mM) com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) a 1 mM. Em seguida, o macerado foi centrifugado a 9000 rpm a 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante retirado foi utilizado

para prosseguir com essas análises e também para a realização das análises posteriores (GST, GSH e LPO).

A reação da CAT foi realizada em microplaca composta por 15 µL do sobrenadante a 245 µL de meio de reação (45 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 47 mL de água destilada e 2,5 mL de tampão de reação -Tris-base 1 M, EDTA 5 mM). A leitura foi efetuada em espectrofotômetro com absorvância a 240 nm (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation) durante dois minutos, com intervalos de 15 segundos.

### 2.5.3 Atividade da Glutathione s-transferase (GST)

A análise da Glutathione s-transferase (GST) foi realizada conforme metodologia descrita por Habig e Jakoby (1981) com modificações realizadas por Gallagher *et al.* (1992). A reação foi realizada em microplaca, alíquotando-se 20 µL do sobrenadante, 235 µL de meio de reação (tampão fosfato e CDNB 0,05 M) e 10 µL de GSH a 25 mM. Como branco foi utilizado 15 µL de tampão de homogeneização. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com absorvância a 340 nm (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation), por quatro minutos, com intervalos de 30 segundos.

### 2.5.4 Quantificação da Glutathione Reduzida (GSH)

A glutathione reduzida (GSH) foi quantificada conforme metodologias descritas por White *et al.* (2003) e Gallagher *et al.* (1992). As reações foram compostas por alíquotas de 20 µL do sobrenadante e 20 µL de ácido sulfosalicílico (200 mM), e acondicionadas em microplacas de centrifugação, onde permaneceram incubados por 20 minutos. Ao fim do tempo de incubação, a placa foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos. Foram transferidos 20 µL do sobrenadante para microplaca branca e adicionados 180 µL de solução fluorescente (Trisbase 50 mM, NaOH 500 mM e 2,3-naftalenedicarboxialdeído-NDA 10 mM), seguida por incubação durante 30 minutos. Para o branco, utilizou-se 20 µL de tampão de homogeneização. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com absorvância a 528 nm (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation).

### 2.5.5 Taxa de Peroxidação de Lipídios (LPO)

A peroxidação lipídica (LPO) foi embasada no método de FOX (Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method) descrito por Jiang *et al.* (1991, 1992). A leitura foi realizada em microplaca onde foi disposto 100µL do sobrenadante, 240 µL de meio de reação e 15 µl de PBS. Para o branco foram adicionados 60 µL de tampão de homogeneização. A leitura foi realizada em espectrofotometro com absorbância a 550-570 nm (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation).

### 2.6 Análises estatística

Os resultados obtidos foram apresentados em média  $\pm$  erro padrão. Com a finalidade de verificar a normalidade dos dados foi utilizado o teste Shapiro-Wilks. Os dados foram submetidos análise de variância ANOVA e foi utilizado o teste de Kruskal Wallis ( $P < 0,05$ ) a fim de comparar as médias encontradas entre os tratamentos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização abiótica

Os parâmetros físico-químico avaliados nas estações amostrais do rio Santa Maria do Doce encontram-se representados na Tabela 1. Os valores de pH apresentaram-se próximos ao pH 7 e dentro do valor permitido pela Resolução CONAMA 357/2005. A condutividade apresentou valores acima de 100 µS na estação amostral EA3 (101 µS) nas duas campanhas, a condutividade determina a capacidade da amostra em conduzir a corrente elétrica em função da concentração de íons presentes na água, podendo ser utilizada para detectar fontes de poluição nos ecossistemas aquáticos (ESTEVES, 2011). Valores acima de 100 µS caracterizam ambientes impactados (MANZANO *et al.*, 2014).

Possivelmente, os dados encontrados neste trabalho estão relacionados com o ambiente ao entorno no rio, pois a estação amostral encontra-se dentro de uma região com grande atividade antropogênica (CAMPANHARO, 2010), onde os possíveis despejos irregulares de esgoto contribuem para situação do rio. Galter *et al.* (2021) evidenciaram a condutividade elétrica aumentada em estações amostrais

próximas a área urbana, o resultado, possivelmente, deve-se ao descarte irregular de esgoto doméstico, lançado diretamente no curso do rio.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos das amostras de água do rio Santa Maria do Doce.

Parâmetros	1ª Campanha			2ª Campanha		
	EA1	EA2	EA3	EA1	EA2	EA3
Temperatura °C	28,3	25	27,2	23	22,4	21
pH	7,52	7,51	7,52	7,18	7,3	7,22
Condutividade	99	100	101	96	100	101
STS (mg/L)	49	50	51	47	51	50
Amônia	0,06	0,09	0,09	0,06	0,09	0,09
Sólidos Totais	180	213,33	202,22	137,78	113,33	113,33
Sólidos Fixos	100	115,56	97,78	91,11	62,22	55,56
Sólidos Voláteis	80	97,78	133,33	46,67	51,11	57,78

Além disso, sabe-se que o efluente da suinocultura possui alta taxa de matéria orgânica, nutriente, sólidos suspensos, considerável carga microbiana, bem como resíduos de antibióticos e hormônios (XU *et al.*, 2019), o que pode estar contribuindo com o alto valor de condutância no ponto a jusante da região com atividade de granja de suinocultura.

Em relação aos dados pluviométricos do município de Santa Teresa, a precipitação observada no mês de novembro/2017 foi de 121 mm, enquanto a segunda coleta (julho/2018) apresentou precipitação menor que 15 mm de acordo com dados pluviométricos disponibilizados pelo INCAPER. Os dois períodos apresentaram médias abaixo da série histórica de precipitação mensal, de 230 mm e 50 mm, nos meses de novembro e julho, respectivamente.

Os sólidos totais solúveis (STS) não apresentaram grande variação, mas o acréscimo na quantificação dos sólidos voláteis representou aumento na composição orgânica presente nas estações amostrais EA2 e EA3, em relação a EA1. Os teores de sólidos nas águas estão diretamente relacionados a processos naturais como erosão e matéria orgânica natural presente no ambiente, mas processos antropogênicos, como lançamentos de efluente domésticos e agrícolas bem com lixos sólidos, podem contribuir com o aumento dos teores de sólidos (FUNASA, 2014). O excesso desses sólidos pode trazer prejuízos ao

funcionamento do rio, seja em aspecto físico como o assoreamento do leito do rio, seja prejudicando a ecologia da vida aquática desses ecossistemas (ANA, 2017).

Resultados dos metais quantificados estão apresentados na Tabela 2, na qual os mesmos foram comparados com os valores permitidos pela resolução CONAMA 357/2005. Com exceção do Al que apresentou concentrações superiores estabelecidas em legislação, os elementos quantificados apresentaram níveis dentro do limite estabelecido pela legislação. O alumínio é considerado um dos principais contaminantes de água e solo, sendo transportado por toda cadeia trófica, além de causar sérios problemas aos ecossistemas e à saúde humana (ACHARY *et al.* 2008; KREWSKI *et al.* 2007). Além de toda ação antrópica que o rio sofre, possivelmente o tipo de solo do local, caracterizado como argissolo vermelho-amarelo e latossolos (PARH -SANTA MARIA, 2010), possa estar relacionado com essa concentração de alumínio.

Duarte (2017) relaciona altos níveis de alumínio com as características pedológicas e geológicas da bacia hidrográfica do Rio Santa Maria da Vitória-ES, na qual a composição química e aspectos do solo permitem uma maior disponibilidade do elemento na água. Silva-Filho *et al.* (2013) relatam que essa condição está relacionada com os processos naturais de erosão superficial e lixiviação, que elevam os teores de alumínio principalmente nos períodos chuvosos, e reduzem com o baixo volume de água do rio. Possivelmente, a redução da quantificação de alumínio nas estações amostrais EA2 e EA3, na segunda campanha, se deve principalmente a redução do volume de água no rio, devido ao período crítico de estiagem na região.

Além disso, vale ressaltar, que a poluição aquática é caracterizada pela mistura de componentes químicos, cujas interações por meio de sinergismo ou antagonismo podem alterar a toxicidade da substância isolada (LLORENTE *et al.*, 2012). Como demonstrando por Gazonato (2018), o sulfato de manganês apresenta uma toxicidade reduzida quando isolado mas apresenta um evidente efeito sinérgico ao potencializar os efeitos do sulfato de cobre a organismos bentônicos. As análises de citotoxicidade e genotoxicidade permitem a avaliar a toxicidade da água, especialmente se houver sinergismo, antagonismo ou potencialização de efeitos observados nos componentes presentes na água, os quais não são observáveis em análises abióticas (DUARTE, 2017; GALTER *et al.*, 2021; ZEGURA *et al.*, 2009).

Tabela 2: Metais quantificados em amostras de água do rio Santa Maria do Doce.

Elementos (mg/L)	1ª Campanha			2ª Campanha			Conama 357/2005
	EA1	EA2	EA3	EA1	EA2	EA3	
Al	1,2413	2,0236	2,1222	2,4100	0,6197	0,6518	0,2
As	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,03
Ba	0,0801	0,0856	0,0828	0,0292	0,0547	0,0200	1,0
Cd	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,01
Co	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,2
Cr	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,05
Cu	0,0090	0,0039	0,0112	0,0032	0,0113	0,0054	0,013
Fe	1,4738	1,5041	2,1219	0,7445	1,4761	0,6807	5,0
Mn	0,0409	0,0357	0,0329	0,0408	0,1010	0,0345	0,5
Ni	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,025
Pb	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,033
Se	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,05
Zn	0,0478	0,0325	0,0329	0,0319	0,0238	0,0211	5,0

<LQ: menor que o limite de quantificação.

### 3.2 Análise da germinação, crescimento e ciclo celular

Na avaliação do potencial fitotóxico das amostras, não foram observadas alterações significativas nos parâmetros germinação e crescimento radicular em relação ao controle negativo em nenhuma das estações amostrais, nas duas campanhas realizadas para ambos os modelos vegetais (Figura 2). Esses resultados sugerem que os tratamentos não interferiram significativamente na germinação e crescimento radicular das sementes. Apesar do modelo vegetal *L. sativa* ser muito sensível para avaliação de fitotoxicidade (SILVEIRA *et al.*, 2017), nesse trabalho não foi observado potencial fitotóxico. Além disso, os valores de condutividade e sólidos encontrados demonstram altos teores de matéria orgânica, o que proporciona oferta de nutrientes e contribuiu com o crescimento radicular (ALVIM *et al.*, 2011).

Os estudos de fitotoxicidade são de extrema importância, uma vez que avaliam os estágios iniciais do desenvolvimento de uma planta, sendo a germinação de sementes uma das etapas mais sensíveis para avaliar a toxicidade de amostra de água e sedimentos (GUERRA, 2009). Aliados a parâmetros químicos, a fitotoxicidade pode correlacionar o estresse causado ao organismo teste (BELO, 2011). Apesar desses parâmetros serem importantes indicadores de estresse,

reitera-se a importância de conciliar outros testes que possuem a capacidade de avaliar fatores internos nas células do tecido, como a divisão celular do tecido meristemático que, junto à alongação celular, promovem o crescimento do tecido (HARASHIMA; SCHNITTGER, 2010; TAIZ *et al.*, 2017).

As análises do ciclo celular apontam diminuição significativa no índice mitótico apenas no modelo *A. cepa*, nas estações amostrais EA2 e EA3 (Campanha 2) em relação ao controle negativo, evidenciando uma possível interferência na divisão celular (Tabela 3). Muitas vezes, essa redução do índice mitótico pode estar relacionada ao aumento das alterações cromossômicas (ARAGÃO *et al.*, 2021) e são causados por poluentes ambientais, levando a danos na síntese de DNA e proteínas (ANDRADE *et al.*, 2008; ARAGÃO *et al.*, 2019; CHANDRA *et al.*, 2005). O alumínio, quando absorvido pelas raízes, pode penetrar nas células meristemáticas e afetar a divisão celular, devido ao aumento na rigidez da parede celular, por afetar a absorção e transporte de nutrientes, além de aumentar a estabilidade da dupla hélice, dificultando a replicação do DNA das células (GORDIN *et al.*, 2013; MORIMURA; MATSUMOTO, 1978; ROUT *et al.*, 2001).

Em relação as alterações cromossômicas (tabela 3), ambos modelos responderam de forma similar. As estações amostrais EA2 e EA3 apresentaram aumento significativo em relação ao controle negativo em ambas campanhas para *L. sativa* e na campanha 2 para *A. cepa*. A campanha 1, para o sistema *A. cepa*, apresentou frequência de alterações cromossômicas significativas nas estações EA1 e EA2 em relação ao controle negativo.

Os dois modelos apresentaram-se sensíveis na avaliação de alterações cromossômicas, evidenciando uma possível ação aneugênica das amostras, devido ao alto índice de alterações do tipo aderência cromossômica quando comparada a análise do controle negativo. Entretanto, o aumento de alterações cromossômicas não foi significativo quando comparado entre as campanhas. Com relação as alterações nucleares, frequência de micronúcleos e núcleo condensado, não foi observado diferença significativa entre os tratamentos e as campanhas (Tabela 3).

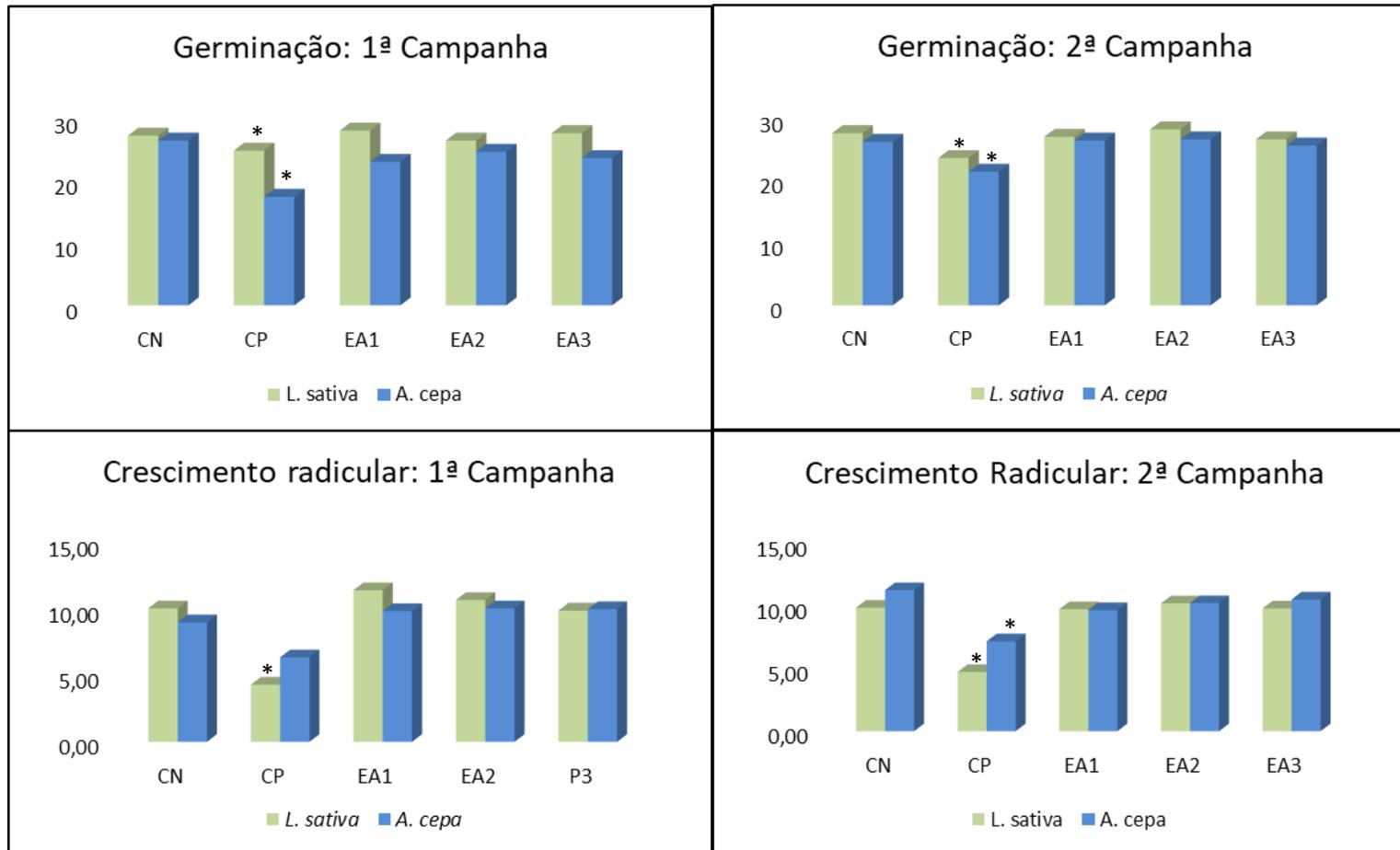


Figura 2. Germinação e crescimento radicular de *L. sativa* e *A. cepa*, após exposição às amostras de água do Rio Santa Maria do Doce. CN: controle negativo; CP: controle positivo. As médias seguidas com (\*) diferem estatisticamente do controle negativo.

Tabela 3: Alterações no ciclo celular em células meristemáticas de *L. sativa* e *A. cepa* expostas a amostras do rio Santa Maria do Doce.

	Tratamentos	Índice Mitótico (IM%)	Prófase (%)	Metáfase (%)	Anáfase (%)	Telófase (%)	Alterações Cromossômicas (%)	Alterações Nucleares (%)	
<i>L. sativa</i>	1º Campanha	CN	9,62 ± 0,2 a	51,41 ± 1,4 b	31,98 ± 1,2 ab	9,78 ± 0,7 a	9,04 ± 1,0 ab	0,62 ± 0,3 a	0 ± 0 a
		CP	14,92 ± 1,4 b	13,19 ± 3,8 a	79,12 ± 5,3 b	5,45 ± 1,4 a	4,38 ± 1,2 ab	72,78 ± 5,6 c	0,66 ± 0,1 b
		EA1	9,08 ± 0,7 a	49,41 ± 2,4 b	27,88 ± 0,8 a	12,95 ± 2,1 a	11,51 ± 1,8 b	3,64 ± 0,4 ab	0,22 ± 0,1 ab
		EA2	8,02 ± 1,1 a	46,44 ± 4,5 b	28,49 ± 1,3 a	14,44 ± 2,9 a	12,6 ± 2,9 b	7,63 ± 0,9 bc	0 ± 0 a
		EA3	9,04 ± 0,3 a	49,34 ± 2,9 b	30,43 ± 2,2 a	11,99 ± 2,8 a	10,14 ± 1,3 b	7,78 ± 0,8 bc	0 ± 0 a
	2º Campanha	CN	8,82 ± 1,1 a	56,21 ± 1,7 c	21,6 ± 2,7 a	14,7 ± 1,6 b	9,32 ± 1,9 ab	0,71 ± 0,3 a	0 ± 0 a
		CP	20,76 ± 1,9 b	11,03 ± 3,1 a	86,49 ± 3,5 b	1,2 ± 0,2 a	3,56 ± 2,9 a	86,95 ± 3,6 c	0,1 ± 0,1 a
		EA1	8,48 ± 0,1 a	49,24 ± 3,4 bc	32,38 ± 3,1 ab	11,72 ± 2,2 b	7,67 ± 2,1 a	5,43 ± 1,0 ab	0 ± 0 a
		EA2	6,96 ± 0,3 a	46,66 ± 2,0 bc	23,65 ± 2,9 a	14,38 ± 2,2 b	14,52 ± 0,8 b	6,89 ± 1,4 b	0 ± 0 a
		EA3	7,84 ± 0,5 a	41,97 ± 2,8 ab	31,96 ± 3,6 ab	16,11 ± 1,2 b	10,41 ± 0,8 ab	7,35 ± 1,6 bc	0 ± 0 a
<i>A. cepa</i>	1º Campanha	CN	9 ± 0,4 a	50,53 ± 4,1 a	22,91 ± 1,7 a	19,58 ± 3,8 a	8,77 ± 2,1 a	0,65 ± 0,4 a	0 ± 0 a
		CP	7,62 ± 0,4 a	40,19 ± 0,6 a	27,74 ± 2,5 a	20,62 ± 3,4 a	12,05 ± 2,9 a	26,86 ± 3,9 c	0 ± 0 a
		EA1	9,12 ± 0,9 a	44,07 ± 1,7 a	21,03 ± 2,0 a	25,38 ± 2 a	11,78 ± 2,6 a	6,14 ± 0,8 bc	0 ± 0 a
		EA2	7,66 ± 0,5 a	46,92 ± 1,1 a	23,41 ± 2,0 a	17,94 ± 1,6 a	11,78 ± 1,1 a	5,69 ± 0,6 b	0 ± 0 a
		EA3	8,44 ± 1,1 a	45,89 ± 4,5 a	24,2 ± 3,2 a	20,97 ± 1,0 a	10,41 ± 2,2 a	4,65 ± 1,2 ab	0 ± 0 a
	2º Campanha	CN	9,44 ± 0,4 b	47,51 ± 2,0 a	20,02 ± 1,9 a	20,26 ± 1,7 a	15,89 ± 2,5 a	0,63 ± 0,3 a	0 ± 0 a
		CP	7,76 ± 0,3 a	37,74 ± 2,4 a	26,77 ± 2,7 a	24,72 ± 3,8 a	11,51 ± 1,5 a	19,76 ± 2 c	0,12 ± 0 a
		EA1	8 ± 0,5 ab	47,48 ± 3,4 a	17,35 ± 3,1 a	18,38 ± 2 a	18,36 ± 1,5 a	6,38 ± 1 ab	0 ± 0 a
		EA2	7,52 ± 0,3 a	41,16 ± 2,9 a	24,27 ± 3,3 a	21,95 ± 2,2 a	13,15 ± 2,1 a	9,03 ± 2,2 bc	0 ± 0 a
		EA3	7,52 ± 0,2 a	52,54 ± 3,6 a	16,26 ± 1,0 a	16,78 ± 3,5 a	14,79 ± 1,3 a	8,45 ± 1,2 b	0 ± 0 a

As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste Kruskal Wallis. CN: controle negativo; CP: controle positivo.

Os mecanismos de ação aneugênica, observados nas alterações cromossômicas avaliadas, caracterizam-se pela inativação do fuso mitótico, impedindo a segregação correta dos cromossomos, durante o processo de divisão celular (Fenech, 2002; Leme; Marin-Morales, 2009). Consequentemente, é comum encontrar células com aderência cromossômica, cuja a metáfase perde sua conformação normal apresentando um aspecto de aglomeração cromossômica. Muitas vezes, esse efeito é atribuído a complexação de agentes tóxicos com os grupos fosfato do DNA na condensação do DNA, ou na formação reticulações inter e intra-cromátides, quando a presença dessas alterações muitas vezes leva a morte das células (EL-GHAMERY *et al.*, 2003).

Possivelmente, essas alterações podem estar relacionadas aos metais pesados encontrados nas amostras, muitas vezes responsáveis por gerar efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em organismos vivos em altas concentrações (GALLO-FRANCO *et al.*, 2020). A concentração de alumínio e sólidos voláteis (matéria orgânica) na campanha 1 apresentou-se superior em relação a campanha 2 provavelmente pelo maior volume de água no rio, oriundo do maior volume de precipitação e escoamento superficial que colabora para o maior carreamento de material particulado sólido e lixiviação de nutrientes para o interior do rio (MAGALHÃES, 2017). Estes processos estão diretamente relacionados com as práticas de manejo do solo que intensificam os processos erosivos e o aumento da disponibilidade de sedimentos e nutrientes (YU *et al.*, 2016).

A alta concentração de alumínio quantificada nas amostras pode ser um dos principais fatores que causaram as alterações, uma vez que o Al é apontado como citotóxico, sendo o cátion formado pela solubilização do alumínio em solos ácidos (alumínio trivalente) um dos elementos mais abundantes e tóxicos em condições ácidas (GALLO-FRANCO *et al.*, 2020). Em células vegetais, o alumínio pode interagir com a parede celular, membranas plasmáticas, cloroplastos e até mesmo o núcleo e seu conteúdo, resultando em danos estruturais e modificações funcionais, prejudicando o funcionamento de diversas rotas do metabolismo da planta (KOCHIAN *et al.*, 2015). Estudos com SPL (resíduo da indústria do alumínio), composto principalmente por alumínio, cianeto e flúor, evidenciam que o alumínio interfere na divisão de células meristemáticas de *A. cepa* e provocam danos ao

DNA, desencadeando até mesmo a morte dessas células (PALMIERI *et al.*, 2016; REIS *et al.*, 2017).

Trabalhos destacam a redução do índice mitótico e aumento de alterações cromossômicas, principalmente aderência cromossômica, em *Allium cepa* e *Vicia faba* submetidas a tratamentos contendo alumínio (ALABI *et al.*, 2020; ZHANG; ZOU, 2020), corroborando com os resultados observados neste estudo. Com os resultados encontrados, foi possível verificar que ambos os modelos possuem uma sensibilidade a estressores ambientais, bem como sendo úteis na avaliação da qualidade da água de rios, corroborando com trabalhos que avaliaram a qualidade do rio, utilizando os mesmos parâmetros em que concluíram que é de grande importância relacionar os parâmetros químicos e físicos a análises a nível celular em modelos vegetais (COELHO, 2017; DUARTE, 2017; GALTER *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2021).

### 3.3 Análises de Biomarcadores Bioquímicos

As análises de biomarcadores bioquímicos demonstraram redução significativa na concentração de GSH em relação ao controle negativo apenas em *L. sativa* na EA3 na primeira campanha e nas estações amostrais EA2 e EA3 da segunda campanha (tabela 4). A atividade da SOD foi significativa para *A. cepa* (tabela 4), com o aumento na atividade da SOD na primeira campanha, nas estações amostrais EA1 e EA2, enquanto na segunda campanha as amostras que diferiram do controle negativo, foram a EA2 e EA3. A concentração de GST apresentou um aumento significativo apenas para *A. cepa*, em todas as estações amostrais (EA1, EA2, EA3) da segunda campanha.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação do sistema de antioxidantes das plantas. Esse desequilíbrio se dá, principalmente, à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), formas reduzidas de oxigênio que, energeticamente, são mais reativas que o oxigênio molecular, subprodutos do metabolismo celular, produzidos principalmente nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (TAIZ *et al.*, 2017). O estresse oxidativo em níveis de desequilíbrio podem trazer consequências as células como danos a proteínas, lipídeos de membrana e até mesmo ao DNA, porém são de grande importância para diversos processos celulares na ativação

das rotas de expressão gênica que conduzem a morte celular programada (TAIZ *et al.*, 2017).

O aumento da atividade de SOD e GSH é indicativo de um possível estresse oxidativo causado por algum composto presentes nas amostras. A atividade da enzima SOD é uma importante forma de avaliar o estresse, pois atua como primeira linha de defesa, além de ser uma das principais enzimas no combate aos danos oxidativo, provocados pelas EROs (CHANDRAN *et al.*, 2005; GILL; TUTEJA, 2010). A SOD atua oxidando e reduzindo o superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (TAIZ *et al.*, 2017).

A GSH também possui papel fundamental na defesa da célula, contra danos celulares provocados pelo estresse oxidativo, atuando na biotransformação e eliminação de compostos químicos (HUBER *et al.*, 2008), assim como também catalisam a destoxificação do peróxido de hidrogênio, por meio da redução da enzima glutathione peroxidase (TAIZ *et al.*, 2017).

A alta quantificação de alumínio pode estar relacionada com as alterações bioquímicas. A toxicidade do alumínio em plantas é caracterizada, principalmente, pelo aumento na produção de EROs e alterações nas propriedades da parede celular (GUPTA *et al.*, 2013). A exposição de plantas ao alumínio leva ao estresse, desencadeando a produção de EROs, principalmente nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, propiciando danos oxidativos aos componentes celulares, caso o sistema antioxidante da planta não seja suficiente (KOCHIAN *et al.*, 2004; SIVAGURU *et al.*, 2013).

O aumento na produção de EROs pode levar a danos no DNA como a quebra das fitas duplas bem como o bloqueio no reparo do DNA danificado, levando, conseqüentemente, à morte celular (DWYER *et al.*, 2012; FOTI *et al.*, 2012). Portanto, esses dados corroboram com as altas taxas de alterações cromossômicas observadas neste trabalho. Células expostas a poluentes ambientes apresentam como principais conseqüências danos ao DNA e o estresse oxidativo, apontando a importância das duas análises simultâneas (ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2011). Estudos recentes utilizaram a análise de biomarcadores bioquímicos associado a análise do ciclo celular em modelos vegetais (*A. cepa* e *L. sativa*), evidenciando de forma mais eficiente os mecanismos de ação dos compostos presentes nas amostras estudadas (COELHO, 2017; DUARTE, 2017; MACAR, 2020; MACAR, 2021; SRIVASTAVA; SINGH, 2020).

Tabela 4: Análise de biomarcadores bioquímicos em raízes de *L. sativa* e *A. cepa* expostas a amostras do rio Santa Maria do Doce.

		Tratamentos	SOD (U/mg)	CAT (nM/mg)	GST (NM/mg)	GSH ( $\mu\text{mol/mg}$ )	LPO (nM/mg)	
<i>L. sativa</i>	1ª Campanha	Controle Negativo	1,36 $\pm$ 0,15 a	27,62 $\pm$ 9,95 a	21,22 $\pm$ 7,50 a	54,16 $\pm$ 17,52 c	20,00 $\pm$ 6,31 a	
		EA 1	17,17 $\pm$ 9,65 a	21,76 $\pm$ 7,43 a	22,40 $\pm$ 4,49 a	17,43 $\pm$ 2,90 bc	34,83 $\pm$ 5,42 a	
		EA 2	13,14 $\pm$ 3,41 a	22,04 $\pm$ 17,22 a	51,72 $\pm$ 23,15 a	21,57 $\pm$ 8,61 abc	54,43 $\pm$ 20,69 a	
		EA 3	4,95 $\pm$ 0,07 a	25,03 $\pm$ 9,55 a	47,15 $\pm$ 11,95 a	5,93 $\pm$ 1,81 ab	35,25 $\pm$ 7,47 a	
	2ª Campanha	EA 1	7,31 $\pm$ 5,32 a	33,1 $\pm$ 16,08 a	21,95 $\pm$ 0,40 a	11,60 $\pm$ 3,11 abc	22,58 $\pm$ 1,83 a	
		EA 2	11,65 $\pm$ 7,21 a	18,05 $\pm$ 1,12 a	31,93 $\pm$ 5,60 a	9,86 $\pm$ 1,35 ab	29,67 $\pm$ 4,09 a	
		EA 3	16,38 $\pm$ 1,42 a	14,76 $\pm$ 7,05 a	30,37 $\pm$ 3,59 a	4,40 $\pm$ 1,73 a	28,47 $\pm$ 3,89 a	
	<i>A. cepa</i>	1ª Campanha	Controle Negativo	20,61 $\pm$ 0,98 a	194,83 $\pm$ 16,52 a	23,21 $\pm$ 2,45 a	0,48 $\pm$ 0,07 a	28,55 $\pm$ 4,15 a
			EA 1	69,20 $\pm$ 14,63 c	58,78 $\pm$ 11,90 a	41,13 $\pm$ 2,28 ab	1,08 $\pm$ 0,31 a	10,38 $\pm$ 2,75 a
EA 2			53,60 $\pm$ 2,68 bc	110,42 $\pm$ 32,44 a	65,76 $\pm$ 13,07 abc	1,24 $\pm$ 0,24 a	25,12 $\pm$ 6,08 a	
		EA 3	38,43 $\pm$ 2,07 ab	84,40 $\pm$ 9,09 a	58,97 $\pm$ 8,44 abc	0,83 $\pm$ 0,10 a	19,14 $\pm$ 3,14 a	
2ª Campanha		EA 1	39,94 $\pm$ 4,97 abc	114,80 $\pm$ 20,40 a	128,44 $\pm$ 18,38 c	1,10 $\pm$ 0,21 a	23,57 $\pm$ 3,96 a	
		EA 2	52,27 $\pm$ 6,21 bc	87,58 $\pm$ 9,46 a	88,69 $\pm$ 15,67 bc	1,02 $\pm$ 0,13 a	30,15 $\pm$ 8,20 a	
		EA 3	60,61 $\pm$ 11,35 bc	89,85 $\pm$ 13,28 a	111,16 $\pm$ 6,71 c	0,94 $\pm$ 0,11 a	19,93 $\pm$ 2,01 a	

As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste Kruskal Wallis. CN: controle negativo; CP: controle positivo.

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo apontam que a maior parte das análises físico-químicas das amostras de água do rio Santa Maria do Doce estão de acordo com a Resolução CONAMA nº 357/2005, porém o nível de alumínio foi superior ao nível permitido pela legislação em ambas as campanhas. Houve aumento na quantificação dos sólidos voláteis nas estações amostrais próximo a granja de suínos (EA2) e jusante a granja (EA3), correspondendo ao aumento da matéria orgânica, possivelmente devido à proximidade dos pontos com a suinocultura e áreas antropizadas. O potencial genotóxico observado por meio das alterações cromossômicas, principalmente nas estações amostrais próximo a granja de suínos (EA2) e jusante a granja (EA3), para ambos os modelos, evidencia a ação de compostos presentes nessas amostras, principalmente o alumínio. Essas alterações, juntamente com as alterações observadas no metabolismo dos modelos vegetais, indicam um possível estresse causado por este elemento, possivelmente devido a complexação de metais pesados com a matéria orgânica, que modifica a disponibilidade dos mesmos aos organismos vivos. Possivelmente outras atividades humanas no entorno do rio, além da suinocultura, podem estar associadas com os danos observados como o despejo de esgoto doméstico, granjas aviárias, pecuária e agricultura. Conclui-se que ambos modelos vegetais foram sensíveis na avaliação da qualidade da água do rio e que a associação dos parâmetros biológicos com as análises físico-químicas possibilitou verificar que o rio se encontra em situação de alerta, devido as interferências humanas, logo, indica-se a necessidade de amplo monitoramento.

## 5. REFERÊNCIAS

ACHARY, V. Mohan Murali *et al.* Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 70, n. 2, p. 300-310, 2008.

ALABI, Okunola A. *et al.* Effect of the duration of use of aluminum cookware on its metal leachability and cytogenotoxicity in *Allium cepa* assay. **Protoplasma**, v. 257, n. 6, p. 1607-1613, 2020.

ALVIM, Luige Biciati *et al.* Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. **Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 6, n. 2, p. 255-265, 2011.

ANA, Agência Nacional de Águas. **Indicadores de Qualidade - Índice de Qualidade das Águas (IQA)**. 2017. Disponível em: <<http://portalpnqa.ana.gov.br/indicadores-indice-aguas.aspx>>. Acesso em: 23 maio 2017.

ANDRADE, Larissa Fonseca *et al.* Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 71, n. 3, p. 706-710, 2008.

ANDRADE-VIEIRA, Larissa Fonseca *et al.* Spent Pot Liner (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 74, n. 4, p. 882–888, 2011.

ARAGÃO, Francielen Barroso *et al.* Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Allelopathy Journal**, v. 35, n. 2, p. 259-272, 2015.

ARAGÃO, Francielen Barroso *et al.* Cyto (geno) toxicity of commercial fungicides based on the active compounds tebuconazole, difenoconazole, procymidone, and iprodione in *Lactuca sativa* L. meristematic cells. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, n. 1, p. 25, 2019.

ARAGÃO, Francielen Barroso *et al.* Toxicogenetic of tebuconazole based fungicide through *Lactuca sativa* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 213, p. 111985, 2021.

BAPTISTA, Márcio Benedito; CARDOSO, Adriana Sales. Rios e cidades: uma longa e sinuosa história. **Revista da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 20, n. 2, p. 124-153, 2013.

BELO, Sara Rodrigues Santos. **Avaliação de fitotoxicidade através de *Lepidium sativum* no âmbito de processos de compostagem**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.

BEUTLER, Ernest. Red cell metabolism. **A manual of biochemical methods**, p. 11-12, 1975.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

Campanharo W. A. **Diagnóstico físico da bacia do rio Santa Maria do Doce-ES**. 2010. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia Florestal, Espírito Santo, 2010.

CHANDRAN, Rashmi *et al.* Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 3-4, p. 422-426, 2005.

CHENG, D. L. *et al.* Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy. **Bioresource technology**, v. 275, p. 109-122, 2019.

COELHO, Edvar Junior Roncetti. **Respostas fisiológicas e citogenéticas em raízes de *Allium cepa* L. expostas às amostras de água e sedimento de três represas da bacia do rio Santa Maria da Vitória (ES, Brasil)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2017.

DUARTE, Ian Drumond. **Rio Santa Maria da Vitoria (ES, Brasil): Avaliações ecofisiológicas e toxicogenéticas em amostras de água, sedimento e elutriado do sedimento**. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2017.

DWYER, Daniel J. *et al.* Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. **Molecular cell**, v. 46, n. 5, p. 561-572, 2012.

ECOPLAN (2010). **Plano Integrado de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Rio Doce e Planos de Ações para as Unidades de Planejamento e Gestão de Recursos Hídricos no Âmbito da Bacia do Rio Doce**. Disponível em: [http://www.cbhdoce.org.br/\\_docs/planobacia/PARH/PARH\\_SM\\_Doce](http://www.cbhdoce.org.br/_docs/planobacia/PARH/PARH_SM_Doce). Acesso em 30 fev 2020.

EL-GHAMERY, A. A. *et al.* Evaluation of cytological effects of Zn<sup>2+</sup> in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 537, n. 1, p. 29-41, 2003.

ESTEVES, Francisco de Assis. **Fundamentos de limnologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

FENECH, Michael; CROTT, Jimmy W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 504, n. 1-2, p. 131-136, 2002.

FERREIRA, Elvis Pantaleão et al. CRISE HÍDRICA NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO SANTA MARIA DO DOCE-ES: CARACTERIZAÇÃO, AVANÇOS E DESAFIOS. **Revista Ifes Ciência**, v. 6, n. 4, p. 114-131, 2020.

FINOTTI, Alexandra R. *et al.* Monitoramento de recursos hídricos em áreas urbanas. **Caxias do Sul: EDUCS**, 2009.

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

FOTI, James J. et al. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 315-319, 2012.

FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. **Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS**. 2014. Disponível em: [http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files\\_mf/manualcont\\_quali\\_agua\\_tecnicos\\_trab\\_emetas.pdf](http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files_mf/manualcont_quali_agua_tecnicos_trab_emetas.pdf). Acesso em: 15 maio 2017.

GALLAGHER, Evan P. *et al.* The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish. **Aquatic toxicology**, v. 23, n. 3-4, p. 155-168, 1992.

GALLO-FRANCO, Jenny Johana *et al.* Epigenetic Control of Plant Response to Heavy Metal Stress: A New View on Aluminum Tolerance. **Frontiers in plant science**, v. 11, 2020.

GALTER, Iasmini Nicoli *et al.* Water assessment of the Itapemirim River/Espírito Santo (Brazil): abiotic and toxicogenetic aspects. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 8, p. 10175-10191, 2021.

GAZONATO, Antônio José. **Avaliação Da Toxicidade De Metais E Pesticidas, Isolados E Em Mistura, Sobre Duas Espécies De Oligochaeta Nativos Neotropicais**. 2018. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2018.

GILL, Sarvajeet Singh; TUTEJA, Narendra. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

SILVA-FILHO, Emmanoel Vieira et al. Influência antrópica nas águas superficiais da cidade de Três Rios-RJ. **Geochimica Brasiliensis**, v. 27, n. 1, p. 77-86, 2013.

GORDIN, Carla Regina Baptista et al. Emergência de plântulas e crescimento inicial do pinhão manso exposto a alumínio. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 147-156, 2013.

GUERRA, Ricardo Consiglierio. **Estudo do lodo gerado em reator biológico, pelo tratamento da água de produção do petróleo, no terminal marítimo Almirante Barroso, município de São Sebastião, SP visando sua disposição final**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

GUPTA, Nidhi *et al.* Molecular basis of aluminium toxicity in plants: a review. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2013, 2013.

HABIG, William H.; JAKOBY, William B. Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1981. p. 398-405.

HARASHIMA, Hirofumi; SCHNITTGER, Arp. The integration of cell division, growth and differentiation. **Current opinion in plant biology**, v. 13, n. 1, p. 66-74, 2010.

HUBER, Paula C.; ALMEIDA, Wanda P.; FÁTIMA, Ângelo de. Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

JIANG, Zhen-Yue *et al.* Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853-856, 1991.

JIANG, Zhen-Yue; HUNT, James V.; WOLFF, Simon P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384-389, 1992.

KOCHIAN, Leon V. *et al.* How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Reviews Plant Biology**, v. 55, p. 459-493, 2004.

KOCHIAN, Leon V. *et al.* Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 571-598, 2015.

KREWSKI, Daniel *et al.* Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 10, n. S1, p. 1-269, 2007.

LEME, Daniela Morais; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LLORENTE, M. T. *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of sewage treatment plant effluents in rainbow trout cells (RTG-2). **water research**, v. 46, n. 19, p. 6351-6358, 2012.

LOVETT, Gary M. *et al.* Who needs environmental monitoring?. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 5, n. 5, p. 253-260, 2007.

MACAR, Oksal. Multiple toxic effects of tetraconazole in Allium cepa L. meristematic cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 8, p. 10092-10099, 2021.

MACAR, Tuğçe Kalefetoğlu. Investigation of cytotoxicity and genotoxicity of abamectin pesticide in Allium cepa L. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 2, p. 2391-2399, 2021.

MCCORD, Joe M.; FRIDOVICH, Irwin. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte cytochrome c (hemocyanin). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

DE MAGALHÃES, Stephanie Freitas Couto. **Avaliação dos fatores que influenciam na dinâmica de nutrientes, material particulado e vazão em pequenas bacias hidrográficas**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Conservação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

MANZANO, Bárbara Cassu *et al.* Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 2, p. 1399-1407, 2015.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. A Reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, p. 30,665-676, 1978.

MORAIS, Naassom Wagner Sales *et al.* Kinetic modeling of anaerobic carboxylic acid production from swine wastewater. **Bioresource technology**, v. 297, p. 122520, 2020.

MORIMURA, Seiichiro; MATSUMOTO, Hideaki. Effect of aluminium on some properties and template activity of purified pea DNA. **Plant and Cell Physiology**, v. 19, n. 3, p. 429-436, 1978.

PAIVA, J. B. D de; PAIVA, E. M. C. D. **Hidrologia aplicada à gestão de pequenas bacias hidrográficas**. Porto Alegre: ABRH, 2016.

PALMIERI, Marcel José *et al.* Cytotoxicity of Spent Pot Liner on *Allium cepa* root tip cells: a comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 133, p. 442-447, 2016.

PARH Santa Maria do Doce, **Plano de Ação de Recursos Hídricos da Unidade de Análise Santa Maria do Doce**, 2010. Disponível em: <[http://www.cbhdoce.org.br/wp-content/uploads/2014/10/PARH\\_SM\\_Doce.pdf](http://www.cbhdoce.org.br/wp-content/uploads/2014/10/PARH_SM_Doce.pdf)>. Acesso em: 17 jun. 2019.

REIS, Gabriela Barreto *et al.* Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 142, p. 110-116, 2017.

RIZZONI, Leandro Beça *et al.* Biodigestão anaeróbia no tratamento de dejetos de suínos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 18, p. 1-20, 2012.

ROUT, G. *et al.* Aluminium toxicity in plants: a review. **Agronomie**, v. 21, n. 1, p. 3-21, 2001.

SILVEIRA, Graciele Lurdes *et al.* Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359-367, 2017.

SIVAGURU, Mayandi *et al.* Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 132, n. 4, p. 2256-2266, 2003.

SOUZA, Tatiana da S. *et al.* Cytogenotoxicity of the water and sediment of the Paraopeba River immediately after the iron ore mining dam disaster (Brumadinho, Minas Gerais, Brazil). **Science of The Total Environment**, v. 775, p. 145193, 2021.

SRIVASTAVA, Akhileshwar Kumar; SINGH, Divya. Assessment of malathion toxicity on cytophysiological activity, DNA damage and antioxidant enzymes in root of *Allium cepa* model. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2020.

TAIZ, Lincoln *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VALENTE, Daniel *et al.* Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, 2017.

XU, Shaoe *et al.* Hydrogen and methane production by co-digesting liquid swine manure and brewery wastewater in a two-phase system. **Bioresource technology**, v. 293, p. 122041, 2019.

WHITE, Collin C. *et al.* Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. **Analytical biochemistry**, v. 318, n. 2, p. 175-180, 2003.

WU, Zhaoshi *et al.* Water quality assessment of rivers in Lake Chaohu Basin (China) using water quality index. **Ecological Indicators**, v. 121, p. 107021, 2021.

YU, Songyan *et al.* Effect of land use types on stream water quality under seasonal variation and topographic characteristics in the Wei River basin, China. **Ecological Indicators**, v. 60, p. 202-212, 2016.

ZHANG, Huiming; ZOU, Jinhua. Cellular toxicity of aluminum in root tips of *Vicia faba* L. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 29, n. 2, 2020.

ŽEGURA, Bojana *et al.* Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1453-1460, 2009.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização deste trabalho foi possível avaliar o risco tóxico que os efluentes de biodigestor de suinocultura podem ocasionar ao ambiente. Foi constatado a inibição da germinação e redução do crescimento radicular nos tratamentos dos efluentes em altas concentrações, além do potencial de citotoxicidade e genotoxicidade, observadas por meio de alterações do índice mitótico e alterações cromossômicas nos modelos *Allium cepa* e *Lactuca sativa*. As alterações no metabolismo, possivelmente estão relacionadas com os metais, como zinco e cobre, observados em altas quantidades no resíduo bruto.

O efluente da lagoa de estabilização quando utilizado como biofertilizante, deve ser aplicado com cautela de acordo com cada cultura devido a diferente necessidade nutricional de cada planta. O efluente apresentou baixas concentrações de cálcio, cobre, magnésio, manganês e zinco para plantas de milho. Os tratamentos com altas concentrações do efluente provocaram estresse salino nas plantas, afetando a germinação e desenvolvimento das plantas. Com a diluição do efluente ocorreu a diminuição da concentração de sais, reduzindo assim o estresse salino, e conseqüentemente reduziu a concentração de outros nutrientes, possivelmente ocasionando uma deficiência nutricional ainda maior nas plantas.

A ação humana, como a suinocultura, o despejo de esgoto doméstico, granjas aviárias, pecuária e agricultura, no entorno do rio, interferem na qualidade da água do rio Santa Maria do Doce. Essas atividades podem estar relacionadas aos resultados encontrados. A presença do alumínio nas amostras de água acima do permitido pelo CONAMA, possivelmente está associada com os danos encontrados, como alterações cromossômicas, principalmente nas estações amostrais próximo a granja de suínos (EA2) e jusante a granja (EA3) para ambos os modelos. Porém é importante considerar a complexação de metais pesados com a matéria orgânica, na qual pode interferir na disponibilidade dos metais aos organismos vivos, a menor pluviosidade interfere nessa complexação, ocasionando uma maior concentração de sólidos no curso do rio (Anexo I).

## ANEXOS

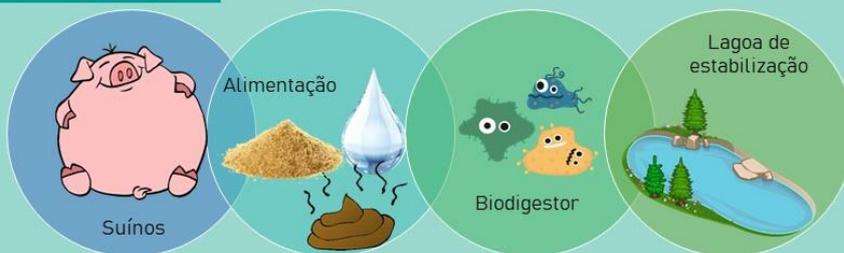
## Suinocultura e a produção de resíduos

O Brasil é 4º maior produtor de carne suína no mundo, representando uma importância na economia do país. Mas o processo produtivo gera uma grande quantidade de resíduos, e o manejo inadequado dos dejetos suínos pode levar à contaminação do meio ambiente, representando risco à sustentabilidade e expansão da suinocultura como atividade econômica.



1

### Processo Produtivo



2

### Poluição



3

### Estudos de Toxicogenética



4

### Reaproveitamento

