

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

MARINA MARQUES BONOMO

EFEITOS CITOGENÉTICOS, BIOQUÍMICOS, MORFOLÓGICOS E
ANATÔMICOS DA APLICAÇÃO DE LODO DE ESGOTO
HIGIENIZADO EM *Carica papaya* L.

VITÓRIA

2014

MARINA MARQUES BONOMO

EFEITOS CITOGENÉTICOS, BIOQUÍMICOS, MORFOLÓGICOS E
ANATÔMICOS DA APLICAÇÃO DE LODO DE ESGOTO
HIGIENIZADO EM *Carica papaya* L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof^a Dr^a Silvia Tamie Matsumoto
Co-orientador: Dr^a Adelaide de Fátima Santana da Costa.

VITÓRIA

2014

MARINA MARQUES BONOMO

“EFEITOS CITOGENÉTICOS, BIOQUÍMICOS, MORFOLÓGICOS E ANATÔMICOS DA APLICAÇÃO DE LODO DE ESGOTO HIGIENIZADO EM *Carica papaya* L.”

Dissertação 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 Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 14 de Fevereiro de 2014.

COMISSÃO EXAMINADORA



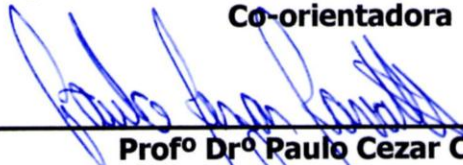
Profª Drª Silvia Tamie Matsumoto

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal-UFES
Orientadora



Profa. Dra. Adelaide de Fátima Santana Costa

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal-UFES
Co-orientadora



Profº Drº Paulo Cezar Cavatte

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - UFES
Examinador Interno



Profª Drª Maria Aparecida Marin-Morales

UNESP-SP
Examinador Externo

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez tua
rosa tão importante.”

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

A meus pais e irmã, por toda a ajuda durante o desenvolvimento do projeto e pela compreensão nos meus períodos de ausência e trabalho intenso.

À Universidade Federal do Espírito Santo, pelo ensino e infraestrutura durante toda minha formação. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa para o mestrado. À Maria de Fátima Lima e à Companhia Espírito Santense de Saneamento (CESAN) por todo o apoio na concessão do material para desenvolvimento do projeto. Ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), Afonso Carlos Valentim, Clair Barboza e Renato Altoé por todo o auxílio no processo de coleta e tratamento do resíduo e preparo das mudas. Ao Laboratório de Química Analítica da UFES, pelo apoio nas etapas do projeto.

À Prof^a Dr^a Silvia Tamie Matsumoto, por todos os anos de ensinamento, compreensão e apoio, por se tornar uma outra mãe para todos os momentos. À Dr^a Adelaide de Fátima Santana da Costa, pelo imenso apoio e por possibilitar o desenvolvimento do projeto. À Prof^a Dr^a Camilla Rozindo Dias Milanez, por auxiliar de forma paciente nas análises anatômicas, sua disponibilidade em nos ajudar a qualquer hora e dia da semana e por aceitar se membro da banca examinadora. À Prof^a Dr^a Marisa Narciso Fernandes, por disponibilizar seu laboratório para realização de parte do projeto e por abrir portas para um novo caminho a seguir. À Prof^a Dr^a Maria Aparecida Marin Morales, por sua disponibilidade e prontidão em aceitar ser membro da banca examinadora. Aos professores Dr Leonardo Barros Dobbss e Dr Paulo Cezar Cavatte também por aceitarem serem membros da banca examinadora. Aos professores e colegas (em especial, Leonardo e Frederico) do Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal pelos conhecimentos compartilhados.

À toda minha família, por compor a base da minha formação e meu porto seguro em todos os momentos. À toda equipe GEMUT, especialmente à Mariana, Lívia e Ian por todos esses anos de convivência e apoio na realização do trabalho, por se tornarem essenciais na minha vida. À Iara, que em tão pouco tempo nos mudou tanto e de forma tão positiva. À Bete e todos os amigos da Biologia, novos ou de longa data (em especial, Dayana e Jordana), pelos encontros de café, conversas descontraídas e momentos de troca de desespero. A todos que fizeram parte deste processo, afastados pela distância ou que não mais estão aqui, nada disso seria possível sem a passagem de cada um em minha vida.

RESUMO

A aplicação de lodo de esgoto na agricultura é uma prática crescente em muitos países devido a seus inúmeros benefícios para o solo e para as plantas, representando uma alternativa de disposição final prática e proveitosa para o resíduo. A utilização do lodo contribui no ciclo bioquímico dos nutrientes minerais e serve como fonte de matéria orgânica, micro e macronutrientes para o solo e para a cultura, promovendo um estímulo no crescimento da planta, principalmente de espécies de alta exigência nutricional. Porém, é de extrema importância que seja realizado o monitoramento dos efeitos do resíduo sobre os organismos expostos, considerando a presença de contaminantes e seu potencial tóxico para o ambiente. O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas biológicas da aplicação agrícola de doses crescentes de lodo de esgoto higienizado, por meio da integração destas com análises químicas, visando elucidar os benefícios e potenciais riscos da utilização deste resíduo. Para isso, foram realizadas avaliações morfológicas, anatômicas, fisiológicas e bioquímicas em *Carica papaya*, em adição a análises citogenéticas por meio do teste de *Allium cepa*. Os teores nutricionais observados nas análises químicas corroboram o potencial de utilização do lodo de esgoto higienizado como insumo agrícola, bem como os baixos níveis dos contaminantes analisados fazem com que o resíduo esteja dentro dos padrões exigidos pela legislação. Por outro lado, as análises dos efeitos citogenéticos observados em *A. cepa* e bioquímicos complementam os resultados observados na avaliação de crescimento de *C. papaya* para a confirmação de que a dosagem a ser aplicada no solo deve visar o suprimento das necessidades nutricionais da planta, porém sem causar danos e exigências metabólicas mais severas.

Palavras-chave: mamão, *Allium cepa*, estresse oxidativo, crescimento vegetal, anatomia vegetal, resíduo sólido.

ABSTRACT

The agricultural application of sewage sludge application is a growing practice in many countries due to its several soil and plant benefits, representing a practical and beneficial final disposition of this residue. Sewage sludge application contributes in the nutrient biochemical cycle, serving as an organic matter and nutrient input to the soil and the crop, stimulating plant growth, mainly in species with high nutritional requirement. However, monitoring the effects of the residue utilization is a crucial tool, considering the presence of contaminant and its toxic potential to organisms. The aim of this study was to evaluate the biological response to the application of sewage sludge through its integration with chemical analysis, in order to elucidate the benefits and potential risks of this residue utilization. In this context, morphological, anatomic, physiological and biochemical analysis were performed in *Carica papaya*, in addition to cytogenetic analysis through *Allium cepa* test. Nutritional levels observed in chemical analysis corroborate the sewage sludge potential of utilization as crop fertilizer, as well as the low contaminant levels make this residue within the limits required by legislation. Moreover, the cytogenetic effects observed in *A. cepa* and the biochemical analysis in *C. papaya* complement the results observed in *C. papaya* growth evaluation to endorse that the residue dosage to be applied must supply the plant nutritional requirement without induce damages and several metabolic demands.

Keywords: papaya, *Allium cepa*, oxidative stress, plant growth, plant anatomy, solid residue.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

Figura 1: Resposta de dose-dependência dos parâmetros de crescimento de indivíduos de *C. papaya*. (A) Incremento de raiz; (B) Incremento de parte aérea; (C) Diâmetro do caule; (D) Comprimento do caule; (E) Número de folhas; (F) Área foliar. 53

Figura 2: Avaliação qualitativa da anatomia com floroglucinol para detecção de estruturas lignificadas no floema e xilema (destacadas em rosa) da raiz de indivíduos de *C. papaya*. (A) Tratamento somente com solo testemunha (sem adição de lodo de esgoto higienizado); (B) Tratamento com 400 mg de N dm⁻³, maior dosagem aplicada de lodo de esgoto higienizado. FL: floema, XI: xilema. 55

Artigo 2

Figura 1: Avaliação citogenética em *A. cepa*. (A) Comprimento de raiz; (B) Índice Mitótico. ST: Solo Testemunha, LH: Lodo Higienizado. 77

Figura 2: Avaliação citogenética em *A. cepa*. (A) Índice de Aberrações Cromossômicas; (B) Índice de Mutagenicidade em células meristemáticas; (C) Índice de Mutagenicidade em células F1. ST: Solo Testemunha, LH: Lodo Higienizado. 77

Figura 3: Danos observados em *A. cepa* (indicados pela seta). (A) Ponte cromossômica; (B) Perda cromossômica; (C) C-metáfase; (D) Micronúcleo. 78

LISTA DE TABELAS

METODOLOGIA

Tabela 1: Descrição dos tratamentos analisados. 22

Artigo 1

Tabela 1. Caracterização elementar das amostras de lodo de esgoto higienizado e do solo testemunha. Valores expressos em média \pm DP. 48

Tabela 2. Caracterização elementar e concentração de nutrientes no solo e em folhas e raízes de *C. papaya* (n=3 para cada dosagem). Valores expressos em média \pm DP (g kg⁻¹ de massa seca). FBC: fator de bioconcentração, Ft: fator de translocação, ST: solo testemunha. 49

Tabela 3. Resultados da avaliação de crescimento vegetal em indivíduos de *C. papaya* (n=5 para cada dosagem). Valores expressos em média \pm DP. ST: solo testemunha, Áf: área foliar, Nf: número de folhas, PA: parte aérea, TCR: taxa de crescimento relativo, NA: não avaliado. 52

Tabela 4. Resultados da avaliação de pigmentos fotossintetizantes e análise de densidade estomática em indivíduos de *C. papaya* (n=5 para cada dosagem). Valores expressos em média \pm DP. Ca: clorofila a, Cb: clorofila b, Ct: clorofilas totais, Carot: carotenoides. 56

Artigo 2

Tabela 1. Avaliação química do lodo de esgoto bruto para enquadramento nas condições estabelecidas pela legislação. 69

Tabela 2. Caracterização elementar das amostras de lodo de esgoto higienizado e do solo testemunha. Valores expressos em média \pm DP (% para N, C e H e mg kg⁻¹ de massa seca para demais elementos). 71

Tabela 3. Análise enzimática em folhas de *C. papaya* (n=3 para cada dosagem). Valores expressos em média \pm DP (μ g g⁻¹ de massa seca). 74

Tabela 4. Avaliação genética de dosagens de lodo de esgoto tratado em *A. cepa* (n=5). Valores expressos em média \pm DP. CN: controle positivo, CP: controle positivo. 76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 PROCESSO DE GERAÇÃO E TRATAMENTO DO LODO DE ESGOTO.....	13
2.2 USO DO LODO DE ESGOTO NA AGRICULTURA	15
2.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS E NUTRICIONAIS DO MAMOEIRO	16
2.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	17
2.5 AVALIAÇÃO DE RESPOSTAS CITOGENÉTICAS EM PLANTAS	18
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4 METODOLOGIA	22
4.1 TRATAMENTO E COLETA DO LODO DE ESGOTO	22
4.2 DETERMINAÇÃO DAS DOSAGENS A SEREM AVALIADAS	22
4.3 ÁREA DE ESTUDO	23
4.4 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE	23
4.4.1 Preparo dos solubilizados	23
4.4.2 Ensaio <i>Allium cepa</i>	23
4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
4.6 ANÁLISE QUÍMICA	26
4.7 ANÁLISE DOS FATORES DE BIOCONCENTRAÇÃO E TRANSLOCAÇÃO	26
4.8 ANÁLISES DE CRESCIMENTO	27
4.9 ANÁLISES ANATÔMICAS	27
4.9.1 Análises Anatômicas Quantitativas	27
4.9.2 Análises Anatômicas Qualitativas	28
4.10 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PIGMENTOS	28
4.11 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	29
4.11.1 Concentração de proteína	29
4.11.2 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	29
4.11.3 Atividade da enzima catalase (CAT)	30
4.11.4 Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX)	30
4.11.5 Atividade da enzima glutationa S-transferase (GST)	31
4.11.6 Atividade das enzimas ATPase total e H⁺-ATPase	31
4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32

5 REFERÊNCIAS	33
6 RESULTADOS	41
Artigo 1	41
Artigo 2	63
7 CONCLUSÕES	85

1 INTRODUÇÃO

O constante desenvolvimento de áreas urbanas e o conseqüente aumento da produção de efluentes sanitários correspondem aos principais fatores que levam à poluição de recursos hídricos. Devido às exigências legais de tratamento de efluentes urbanos e a crescente demanda de instalações de estações de tratamento de esgoto (ETEs), tem havido investimentos significativos nesse setor pelas empresas de saneamento ambiental (BETTIOL; CAMARGO, 2006a; LIMA et al., 2011).

Os processos de tratamento de efluentes sanitários levam à geração de um resíduo composto por um alto teor de matéria orgânica e de biomassa microbiana, genericamente denominado de lodo (CEC, 1986; USEPA, 1993; BETTIOL; CAMARGO, 2006a; LIMA et al., 2011). Usualmente, após o processo de geração do lodo bruto, são realizadas etapas adicionais de tratamento, como a adição de cal virgem para redução do teor de patógenos, visando melhorar e permitir sua destinação final (USEPA, 1993; LIMA et al., 2011). Dentre as alternativas de destinação final, as mais comumente aplicadas são a utilização como insumo agrícola, disposição em aterros, reutilização industrial e incineração (LIMA et al., 2011).

A disposição agrícola de efluentes é uma prática antiga e, considerando os altos teores de matéria orgânica, umidade e concentração de nitrogênio e outros minerais, o lodo de esgoto tem sido cada vez mais utilizado como condicionador de solo ou fertilizante (BETTIOL; CAMARGO, 2006b; LIMA et al., 2011). Assim, a utilização do lodo como insumo agrícola contribui para o ciclo biogeoquímico dos nutrientes minerais e serve como fonte de matéria orgânica e de micro e macro-nutrientes para o solo. Sua aplicação agrícola confere uma maior capacidade de retenção de água no solo e resistência à erosão, diminuição do uso de fertilizantes minerais e possivelmente uma maior resistência das plantas aos fitopatógenos (FERNANDES; SILVA, 1999). Porém, a utilização do lodo na agricultura é recomendada desde que haja um controle eficiente de sua estabilidade e de seu conteúdo químico e biológico. Para isso, existem regulamentações específicas que determinam as condições para que este possa ser utilizado como fertilizante agrícola (CEC, 1986; USEPA, 1993; BRASIL, 2006; LIMA et al., 2011).

A espécie *Carica papaya* L. é uma planta herbácea tipicamente tropical, amplamente cultivada em quase todos os países da América tropical e de particular importância econômica para estados brasileiros (DANTAS, 2000; CAMPOSTRINI; GLENN, 2007). Considerando seu cultivo tradicionalmente em solos com baixos teores de matéria orgânica e pobre em nutrientes, o

nitrogênio (N) é um dos elementos mais exigidos pelo mamoeiro (SOUZA et al., 2000a). Estudos de viabilidade técnica do uso de lodo de esgoto em culturas agrícolas foram, inicialmente, desenvolvidos com a cultura de *C. papaya*, onde foi observado um aumento na produção do mamoeiro, diretamente proporcional ao aumento das doses do lodo higienizado com cal virgem (COSTA et al., 2011). Porém, estudos aprofundados dos efeitos da aplicação do resíduo no desenvolvimento vegetativo da espécie ainda são escassos.

Os estudos sobre análise de crescimento de espécies vegetais são realizados para acompanhar o desenvolvimento das plantas como um todo e para obter informações sobre a contribuição dos diferentes órgãos no crescimento total do vegetal. É também um instrumento aplicado com o objetivo primordial de gerar uma descrição clara do padrão de crescimento da planta ou de partes dela, possibilitando comparações entre situações distintas, aplicáveis às mais diversas modalidades de estudos (NOGUEIRA; CONCEIÇÃO, 2000). Aliada a esta análises, avaliações bioquímicas, anatômicas e citogenéticas, juntas, permitem uma maior compreensão dos efeitos ambientais de xenobiontes e suas diferentes concentrações, servindo como alerta para garantia da qualidade ambiental. Dentre as espécies utilizadas na avaliação de dano genético, *Allium cepa* tem se destacado, devido ao pequeno número ($2n = 16$) e grande tamanho de seus cromossomos, além de possuir alta sensibilidade na detecção de agentes químicos (FISKESJÖ, 1985).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes dosagens de lodo de esgoto, tratado e higienizado com cal virgem, no crescimento inicial de *C. papaya*, por meio de análises morfológicas, fisiológicas, anatômicas e bioquímicas, bem como os possíveis efeitos genéticos deste resíduo, utilizando para este fim o teste de *Allium cepa*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROCESSO DE GERAÇÃO E TRATAMENTO DO LODO DE ESGOTO

O constante desenvolvimento de áreas urbanas e o conseqüente aumento da produção de efluentes sanitários correspondem aos principais fatores de poluição de recursos hídricos. A falta de instalações de estações de tratamento ou de condições de saneamento podem levar à proliferação de doenças e à contaminação dos ambientes expostos aos corpos d'água contaminados. Dessa forma, a implantação de estações de tratamento de esgoto (ETEs), e a melhoria das já existentes, têm sido alvo de investimento de companhias de saneamento ambiental, para atender à crescente demanda e à legislação vigente (BETTIOL; CAMARGO, 2006a; LIMA et al., 2011).

Os processos de tratamento de efluentes sanitários visam à separação da parte líquida para que esta possa ser devidamente tratada e, posteriormente, liberada em corpos receptores sem conseqüências para o meio ambiente (USEPA, 1993; BETTIOL; CAMARGO, 2006a). Nesse processo, ocorre a geração de um resíduo (parte semi sólida), composto por um alto teor de matéria orgânica, teores variados de compostos inorgânicos e uma biomassa microbiana, genericamente denominado de lodo (CEC, 1986; USEPA, 1993; LIMA et al., 2011).

A quantidade de lodo gerada varia em função da tecnologia utilizada em seu tratamento, de sua origem (oriundo de áreas predominantemente residenciais ou industriais), época do ano e condições socio-econômicas da população geradora. Dessa forma, o tratamento de efluente em lagoas de estabilização retém o lodo produzido por vários anos, sofrendo processos de digestão e adensamento, gerando menor volume do resíduo, enquanto no tratamento por meio de sistema de lodo ativado a digestão é relativamente baixa, produzindo maiores volumes do lodo a ser tratado (LIMA et al., 2011).

Por se tratar de um resíduo proveniente de atividade humana, o lodo de esgoto doméstico apresenta elevada concentração de microorganismos, sendo muitos deles considerados patógenos, com sua quantidade diretamente proporcional às condições sanitárias da comunidade atendida. O lodo também pode conter contaminantes químicos, como poluentes orgânicos e metais como cobre, mercúrio e zinco, encontrados geralmente em concentrações reduzidas, o que geralmente não leva a problemas de toxicidade para plantas e animais. Os poluentes orgânicos, como hidrocarbonetos aromáticos, pesticidas e outros materiais persistentes tóxicos, quando detectados

no lodo bruto, devem ser monitorados para identificação da fonte de contaminação (LIMA et al., 2011).

Usualmente, após o processo de geração do lodo bruto, são aplicadas etapas de tratamento do resíduo para a melhoria de suas condições e, conseqüentemente, para a sua posterior destinação final. A remoção da umidade promove uma redução no volume do resíduo gerado, levando a menores custos com transporte, disposição e melhoria das condições de manejo. Posteriormente, a fração biodegradável do lodo é estabilizada, podendo ser feita por meio de processos de higienização, reduzindo o risco de putrefação e a concentração de patógenos (USEPA, 1993; LIMA et al., 2011).

A higienização não desativa totalmente os patógenos presentes no lodo, porém os reduzem a níveis que não representem riscos à saúde da população, aos trabalhadores que manipularão o resíduo e ao meio ambiente exposto a ele. A caleação consiste no processo de higienização, por meio da mistura de cal virgem (CaO) ao lodo em proporções que podem variar de 20 a 50% do peso seco do lodo, representando um processo de baixo custo e comumente utilizado no setor de saneamento (LIMA et al., 2011).

A estabilização alcalina com cal virgem leva a uma reação exotérmica, com uma conseqüente elevação da temperatura e do pH, até que a mistura estabilize, e liberação dos odores devido, à volatilização da amônia. Após o tratamento, o lodo deve ser submetido a um período de maturação de 30 a 60 dias, tempo necessário para que a higienização se complete. Dessa forma, a diminuição dos níveis de patógenos ocorre de forma eficaz, desde que o período de carência e a dosagem de cal virgem utilizada sejam feitos de acordo com o estabelecido (LIMA et al., 2011).

A universalização dos serviços de coleta e tratamento de esgoto levará a um aumento representativo no volume de lodo a ser tratado e disposto. Assim, se torna essencial que as empresas de saneamento considerem a adoção de tecnologias de tratamento de efluentes que produzam menores quantidades do resíduo, além do constante monitoramento das alternativas de disposição final para o lodo, como o uso agrícola, a disposição em aterro sanitário, o reuso industrial, a recuperação de solos e *landfarming* (CEC, 1986; USEPA, 1993; LIMA et al., 2011).

2.2 USO DO LODO DE ESGOTO NA AGRICULTURA

A disposição agrícola de efluentes é considerada uma prática antiga, com dados originários na Grécia Antiga e na China, onde os solos de plantios ao redor da cidade eram fertilizados com esgoto, canalizados em sistemas com regulagem de fluxo até as áreas de cultivo (BETTIOL; CAMARGO, 2006b; LOPES; GUILHERME, 2007). Considerando os altos teores de matéria orgânica, umidade e concentração de nitrogênio e outros minerais, o lodo gerado do tratamento de efluentes tem despertado o interesse agrônomo, sendo cada vez mais utilizado como condicionante de solo agricultáveis ou como fertilizante (LIMA et al., 2011).

Para o uso do lodo na agricultura, devem ser considerados todos os aspectos referentes à composição do resíduo, como seus teores de poluentes e patógenos. Dessa forma, a reciclagem do lodo é recomendada, desde que haja um controle eficiente de sua estabilidade e de seu conteúdo biológico e químico (LIMA et al., 2011). Assim, a regulamentação para a disposição apropriada do lodo de esgoto na agricultura deve ser específica para cada estado, região ou país, levando em consideração as condições ambientais, sociais e econômicas e visando a adequação ambiental das áreas de aplicação e das culturas que serão exploradas (CEC, 1986; USEPA, 1993; BRASIL, 2006; LIMA et al., 2011).

Os efeitos da aplicação da matéria orgânica no solo são passíveis de observados em longo prazo, pois apresentam um importante papel na dinâmica dos solos, podendo alterar as características físicas, químicas e biológicas do substrato onde foram aplicadas. Já os efeitos dos nutrientes podem ser observados em curto e médio prazo, onde que a taxa de aplicação não deve gerar um aporte superior à quantidade que a planta precisa para seu desenvolvimento, evitando riscos de lixiviação e contaminação secundária (LIMA et al., 2011).

Assim, a utilização do lodo como insumo agrícola contribui no ciclo bioquímico dos nutrientes minerais e serve como fonte de matéria orgânica, de micro e macro-nutrientes para o solo, conferindo maior capacidade de retenção de água, resistência à erosão, diminuição do uso de fertilizantes minerais e a possibilidade de maior resistência das plantas aos fitopatógenos (FERNANDES; SILVA, 1999).

2.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS E NUTRICIONAIS DO MAMOEIRO

A espécie *Carica papaya* L. pertence à família Caricaceae. É uma planta herbácea, tipicamente tropical, sendo uma das fruteiras mais comuns em quase todos os países da América tropical (DANTAS, 2000; CAMPOSTRINI; GLENN, 2007).

O mamoeiro apresenta um sistema radicular pivotante, com raiz principal bastante desenvolvida. Suas raízes secundárias são distribuídas em maior quantidade nos primeiros 30 cm do solo, podendo se desenvolver em até duas vezes a altura da planta. O caule é cilíndrico, com 10 cm a 30 cm de diâmetro, herbáceo, fistuloso e ereto, de coloração verde-clara no ápice e verde grisácea a acinzentada na base. Possui folhas grandes, com 20 cm a 60 cm, glabras, com longos pecíolos fistulosos, verde-pálidos, vermelho-vinosos. Suas flores podem ser divididas em tipos bem diferenciados e seus frutos são bagas de forma variável, de acordo com o tipo de flor. As sementes são pequenas, redondas, rugosas e recobertas por uma camada mucilaginosa, apresentando coloração diferente para cada variedade (DANTAS; NETO, 2000). Quanto à sua anatomia, estômatos são observados exclusivamente na face abaxial, podendo ser anisocíticos ou anomocíticos (LEAL-COSTA et al., 2010).

Por ser uma planta tipicamente tropical, vigorosa, *C. papaya* apresenta crescimento regular e produz frutos de excelente qualidade em locais de grande insolação, com temperaturas variando entre 22°C a 28°C, boa distribuição e quantidade de chuva ou com irrigação. A umidade relativa do ar entre 60% e 85% é a mais favorável ao seu desenvolvimento (SOUZA et al., 2000b).

O mamoeiro é uma planta de crescimento, florescimento e frutificação contínuos e, por conseguinte, sua demanda por nutrientes é constante, sendo uma das espécies de maior requerimento nutricional e que mais se beneficiam naturalmente da associação com os fungos micorrízicos (SOUZA et al., 2000a).

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes mais exigidos pelo mamoeiro, fomentando o seu crescimento vegetativo. A exigência do mamoeiro em relação ao N é crescente e constante em todo o ciclo da planta, sendo muito importante o seu suprimento nos seis primeiros meses de vida. Dessa forma, o mamoeiro responde bem à adubação orgânica, que traz como vantagens a melhoria das condições físicas, químicas e biológicas do solo, bem como supre as necessidades nutricionais da planta (SOUZA et al., 2000a).

O mamoeiro é cultivado tradicionalmente em solos conhecidos como tabuleiros costeiros, de superfície arenosa, com baixos teores de matéria orgânica e pobre em nutrientes, com subsolo argiloso e adensado, sendo de fundamental importância a adição de matéria orgânica para a promoção de alta produtividade. Por essa razão, o primeiro estudo de viabilidade técnica do uso de lodo de esgoto realizado em campo foi com a cultura do mamoeiro, com unidades experimentais implantadas seguindo os princípios utilizados para o cultivo comercial na região produtora do Norte do Estado do Espírito Santo, onde foi observado um aumento na produção do mamoeiro, em função das doses crescentes do lodo higienizado com cal virgem (COSTA et al., 2011).

2.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O oxigênio é o principal aceptor biológico de elétrons e pode ser parcialmente reduzido em espécies intermediárias como o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot) (Scandalios, 2005). Por outro lado, espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas normalmente pelo metabolismo celular, através de processos aeróbicos como a respiração e a fotossíntese e, para eliminar as ERO e evitar danos celulares, os organismos aeróbicos possuem mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos de defesa (ALSCHER et al., 1997; APEL; HIRT, 2004). Assim, a ação de enzimas antioxidantes é essencial para evitar a toxicidade dessas moléculas (APEL; HIRT, 2004).

A superóxido redutase (SOD) catalisa a dismutação do radical superóxido (O_2^-), produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (RANK, 1997), o qual pode ser eliminado pelas peroxidases (MELONI et al., 2003). A catalase (CAT) é uma enzima tetramérica que contém um grupo heme e é encontrada em todos os organismos aeróbicos, sendo uma das mais ativas enzimas catalíticas produzidas na natureza localizada principalmente nos peroxissomos (SCANDALIOS et al., 1997; SCANDALIOS, 2005). É a única enzima que degrada o peróxido de hidrogênio sem a utilização de redutores celulares e sua atividade é incrementada linearmente à concentração do substrato (SCANDALIOS, 2005).

Os cloroplastos, mais especificamente os centros de reação dos fotossistemas I e II, são os maiores centros de geração de EROs, onde a peroxidase do ascorbato (APX) exerce um papel importante na eliminação do peróxido de hidrogênio. A APX é classificada como peroxidase

classe I e pode ser encontrada tanto nos cloroplastos quanto no citosol (ASADA, 2006). Essa enzima apresenta uma maior afinidade ao H_2O_2 em relação à CAT, porém, requer uma molécula redutante, o ascorbato (NOCTOR & FOYER, 1998; APEL; HIRT, 2004; ASADA, 2006).

A glutathione S-transferase (GST) catalisa a conjugação da glutathione reduzida a uma variedade de substratos hidrofóbicos e eletrofílicos, que são geralmente citotóxicos (WILCE; PARKER, 1994; KREUZ et al., 1996), produzindo conjugados solúveis em água destes xenobióticos, o que reduz sua toxicidade (COLE, 1994; KREUZ et al., 1996). As GSTs também promovem a conjugação de glutathione reduzida com produtos endógenos causadores de danos oxidativos, como radicais hidroxila citotóxicos, peróxidos de lipídios de membrana e produtos de degradação oxidativa do DNA, visando sua desintoxicação (DUDLER et al., 1991; BARTLING et al., 1993).

A enzima H^+ -ATPase, situada na membrana plasmática, tem como atividade a clivagem de moléculas de ATP para geração de um gradiente eletroquímico que fornece energia para os transportes secundários da célula, promovendo a força necessária para a entrada e fluxo de íons e metabólitos na membrana (SZE, 1985; CANELLAS et al., 2012). Codificada por uma família de multigenes, essa enzima tem sua atividade influenciada por contextos temporais e espaciais, bem como por mudanças químicas e ambientais (NIU et al., 1996; HASEGAWA et al., 2000).

2.5 AVALIAÇÃO DE RESPOSTAS CITOGENÉTICAS EM PLANTAS

O aumento do despejo de poluentes no ambiente tem afetado o balanço natural dos ecossistemas e, conseqüentemente, tem sido alvo da atenção de diversos pesquisadores e órgãos governamentais, preocupados com a manutenção da saúde de todos os organismos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Dentre os danos causados por agentes químicos aos organismos expostos, os efeitos genotóxicos e mutagênicos são de extrema relevância, devido à sua capacidade de induzir danos genéticos, capazes de desencadear diversos problemas na saúde e também afetar gerações subsequentes àquelas expostas, pelo fato de certas alterações poderem ser herdáveis (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Dessa forma, a necessidade de identificar esses compostos reativos com o DNA, com objetivo de assegurar a qualidade

ambiental, tem sido desenvolvimento de testes de genotoxicidade e mutagenicidade em diversos organismos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Plantas superiores possuem características que as tornam excelentes modelos genéticos para a avaliação de poluentes ambientais, sendo frequentemente utilizadas em estudos de monitoramento, devido não somente à sua sensibilidade na detecção de mutágenos em diferentes ambientes, mas também devido à possibilidade de avaliação de diversos endpoints genéticos, que podem variar de mutações pontuais a aberrações cromossômicas em diferentes órgãos e tecidos. Dentre as plantas utilizadas na avaliação de contaminação ambiental, as comumente utilizadas são *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia*, *Nicotiana tabacum*, *Crepis capillaris* e *Hordeum vulgare* (GRANT, 1994; AMARAL et al., 2007).

O índice mitótico, caracterizado pelo número total de células em divisão tem sido utilizado como um parâmetro na avaliação da citotoxicidade de diversos agentes (FERNANDES et al., 2009). Dessa forma, índices mitóticos menores que os registrados no controle negativo podem indicar alterações derivadas da ação química no crescimento e desenvolvimento dos organismos expostos. Por outro lado, índices acima do controle negativo são resultados de um aumento da divisão celular, que podem levar à proliferação celular desordenada e até mesmo à formação de tumores (HOSHINA, 2002).

Mudanças estruturais ou no número total de cromossomos são denominadas aberrações cromossômicas, que podem ocorrer de forma espontânea ou como consequência da exposição a agentes químicos ou físicos (ALBERTINI et al., 2000). Dessa forma, quebras cromossômicas são indicativos de agentes clastogênicos, enquanto pontes, perdas cromossômicas, atrasos, aderências, multipolaridade e C-metáfases resultam de danos no fuso mitótico, característicos de agentes aneugênicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Adicionalmente, anormalidades nucleares também correspondem a aberrações cromossômicas, sendo caracterizadas por alterações morfológicas nos núcleos interfásicos, observadas na forma de núcleos lobulados, núcleos com brotos nucleares, células polinucleadas, mini células, dentre outros (FERNANDES et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME et al., 2008).

O teste do micronúcleo corresponde a um dos mais eficazes endpoints na análise de efeitos mutagênicos de compostos, devido ao fato de ser uma consequência de danos nas células parentais, não reparados ou reparados de forma errada, observados nas células-filha como uma estrutura similar ao núcleo principal, porém em tamanho reduzido, podendo ser analisada tanto em células meristemáticas quanto em células F1 de raízes de plantas (LEME; MARIN-

MORALES, 2008). Micronúcleos podem derivar de aberrações cromossômicas como quebras e perdas ou ainda serem produtos da eliminação do DNA excedente do núcleo principal em processos de poliploidização, numa tentativa de retomar as condições normais de ploidia (FERNANDES et al., 2007).

Dentre as espécies utilizadas na avaliação de dano genético, *A. cepa* tem sido considerada como preferencial para análises de danos cromossômicos e distúrbios no ciclo mitótico, devido ao pequeno número ($2n = 16$) e grande tamanho de seus cromossomos, além de possuir alta sensibilidade na detecção de agentes químicos (FISKESJÖ, 1985).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as respostas morfológicas, fisiológicas, anatômicas e bioquímicas no crescimento inicial de *C. papaya* L., bem como os possíveis efeitos genéticos sob o organismo teste *A. cepa* após exposição a dosagens de lodo de esgoto tratado e higienizado com cal virgem.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Caracterizar o lodo de esgoto bruto segundo os critérios estabelecidos pelo CONAMA 375/06;
- b. Realizar uma caracterização elementar (CHN) do lodo de esgoto higienizado;
- c. Quantificar o teor nutricional no lodo de esgoto higienizado, nas diferentes dosagens obtidas e nos órgãos vegetativos de plantas de *C. papaya* expostas aos diferentes tratamentos em três tempo tempos de exposição;
- d. Investigar os efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico das dosagens crescentes de lodo de esgoto higienizado em *A. cepa*;
- e. Detectar possíveis alterações na atividade enzimática de plantas de *C. papaya* expostas a dosagens crescentes de lodo de esgoto higienizado em diferentes tempos de exposição;
- f. Avaliar as possíveis alterações na taxa de crescimento e no teor de pigmentos fotossintetizantes, causadas pela aplicação de dosagens crescentes de lodo de esgoto tratado, em plantas de *C. papaya*, em diferentes tempos de exposição;
- g. Analisar quantitativamente e qualitativamente a anatomia das plantas de *C. papaya* expostas a dosagens crescentes de lodo de esgoto tratado em diferentes tempos de exposição.

4 METODOLOGIA

4.1 TRATAMENTO E COLETA DO LODO DE ESGOTO

O lodo bruto foi cedido pela Companhia Espírito Santense de Saneamento (CESAN), onde uma parte da amostra obtida foi utilizada para análise química (Centro Tecnológico de Análises – CETAN, Vitória/ES) e o restante encaminhado para a Fazenda Experimental de Sooretama do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), onde foi realizada a caleação, por meio da mistura com cal virgem na proporção de 30% do peso seco do lodo bruto (LIMA et al., 2011). Após estabilização por 30 dias (março a abril de 2013), uma amostra desta mistura foi coletada para a determinação do teor de nitrogênio presente no lodo tratado.

4.2 DETERMINAÇÃO DAS DOSAGENS A SEREM AVALIADAS

Para determinação das dosagens utilizadas no experimento inicialmente foi realizada a análise elementar (CHN) (Leco CHNS-932) do lodo tratado e higienizado para determinação do teor de nitrogênio do resíduo.

Foram testadas cinco doses de nitrogênio: 100; 200; 300 e 400 mg de N dm⁻³. A mistura dos diferentes teores de lodo higienizado foi feita com solo (latossolo) até completar o volume do vaso (8L), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos tratamentos analisados.

Tratamento	Doses de Nitrogênio (mg N dm ⁻³)	Quantidade de lodo de esgoto higienizado utilizada para mistura (g)	Quantidade de solo utilizada para mistura (g)
Solo testemunha	0	0,00	8000
100 N	100	66,67	7933,33
200 N	200	133,33	7866,67
300 N	300	200,00	7800,00
400 N	400	266,67	7733,33

4.3 ÁREA DE ESTUDO

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e laboratório no Setor de Botânica (20° 16' 29.97"S, 40° 18' 21.19"O), Departamento de Ciências Biológicas/CCHN, localizados no campus de Goiabeiras da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, ES.

4.4 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

4.4.1 Preparo dos solubilizados

Para a avaliação genética em *A. cepa*, foram preparados solubilizados de cada tratamento em adição a uma amostra de lodo higienizado. Após secagem em estufa (37,5 °C) até obtenção de peso constante, 250 g de cada amostra foram adicionados a 1000 mL de água deionizada e agitados a baixa velocidade por 5 minutos. Posteriormente foram deixados em repouso por 7 dias (24 °C) e em seguida o solubilizado foi filtrado utilizando membrana de 45µm (ABNT, 2004).

4.4.2 Ensaio *Allium cepa*

Os testes de aberrações cromossômicas e de micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa*, foram realizados com base no protocolo estabelecido por Grant (1982). Para avaliação citogenética foi realizado um tratamento contínuo com sementes de *A. cepa*, variedade Baia Periforme de mesmo lote. As sementes foram germinadas nas diferentes doses de lodo de esgoto higienizado solubilizadas, até que as raízes atingissem aproximadamente 1 cm de comprimento. Como controle negativo foi utilizado água deionizada e como controle positivo metil metano sulfonato (MMS), na concentração final de 4×10^{-4} M.

As raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy, etanol/ácido acético (3:1), por 24 h. Em seguida, foram submetidas à hidrólise ácida em HCl 1N a 60°C por 7 minutos e lavadas em água destilada. A coloração foi realizada de acordo com a metodologia convencional de Feulgen, na qual as raízes foram expostas ao reativo de Schiff, por duas horas em local escuro.

Para confecção das lâminas a serem utilizadas na análise, foram isolados o meristema e a região F1 das raízes. No material da lâmina, foi adicionada uma gota de carmim acético 1%, seguido do recobrimento com lamínula. Após este procedimento, o material foi espalhado por pressão suave, as lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com Bálsamo do Canadá. Foram analisadas, em microscópio de luz, aproximadamente 1000 células de cada região (meristemática e F1) por lâmina, totalizando cinco lâminas para cada tratamento.

Após a análise da região meristemática foram calculados o índice mitótico, o índice de aberrações cromossômicas (de genotoxicidade) e o índice de mutagenicidade. O índice mitótico foi calculado por meio da relação entre o número de células em divisão e o total de células analisadas:

$$\text{Índice mitótico} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células em divisão}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

O índice de aberrações cromossômicas foi obtido por meio da frequência de células portadoras de alterações cromossômicas no ciclo celular (células binucleadas, C-metáfase, microcito, brotamento, perda, aderência cromossômica, anáfases multipolares bem como pontes e atrasos na anáfase e na telófase), por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Índice de aberrações} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com aberrações cromossômicas}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

O índice de mutagenicidade foi obtido por meio da frequência de células portadoras de quebras e micronúcleos (MN):

$$\text{Índice de mutagenicidade meristemática} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com MN e quebra}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

Após a análise da região F1 foi calculado o índice de mutagenicidade:

$$\text{Índice de mutagenicidade de F1} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com MN em células F1}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado por delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas ao longo do tempo, em casa de vegetação branca, localizada no campus de Goiabeiras da Universidade Federal do Espírito Santo/UFES (20° 16' 29.97"S, 40° 18' 21.19"O), com temperatura média de 27 °C.

Mudas da espécie *C. papaya*, variedade THB solos, foram obtidas no viveiro da Fazenda Experimental de Jucuruaba do INCAPER (20° 25' 20.02"S, 40° 28' 42.56"O), localizada no município de Viana/Espírito Santo. As mudas, com uma média aproximada de 15 cm de comprimento, foram transferidas para vasos de 8 litros. Para cada tratamento, foram montados 20 vasos.

As irrigações foram feitas a cada dois dias, levando-se em consideração a capacidade de campo do solo e, para tanto, testes de pesagem dos vasos foram realizados por meio da saturação e pesagem frequente até se obter peso constante. A partir desses testes, o volume de água a ser adicionado foi obtido pela diferença do peso médio em capacidade de campo e o peso de cada vaso.

Indivíduos foram coletados após 30, 60 e 90 dias de tratamento, para as análises bioquímicas, e após 60 e 90 dias para análises de crescimento, para a extração e quantificação de pigmentos fotossintetizantes e para os testes anatômicos (somente ao final do tempo de exposição). Para as análises químicas, amostras do solo do tratamento e tempo correspondente também foram analisados.

4.6 ANÁLISE QUÍMICA

Uma amostra de lodo de esgoto bruto foi encaminhada para o Centro Tecnológico de Análises – CETAN, Vitória/ES, para análise de benzenos clorados (EPA 8260-B); ésteres de ftalatos (EPA 8061); fenóis clorados e não clorados e poluentes orgânicos persistentes (EPA 8270-D); hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (SM 6440-B); nitrogênio amoniacal, nitrato, nitrito e sólidos totais voláteis (EPA-SW 846); mercúrio (EPA 7470-A); molibdênio (EPA 6010-C) e parâmetros biológicos (EPA 1682, EPA-SW 846, CETESB L5.550, CETESB L5.504, CETESB L5.506).

Após 60 e 90 dias de tratamento, amostras de solo, raízes e folhas foram selecionadas ao acaso para avaliação química. Três amostras de cada tratamento, em adição a uma amostra de lodo de esgoto higienizado e solo testemunha foram embaladas, etiquetadas e enviadas para o Centro de Análises Químicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para a caracterização química (N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Zn, Mn e B). Seguiram-se os métodos de semi-micro-Kjeldahl para quantificação de nitrogênio (LABTEC LB 62-03); colorimetria do metavanadato para fósforo (SPECTRU SP-2000 UV); turbidimetria do sulfato de bário para enxofre (SPECTRU SP-2000 UV); fotometria de chama de emissão para potássio (MICRONAL B 462); espectrofotometria de absorção atômica para cálcio, magnésio, ferro, cobre, zinco e manganês (VARIAN SPETRAA 55 B); e colorimetria de curcumina para boro (SPECTRU SP-2000 UV).

4.7 ANÁLISE DOS FATORES DE BIOCONCENTRAÇÃO E TRANSLOCAÇÃO

O fator de bioconcentração (FBC) foi calculado para comparar os níveis de nutrientes acumulados no tecido da raiz em comparação à concentração original no solo. O fator de translocação (Ft) foi utilizado para avaliar as concentrações de nutrientes nas folhas e suas correlações com os valores encontrados nas raízes. Ambos os fatores foram considerados somente quando os valores encontrados foram maiores que 1, como descrito por Ali et al. (2013).

4.8 ANÁLISES DE CRESCIMENTO

Após os períodos de 60 e 90 dias foram selecionados aleatoriamente cinco espécimes de cada concentração a fim de realizar medidas de altura e diâmetro do caule; área foliar total (Área Mater, LI-COR 3100); massa fresca e seca (estufa 37° C até obtenção de peso constante) da parte aérea e radicular das plantas; e contagem do número de folhas. A partir dessas medidas foram obtidas médias da razão de raiz parte aérea; área foliar específica; e taxa de crescimento relativo por meio da fórmula (HUNT, 1978; ROCHA et al., 2009):

$$TCR = \frac{(\ln M2 - \ln M1)}{(t2-t1)}$$

Onde,

Ln representa logaritmo natural; M2 e M1 significam massa seca atual e inicial, respectivamente e t2 – t1 corresponde à diferença do tempo final e tempo inicial.

4.9 ANÁLISES ANATÔMICAS

Para cada tratamento, foram retiradas, após 90 dias, amostras das folhas e raízes de cinco indivíduos de *C. papaya*. Para as análises, as amostras foram fixadas e conservadas em álcool etílico 70%.

4.9.1 Análises Anatômicas Quantitativas

A densidade estomática (mm²) foi analisada no terço mediano da superfície abaxial da folha por meio da técnica de impressão, utilizando uma gota de adesivo instantâneo universal éster de cianoacrilato (Super-Bonder®) em uma lâmina histológica. Vinte e cinco campos ópticos aleatórios foram analisados por indivíduo em fotomicroscópio por meio de obtenção de fotos e contagem no programa TSVIEW.

4.9.2 Análises Anatômicas Qualitativas

Foram selecionados fragmentos das raízes fixadas na região de 5 cm a partir do ápice. Secções transversais foram realizadas em micrótomo de mesa. Os cortes obtidos foram corados com Azul de Astra e Safranina a 1% (BUKATSCH, 1972) para análise da estrutura dos tecidos e com Floroglucinol acidificado (JOHANSEN, 1940) para a determinação da presença de compostos lignificados. As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio (20x e 40x) e as fotos obtidas foram obtidas com o programa TSVIEW.

4.10 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PIGMENTOS

Para quantificação dos teores de pigmentos, a última folha completamente expandida foi coletada de cinco plantas de cada tratamento, no início da manhã (8h30). Um disco de cerca de 0,0130 dm² foi retirado de cada folha, imerso em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e incubado a 70 °C por 30 minutos, no escuro (HISCOX; ISRAELSTAM, 1979). A leitura do extrato foi realizada em espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometer) nas absorvâncias de 480, 645, 663 nm. Os cálculos foram realizados de acordo com as equações de Lichtenthaler e Welbum (1983):

$$\text{Chl a} = [(12,7 \times A_{663}) - (2,69 \times A_{645})] \times V / (1000 \times M)$$

$$\text{Chl b} = [(22,9 \times A_{645}) - (4,68 \times A_{663})] \times V / (1000 \times M)$$

$$\text{Chl. total} = [(20,2 \times A_{663}) - (2,69 \times A_{645})] \times V / (1000 \times M)$$

$$\text{Carot} = [(1000 \times A_{470}) - (1,82 \times \text{Chl a} - 85,02 \times \text{Chl b})] \times V / (198 \times 1000 \times M)$$

Onde,

Chl e Carot. significam clorofila e carotenóides, respectivamente. A₆₆₃, A₆₄₅ e A₄₇₀ representam os valores das absorvâncias; V é o volume de DMSO (em mL) utilizado para a extração e M é a massa fresca dos discos.

4.11 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para avaliação da análise enzimática, a última folha completamente expandida foi coletada de duas plantas de cada tratamento, no início da manhã (8h30) e imediatamente congelada em nitrogênio líquido, sendo mantida refrigerada (-80 °C) até o momento da análise.

4.11.1 Concentração de proteína

A concentração de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976), adaptado para microplaca, onde 2 μ L do homogeneizado foi adicionado em 200 μ L de Coomassie Blue. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a $\lambda = 595$ nm, utilizando-se, como padrão, a curva de albumina sérica bovina.

4.11.2 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi realizada por espectrofotometria com base no protocolo descrito por McCord e Fridovich (1969), no qual o radical superóxido é gerado por meio do sistema xantina/xantina oxidase e a redução do citocromo c é monitorada a 550 nm.

Foram pesados 0,3 g de amostra vegetal (folha) e adicionados 900 μ L de tampão fosfato com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) a 1 mM. A mistura foi homogeneizada (ULTRA-TURRAX®, IKA), centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante aliqotado para análise. Para leitura da atividade em microplaca foram adicionados 5 μ L do sobrenadante a 288 μ L de meio de reação (Xantina 50 μ M, KCN 20 μ M, Citocromo c 10 μ M, EDTA 100 μ M) em cada poço. Para o branco, utilizou-se 2 μ L de meio de reação. A leitura foi realizada durante um minuto, em intervalos de 15 segundos, em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation). O volume de xantina oxidase foi determinado a partir da leitura do branco, com uma leitura a cada sete amostras lidas.

A atividade enzimática foi expressa por unidade de SOD, sendo que 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.

4.11.3 Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pelo método descrito por Beutler (1975), no qual a decomposição enzimática de H_2O_2 é mensurada pelo decaimento da absorbância a 240 nm.

O extrato foi preparado com 0,2 g de amostra vegetal (folha) e adicionados 600 μL de 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. A mistura foi homogeneizada (ULTRA-TURRAX®, IKA), centrifugada a 9000 g por 30 minutos a 4° C e o sobrenadante aliqotado para análise. Para leitura da atividade em microplaca, foram adicionados 10 μL do sobrenadante a 245 μL de meio de reação (45 μL de H_2O_2 , 47 mL de água destilada e 2,5 mL de tampão de reação - Tris-base 1 M, EDTA 5 mM). Para o branco, utilizou-se 5 μL de tampão de homogeneização. A leitura foi realizada durante dois minutos, em intervalos de 15 segundos, em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation). A atividade específica foi expressa em nmol mg^{-1} de proteína min^{-1} .

4.11.4 Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da APX foi determinada pelo método descrito por Nakano e Asada (1981) com adaptações, no qual a concentração de H_2O_2 dependente de ascorbato foi determinada por uma diminuição do valor de absorbância a 290 nm, usando o coeficiente de extinção molar 2,8 $\text{mmol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$.

O extrato foi preparado com 0,3 g de amostra vegetal (folha) e adicionados 900 μL de tampão fosfato (200 mM, pH 7,0) com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) a 1 mM. A mistura foi homogeneizada (ULTRA-TURRAX®, IKA), centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante aliqotado para análise. Para leitura da atividade em microplaca foram adicionados 2 μL do sobrenadante a 125 μL de tampão fosfato, 12 μL de ácido ascórbico, 96,9 μL de água destilada, 12,5 μL de H_2O_2 . Para o branco, utilizou-se 3,1 μL de água destilada. A leitura foi realizada durante três minutos em intervalos de 15 segundos em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation). A atividade específica foi expressa em μmol de ácido ascórbico $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

4.11.5 Atividade da enzima glutationa S-transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada pelo método descrito por Habig e Jakobi (1981) com adaptações de Gallagher et al. (1992), no qual a unidade da atividade da enzima foi definida como a relação da taxa inicial da reação, com o valor do coeficiente de extinção molar para o CDNB de $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, com valor de absorvância a 340 nm.

O extrato foi preparado com 0,3 g de amostra vegetal (folha e raiz) e adicionados 900 μL de tampão de homogeneização (Tris-HCl 100 mM, EDTA 2 mM e $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 5 mM) com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) a 1 mM. A mistura foi homogeneizada (ULTRA-TURRAX®, IKA), centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante aliqotado para análise. Para leitura da atividade em microplaca foram adicionados 15 μL do sobrenadante a 235 μL de meio de reação (tampão fosfato e CDNB 0,05 M) e 10 μL de GSH a 25 mM. Para o branco, utilizou-se 15 μL de tampão de homogeneização. A leitura foi realizada durante quatro minutos, em intervalos de 30 segundos, em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation). A atividade específica foi definida como a unidade da atividade da enzima por mg de proteína.

4.11.6 Atividade das enzimas ATPase total e H^+ -ATPase

As atividades da ATPase total e da H^+ -ATPase foram determinadas pelo método descrito por Gibbs e Somero (1989) com adaptações de Kultz e Somero (1995) e Gonzales et al. (2005), no qual os ensaio foi baseado na defosforilação do ATP para a oxidação do NADH, onde a fração sensível ao NEM (inibidor da H^+ -ATPase) foi utilizada para avaliar a atividade da H^+ -ATPase, com valor de absorvância a 340 nm.

O extrato foi preparado com 0,2 g de amostra vegetal (folha e raiz) e adicionados 600 μL de tampão de homogeneização (Sacarose 150 mM, Imidazol 50 mM, EDTA 10 mM), com beta mercaptoetanol. A mistura foi homogeneizada (ULTRA-TURRAX®, IKA), centrifugada duas vezes a 3000 rpm por 7 minutos a 4° C e o sobrenadante aliqotado para análise. Para leitura da atividade total da ATPase, foram adicionados, em microplaca, 5 μL do sobrenadante a 200 μL de meio de reação (Imidazol 30 mM, NaCl 45 mM, KCl 15mM, $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 3mM, KCN 0,4 mM, ATP 1 mM, NADH 0,2 mM, PK 3 u/mL, LDH 3 u/mL, Frutose 1,6-difosfato 0,1 mM, PEP

2 mM). Para leitura da atividade da H⁺-ATPase, foram adicionados em microplaca 5 µL do sobrenadante a 200 µL de meio de reação e solução de NEM 2 mM. A leitura foi realizada durante quinze minutos em intervalos de 30 segundos em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation). A atividade específica foi definida como a unidade da atividade da enzima por mg de proteína.

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Utilizando o programa InfoStat, foi realizado ANOVA seguido por teste de Tukey ($p < 0,5$) para os índices genéticos, atividades enzimáticas, dados de crescimento vegetal, quantificação de pigmentos e análises químicas. Utilizando o programa ESTATÍSTICA, foi aplicada a análise de fatores como método de estatística multivariada aos dados obtidos (parâmetros químicos e biológicos). A análise de fatores foi realizada a partir da matriz de correlação, na qual as variáveis foram dimensionadas por meio do procedimento de varimax normalizada. Os principais fatores foram extraídos utilizando o critério de Kaiser, onde são considerados valores de eigenvalues acima de 1. O ponto de corte para seleção das variáveis incluídas nesses fatores foi de 0,7.

5 REFERÊNCIAS

ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINK, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A. T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E.; TICE, R.; WATER, M. D.; AITIO, A. IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 463, n. 2, p. 111–172, ago., 2000.

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals - Concepts and applications. **Chemosphere**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 869-881, mai., 2013.

ALSCHER, R. G.; DONAHUE, J. H.; CRAMER, C. L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 100, n. 2, p. 224-233, jun., 1997.

AMARAL, A. M.; BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J. C.; BARROS, L. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP- Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v. 20, n. 1-2, p. 65-72, dez., 2007.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, fev., 2004.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 141, n. 2, p. 391-396, jun., 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **NBR – 10006**: Procedimento para obtenção de substrato solubilizado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro: ABNT, 2004, 21p.

BARTLING, D.; RADZIO, R.; STEINER, U.; WEILER, E. W. A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 216, n. 2, p. 579-86, set., 1993.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. de (eds.). **Lodo de esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura**. Embrapa Meio Ambiente: Jaguariúna, 2006a, 347p.

_____. A disposição de lodo de esgoto em solo agrícola. In: _____. **Lodo de esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura**. Embrapa Meio Ambiente: Jaguariúna, c. 2, p. 25-35, 2006b.

BEUTLER, E. The preparation of red cells for assay. In: Beutler, E. (ed.). **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. Grune & Stratton, New York, pp. 8-18, 1975.

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

BRASIL. **Resolução CONAMA Nº 375/2006**, de 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. Brasília, 2006.

BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.

CAMPOSTRINI, E.; GLENN, D. M. Ecophysiology of papaya: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 19, n. 4, p. 413-424, dez., 2007.

CANELLAS, L. P.; DOBBSS, L. B.; OLIVEIRA, A. L.; CHAGAS, J. G.; AGUIAR, N.O.; RUMJANEK, V. M.; NOVOTNY, E. H.; OLIVARES, F. L.; SPACINNI, R.; PICCOLO, A. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 63, n. 3, p. 315-324, abr., 2012.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, Oxford, v. 72, n. 5, p. 722–725, mai., 2008.

COLE, D. Detoxification and activation of agrochemicals in plants. **Pesticide Science**, London, v. 42, n. 3, p. 209-222, mai., 1994.

COSTA, A. F. S. da; COSTA, A. N. da; CAETANO, L. C. S.; MAIA, F. G. Disposição do lodo de ETE no solo e seu efeito na produção agrícola. In: COSTA, A. N. da; COSTA, A. de F. S. da. (Org.). **Manual de uso agrícola e disposição do lodo de esgoto para o estado do Espírito Santo**. Incaper: Vitória, c. 5, p. 37-43, 2011.

COUNCIL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (CEC). **Council Directive 86/278/EEC**, of 12 June 1986. On the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. Official Journal, v. 181, p. 6-18, 1986.

DANTAS, J. L. L. Introdução. In: TRINDADE, A. V. (Org.). **Mamão: Produção - Aspectos Técnicos**. Embrapa: Brasília, c. 1, p. 9, 2000.

DANTAS, J. L. L.; NETO, M. T. C. Aspectos Botânicos e Fisiológicos. In: TRINDADE, A. V. (Org.). **Mamão: Produção - Aspectos Técnicos**. Embrapa: Brasília, c. 3, p. 11-14, 2000.

DUDLER, R.; HERTIG, C.; REBMANN, G.; BULL, J.; MAUCH, F. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione S-transferases. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, USA, v. 4, n. 1, p. 14-18, jan./fev., 1991.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, California, v. 88, n. 3, p. 252–259, 2007.

FERNANDES, F.; SILVA, S. M. C. P. **Manual Prático para a Compostagem de Biossólidos**. Universidade Estadual de Londrina: Programa de Pesquisa em Saneamento Básico. 1999, 91p.

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

FOYER, C. H.; DESCOURVIÈRES, P.; KUNERT, K. J. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 507-523, mai., 1994.

GALLAGHER, E. P.; CANADÁ, A. T.; DI GIULIO, R. T. The protective role of glutathione in chlorothanil- induced toxicity to channel catfish. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 23, n. 3-4, p.155-168, 1992.

GIBBS, A.; SOMERO, G. N. Pressure adaptation of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of marine teleosts. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 143, p. 475–492, mai., 1989.

GONZALEZ, R. J.; COOPER, J.; HEAD, D. Physiological responses to hyper-saline waters in sailfin mollies (*Poecilia latipinna*). **Comparative biochemistry and physiology – A**, Oxford, v. 142, n. 4, p. 397–403, out., 2005.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in Allium. A report of the US Environmental Agency Gene - Toxicology Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 273- 291, nov., 1982.

_____. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 310, n. 2, p. 175–185, out., 1994.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 77, p. 398-405, fev., 1981.

HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 51, n. 1, p. 463-499, jun., 2000.

HISCOX, J.D.; ISRAELSTAM, G.F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.57, n. 12, p.1332-1334, 1979.

HOSHINA, M.M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro - município de Rio Claro, pertencente à bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa***. Trabalho de conclusão (Bacharel e Licenciatura - Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2002, 52 p.

HUNT, R. **Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis**. Edward Arnold Publishers, London, 1978, 80 p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 3 ed. Paul B. Hoeber Inc.: Nova York, 1940, 790 p.

KREUZ, K.; TOMMASINI, R.; MARTINOIA, E. Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 111, n. 2, p. 349-53, jun., 1996.

KÜLTZ, D.; SOMERO, G. N. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 198, n. 9, p. 1883–1894, 1995.

LEAL-COSTA, M. V.; MUNHOZ, M.; MEISSNER-FILHO, P. E.; REINERT, F.; TAVARES, E. S. Anatomia foliar de plantas transgênicas e não transgênicas de *Carica papaya* L. (Caricaceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 595-597, 2010.

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

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - a case study. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 650, n. 1, p. 80–86, jan., 2008.

_____. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 682, n. 1, p. 71–81, jul. ago., 2009.

LICHTENTHALER, H. K.; WELBURN, A. R. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, London, v.11, p.591-592, 1983.

LIMA, M. F. de; MATTOS, C. N. de; VIEIRA, P. L. C; ALMEIDA, L. F. Geração de lodo de esgoto e seu potencial como fonte de matéria orgânica para a agricultura. In: COSTA, A. N. da; COSTA, A. de F. S. da. (Org.), **Manual de uso agrícola e disposição do lodo de esgoto para o estado do Espírito Santo**. Vitória, ES, Incaper, c. 1, p. 11-17, 2011.

LIMA, M. F. de; COSTA, A. F. S. da; MATTOS, C. N. de; COSTA, A. N. da. Aspectos legais de utilização do lodo de esgoto na agricultura. In: COSTA, A. N. da; COSTA, A. de F. S. da. (Org.), **Manual de uso agrícola e disposição do lodo de esgoto para o estado do Espírito Santo**. Vitória, ES, Incaper, c. 2, p. 19-21, 2011.

LOPES, A. S; GUILHERME, L. R. G. Fertilidade do solo e produtividade agrícola. In: NOVAIS, R. F.; VENEGAS, V. H. A.; BARROS, N. F. de; FONTES, R. L.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo: Viçosa, c. 1, p. 1-65, 2007.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, nov., 1969.

MELONI, D. A.; OLIVA, M. A.; MARTINEZ, C. A.; CAMBRAIA, J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 49, n. 1, p. 69-76, fev., 2003.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, jun., 1981.

NIU, X.; DAMSZ, B.; KONONOWICZ, A. K.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. NaCl induced alterations in both cell structure and tissue-specific plasma membrane H-ATPase gene expression. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 111, n. 3, p. 679–86, jul., 1996.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 249-279, jun., 1998.

NOGUEIRA, O. L.; CONCEIÇÃO, H. E. O. Análise de crescimento de açaizeiros em áreas de várzea do estuário amazônico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.11, p. 2167-2173, nov., 2000.

RANK, B. Oxidative stress response and photosystem 2 efficiency in trees of urban areas. **Photosynthetica**, Netherlands, v. 33, n. 3-4, p. 467-481, 1997.

ROCHA, A. C.; CANAL, E. C.; CAMPOSTRINI, E.; REIS, F. O.; CUZZUOL, G. R. F. Influence of chromium in *Laguncularia racemosa* (L). Gaertn f. physiology. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 21, n. 2, p. 87-94, jul., 2009.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, jul., 2005.

SCANDALIOS, J. G.; GUAN, L.; POLIDOROS, A. N. **Catalases in plants**: gene structure, properties, regulation, and expression. In: Scandalios, J. G. (Eds.). *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

SOUZA, L. S.; COELHO, E. F.; OLIVEIRA, A. M. G. Calagem, Exigências Nutricionais e Adubação. In: TRINDADE, A. V. (Org.). **Mamão: Produção - Aspectos Técnicos**. Embrapa: Brasília, c. 8, p. 26-34, 2000.

_____. Exigências Edafoclimáticas. In: TRINDADE, A. V. (Org.). **Mamão: Produção - Aspectos Técnicos**. Embrapa: Brasília, c. 5, p. 16-17, 2000b.

SZE, H. H⁺-translocating ATPases: advances using membrane vesicles. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 36, p. 175–208, jun., 1985.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Standards for the Use or Disposal of Sewage Sludge; Final Rules**. 40 CFR Part 257 et al., 1993.

_____. **Risk-Based Concentration Table**. Philadelphia PA. United States Environmental Protection Agency: Washington, DC, 2009.

WILCE, M. C.; PARKER, M. W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1205, n. 1, p. 1-18, mar., 1994.

WHITE, C. C.; VIERNES, H.; KREJSA, C. M.; BOTTA, D.; KAVABAGG, D. T. J. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 318, n. 2, p. 175-180, jul., 2003.

6 RESULTADOS

Artigo 1

Após tradução este artigo será submetido à revista “Environmental and Experimental Botany”.
ISSN: 0098-8472

Avaliação morfológica e fisiológica de *Carica papaya* L. (Caricaceae) submetida à aplicação de lodo de esgoto higienizado com cal virgem

Autores: Marina Marques Bonomo^a, Mariana Morozesk^a, Livia Dorsch Rocha^a, Ian Drumond Duarte^a, Adelaide de Fátima Santana da Costa^b e Silvia Tamie Matsumoto^a.

^aDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, 29075-910, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

^bInstituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, Rua Afonso Sarlo, 160, 29052-010, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

* Correspondência do autor: 55 27 33357251, siltamie@gmail.com.

Resumo

A utilização do lodo de esgoto higienizado em solos como insumo agrícola representa uma alternativa de disposição final prática e benéfica, considerando o constante desenvolvimento das redes de tratamento de efluentes sanitários e o conseqüente aumento na produção do resíduo. Assim, a aplicação do lodo contribui no ciclo biogeoquímico dos nutrientes minerais e serve como fonte de matéria orgânica, micro e macro-nutrientes para o solo e para o cultivo, promovendo um estímulo no crescimento da planta, principalmente de espécies de alta exigência nutricional. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação agrícola de doses de lodo de esgoto higienizado no crescimento inicial de *Carica papaya* por meio da integração de análises químicas e biológicas. A adição de lodo de esgoto higienizado ao solo modificou as características nutricionais do mesmo, levando a melhorias no desenvolvimento das plantas quanto aos aspectos de crescimento vegetal, principalmente devido ao seu elevado teor de nitrogênio. Os valores observados para as maiores dosagens do resíduo na avaliação de pigmentos fotossintetizantes e a correlação negativa quanto à presença de lignina corroboram o aumento de biomassa e das medidas de crescimento avaliadas, garantindo a eficácia do lodo de esgoto higienizado como fonte nutricional para cultivos.

Palavras-chave: Resíduos sólidos, Mamão, Nutrientes, Crescimento vegetal, Pigmentos fotossintetizantes, Anatomia vegetal.

1. Introdução

Os processos de tratamento de efluentes sanitários levam à geração do lodo de esgoto, resíduo bioestável que apresenta diferentes composições químicas e biológicas, que variam de acordo com o método de estabilização e o tratamento utilizado (Kelessidis e Stasinakis, 2012). Considerando o constante desenvolvimento de áreas urbanas e o consequente aumento da produção de efluentes sanitários e seus resíduos, são necessários métodos alternativos de disposição final para minimizar a potencial contaminação dos solos e recursos hídricos (Grotto et al., 2013). Dentre as alternativas de disposição final, as mais comumente aplicadas são a utilização como insumo agrícola, disposição em aterros, reutilização industrial e incineração (Costa e Costa, 2011; Kelessidis e Stasinakis, 2012).

Considerando os altos teores de matéria orgânica, umidade e concentração de nitrogênio e outros minerais, o lodo gerado do tratamento de efluentes tem despertado o interesse agrônomo, sendo cada vez mais utilizado como condicionador de solo ou fertilizante (Bettiol e Camargo, 2006; Lima et al., 2011). A aplicação do lodo de esgoto na agricultura pode ser realizada após processos complementares de tratamento, tais como a adição de cal, o que eleva o pH, a fim de reduzir os níveis de patógenos do resíduo (Brasil, 2006; Costa e Costa, 2011). As dosagens variam de acordo com o teor de nitrogênio no resíduo e com cada cultura (Lima et al., 2011), e os níveis de nutrientes, metais, poluentes orgânicos e patógenos são determinados pela legislação correspondente de cada região (CEC, 1986; USEPA, 1995; Brasil, 2006; Carbonell et al., 2009).

Dessa forma, a utilização do lodo como insumo agrícola contribui no ciclo bioquímico dos nutrientes minerais e serve como fonte de matéria orgânica, micro e macro-nutrientes para o solo, conferindo maior capacidade de retenção de água, resistência à erosão, possibilitando a diminuição do uso de fertilizantes minerais e possivelmente propiciando maior resistência das plantas aos fitopatógenos (Fernandes e Silva, 1999). Em adição, a aplicação do lodo de esgoto usualmente promove um estímulo no crescimento da planta, onde resultados positivos foram observados tanto em estudos desenvolvidos em campo e em casa de vegetação (Antolín et al., 2005; Pascual et al., 2004).

A espécie *Carica papaya* L. (Caricaceae) é uma herbácea tipicamente tropical, de grande importância econômica, cujo cultivo é feito tradicionalmente em solos com baixos teores de matéria orgânica e pobre em nutrientes (Dantas, 2000; Campostrini e Glenn, 2007). Adicionalmente, o nitrogênio (N) é um dos nutrientes mais exigidos pelo mamoeiro (Lima et al., 2011). Dessa forma, estudos de viabilidade técnica do uso de lodo de esgoto em campo foram inicialmente desenvolvidos com a cultura dessa espécie, onde

foi observado um aumento na produção do mamoeiro em função das doses crescentes do lodo higienizado com cal virgem (Souza et al., 2000; Costa et al., 2011).

Os estudos sobre análise de crescimento de espécies vegetais possibilitam acompanhar o desenvolvimento das plantas como um todo e a contribuição que os diferentes órgãos promovem no crescimento total, compondo um instrumento muito utilizado para comparações entre situações distintas, podendo ser aplicada às mais diversas modalidades de estudos (Nogueira e Conceição, 2000). Aliada a ela, análises químicas possibilitam uma compreensão mais aprofundada dos tipos e concentrações dos contaminantes presentes em amostras ambientais, auxiliando substancialmente as avaliações de qualidade ambiental. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação agrícola de doses crescentes de lodo de esgoto higienizado no crescimento inicial de *C. papaya*, por meio da integração de análises químicas e biológicas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Tratamento de higienização do lodo de esgoto

O lodo de esgoto digerido por reatores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) foi cedido pela Companhia Espírito Santense de Saneamento (CESAN) onde, após coleta, foi realizado o tratamento com caleação, por meio da mistura com cal virgem na proporção de 30% do peso seco do lodo bruto (Lima et al., 2011).

2.2 Determinação das dosagens a serem avaliadas

Para determinação das dosagens utilizadas no experimento inicialmente foi realizada a análise elementar (CHN) (Leco CHNS-932) do lodo tratado e higienizado para determinação do teor de nitrogênio do resíduo. Foram testadas cinco doses de nitrogênio: 0 (solo testemunha); 100; 200; 300 e 400 mg de N dm⁻³. A mistura dos diferentes teores de lodo higienizado foi feita com solo (latossolo) até completar o volume do vaso (8L).

2.3 Cultivo de *C. papaya*

Mudas da espécie *C. papaya*, variedade THB solos, com média aproximada de 15 cm de comprimento, foram obtidas no viveiro da Fazenda Experimental de Jucuruaba do INCAPER (20° 25' 20.02"S, 40° 28' 42.56"O), localizada no município de Viana/Espírito Santo. Para cada tratamento, foram montados 20 vasos. Foi calculada a capacidade de campo média para cada tratamento para irrigação uniforme dos indivíduos, mantendo cerca de 80% da capacidade máxima. O experimento foi realizado em casa de vegetação, localizada no campus de Goiabeiras da Universidade Federal do Espírito Santo/UFES/CCHN (20° 16' 29.97"S, 40° 18' 21.19"O).

2.4 Análise química

Após 60 e 90 dias de tratamento, amostras de solo, raízes e folhas foram selecionadas ao acaso para avaliação química. Três amostras de cada tratamento foram embaladas, etiquetadas e enviadas para o Centro de Análises Químicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para a caracterização dos macro e micronutrientes, seguindo os métodos de semi-micro-Kjeldahl para quantificação de nitrogênio (LABTEC LB 62-03); colorimetria do metavanadato para fósforo (SPECTRU SP-2000 UV); turbidimetria do sulfato de bário para enxofre (SPECTRU SP-2000 UV); fotometria de chama de emissão para potássio (MICRONAL B 462); espectrofotometria de absorção atômica para cálcio, magnésio, ferro, cobre, zinco e manganês (VARIAN SPETRAA 55 B); e colorimetria de curcumina para boro (SPECTRU SP-2000 UV).

2.5 Análise dos fatores de bioconcentração e translocação

O fator de bioconcentração (FBC) foi calculado para comparar os níveis de nutrientes acumulados no tecido da raiz em comparação à concentração original do solo, por meio da razão entre a concentração de cada elemento na raiz e no solo. O fator de translocação (Ft) foi utilizado para avaliar as concentrações de nutrientes nas folhas e suas correlações com os valores encontrados nas raízes, por meio da razão entre a concentração de cada elemento na folha e na raiz. Ambos os fatores foram considerados somente quando os valores encontrados foram maiores que 1, como descrito por Ali et al. (2013).

2.6 Avaliação morfológica em *C. papaya*

2.6.1 Análise de crescimento

Após os períodos de 60 e 90 dias, foram selecionados, aleatoriamente, cinco espécimes de cada concentração, a fim de realizar medidas de altura e diâmetro do caule; número de folhas e área foliar total (Área Mater, LI-COR 3100); e massa fresca e seca (estufa 37° C, até obtenção de peso constante) da parte aérea e radicular das plantas. A partir dessas medidas foram obtidas médias da área foliar específica (razão da área foliar total pela massa total das folhas); razão de raiz/parte aérea; e taxa de crescimento relativo $TCR = (LnM2 - LnM1)/(t2 - t1)$, (onde Ln = logaritmo natural; M2 = massa seca atual; M1 = massa inicial; t2 - t1 = diferença do tempo final e tempo inicial) (Hunt, 1978; Rocha et al., 2009).

2.6.2 Análises anatômicas

Para cada tratamento foram retiradas amostras das folhas e raízes de cinco indivíduos de *C. papaya*. Para as análises, as amostras foram fixadas e armazenadas em álcool etílico 70%.

A densidade estomática (mm^2) foi analisada no terço mediano da superfície abaxial da folha por meio da técnica de impressão, utilizando uma gota de adesivo instantâneo universal éster de cianoacrilato (Super-Bonder®) em uma lâmina histológica. Vinte e cinco campos ópticos aleatórios foram analisados por indivíduo em fotomicroscópio por meio de obtenção de fotos e contagem no programa TSVIEW.

Foram selecionados fragmentos das raízes fixadas, na região de 5 cm a partir do ápice. Secções transversais foram realizadas em micrótomo de mesa. Os cortes obtidos foram corados com floroglucinol acidificado (Johansen, 1940), para a determinação da presença de compostos lignificados. As lâminas foram analisadas em fotomicroscopia de luz e as fotos obtidas foram obtidas com o programa TSVIEW.

2.7 Análise de pigmentos fotossintetizantes em *C. papaya*

Para quantificação dos teores de pigmentos, a última folha completamente expandida foi coletada de cinco plantas de cada tratamento. Um disco de cerca de 0,0130 dm² foi retirado de cada folha, imerso em 5 mL (V) de dimetilsulfóxido (DMSO) e incubado a 70 °C por 30 minutos, no escuro (Hiscox; Israelstam,

1979). Após extração, os discos foram secos (37,5 °C, até obtenção de peso constante) e pesados (M). A leitura do extrato foi realizada em espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometer) nas absorvâncias de 480, 645, 663 nm. Os teores de pigmentos foram calculados por meio das seguintes fórmulas (Lichtenthaler e Welbum, 1983):

$$\text{Clorofila a} = [(12,7 \times A_{663}) - (2,69 \times A_{645})] \times V / (1000 \times M)$$

$$\text{Clorofila b} = [(22,9 \times A_{645}) - (4,68 \times A_{663})] \times V / (1000 \times M)$$

$$\text{Clorofila total} = [(20,2 \times A_{663}) - (2,69 \times A_{645})] \times V / (1000 \times M)$$

$$\text{Carotenóides} = [(1000 \times A_{470}) - (1,82 \times \text{Clor. a} - 85,02 \times \text{Clor. b})] \times V / (198 \times 1000 \times M)$$

2.8 Análises estatísticas

Utilizando o programa InfoStat, foi realizado ANOVA seguido por teste de Tukey ($p < 0,5$) para os índices genéticos, atividades enzimáticas, dados de crescimento vegetal, quantificação de pigmentos e análises químicas. Utilizando o programa ESTATISTICA, foi aplicada a análise de fatores como método de estatística multivariada aos dados obtidos (parâmetros químicos e biológicos). A análise de fatores foi realizada a partir da matriz de correlação, na qual as variáveis foram dimensionadas por meio do procedimento de varimax normalizada. Os principais fatores foram extraídos utilizando o critério de Kaiser, onde são considerados valores de eigenvalues acima de 1. O ponto de corte para seleção das variáveis incluídas nesses fatores foi de 0,7.

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise química

Os resultados da análise de composição elementar e nutrientes estão dispostos, respectivamente, nas Tabelas 1 e 2. Os valores de carbono, nitrogênio e hidrogênio encontrados no lodo de esgoto higienizado confirmam o potencial de utilização do resíduo como fonte de matéria orgânica e nutrientes. Adicionalmente, o teor de nitrogênio obtido (1,2%) (Tabela 1) foi utilizado para o cálculo da quantidade de lodo de esgoto higienizado a ser adicionada em cada tratamento.

Tabela 1. Caracterização elementar das amostras de lodo de esgoto higienizado e do solo testemunha. Valores expressos em média \pm DP.

	Elementos (%)		
	Nitrogênio	Carbono	Hidrogênio
Lodo de esgoto higienizado	1,21 \pm 0,09 ^b	10,72 \pm 0,65 ^b	2,62 \pm 0,62 ^b
Solo testemunha	0,24 \pm 0,05 ^a	2,95 \pm 0,58 ^a	0,51 \pm 0,08 ^a

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (teste de Tukey; $P < 0,05$).

O nitrogênio é considerado o principal nutriente inorgânico em plantas, sendo o maior constituinte de proteínas, ácidos nucleicos, muitos cofatores e metabólitos secundários. Assim, esse elemento afeta todos os níveis funcionais da planta, abrangendo desde o metabolismo até fontes de alocação, crescimento e desenvolvimento (Stitt and Krapp, 1999; Scheible et al., 2004).

De acordo com os protocolos de metodologia analítica para determinação de nutrientes no solo, a fração máxima de sólidos totais utilizada para leitura no equipamento para que não haja interferência de matriz corresponde a 200 μ g/L. Dessa forma, a variação na composição dos sedimentos avaliados pode ser de difícil detecção, considerando as proporções de mistura, o que justifica os resultados observados. Em contrapartida, plantas apresentam alta capacidade de biomagnificação (Monferrán et al., 2012), permitindo a detecção das reais diferenças entre suas fontes de nutrientes, fazendo com que a avaliação de efeitos de bioacumulação e translocação em plantas seja de extrema importância. Dessa forma, apesar da ausência de diferença significativa nos teores de nitrogênio no solo, observada nesse estudo, o aumento nos teores desse nutriente nas folhas e nas raízes, nas maiores dosagens, corrobora a eficiência do resíduo como fonte nutricional (Tabela 2).

O processo de calagem realizado na higienização do lodo de esgoto representa um aporte de cálcio para o solo e uma consequente fonte deste nutriente para as plantas, fato corroborado pelos teores observados neste estudo, onde a quantificação de cálcio no solo, raízes e folhas apresentou maiores valores nas maiores aplicações do resíduo (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização elementar e concentração de nutrientes no solo e em folhas e raízes de *C. papaya* (n=3 para cada dosagem). Valores expressos em média ± DP (g kg⁻¹ de massa seca). FBC: fator de bioconcentração, Ft: fator de translocação, ST: solo testemunha.

		Nutrientes											
		N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B	
60 dias	Solo	ST	1,83 ± 0,05 ^a	0,10 ± 0,11 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,86 ± 0,03 ^a	0,10 ± 0,00 ^a	0,29 ± 0,02 ^a	2,96 ± 0,65 ^a	0,007 ± 0,001 ^a	0,025 ± 0,013 ^a	0,05 ± 0,02 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
		100 N	1,90 ± 0,26 ^{ab}	0,06 ± 0,05 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	1,72 ± 0,14 ^b	0,10 ± 0,00 ^a	0,28 ± 0,01 ^a	3,63 ± 0,36 ^a	0,009 ± 0,001 ^a	0,023 ± 0,002 ^a	1,90 ± 3,25 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
		200 N	2,17 ± 0,06 ^{ab}	0,11 ± 0,08 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	2,76 ± 0,21 ^c	0,14 ± 0,03 ^{ab}	0,42 ± 0,15 ^a	3,25 ± 0,32 ^a	0,009 ± 0,001 ^a	0,031 ± 0,004 ^a	0,04 ± 0,02 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
		300 N	2,20 ± 0,00 ^b	0,09 ± 0,06 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	4,32 ± 0,37 ^d	0,18 ± 0,03 ^{bc}	0,55 ± 0,17 ^a	3,53 ± 0,15 ^a	0,011 ± 0,001 ^a	0,033 ± 0,003 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
		400 N	2,13 ± 0,12 ^{ab}	0,02 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	5,04 ± 0,46 ^d	0,21 ± 0,00 ^c	0,41 ± 0,02 ^a	3,20 ± 0,20 ^a	0,017 ± 0,009 ^a	0,033 ± 0,001 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
	Raiz	ST	16,22 ± 1,41 ^a	1,81 ± 0,10 ^a	47,49 ± 5,29 ^a	4,98 ± 0,11 ^a	7,00 ± 1,09 ^a	3,59 ± 0,52 ^a	0,63 ± 0,02 ^{ab}	0,017 ± 0,006 ^a	0,06 ± 0,01 ^{ab}	0,050 ± 0,010 ^b	0,049 ± 0,006 ^a
		100 N	17,62 ± 2,42 ^a	1,82 ± 0,07 ^a	54,66 ± 0,42 ^{ab}	7,28 ± 0,48 ^{ab}	8,95 ± 0,32 ^b	4,83 ± 0,29 ^{ab}	0,76 ± 0,03 ^{ab}	0,017 ± 0,001 ^a	0,08 ± 0,01 ^b	0,043 ± 0,003 ^{ab}	0,050 ± 0,006 ^a
		200 N	18,46 ± 2,32 ^a	1,76 ± 0,19 ^a	61,49 ± 7,79 ^b	9,00 ± 1,31 ^{bc}	8,86 ± 0,91 ^{ab}	5,71 ± 1,12 ^b	0,89 ± 0,22 ^b	0,017 ± 0,002 ^a	0,06 ± 0,01 ^{ab}	0,040 ± 0,014 ^{ab}	0,043 ± 0,006 ^a
		300 N	20,67 ± 1,39 ^a	1,74 ± 0,09 ^a	61,21 ± 3,16 ^b	9,22 ± 1,36 ^{bc}	9,43 ± 0,44 ^b	6,19 ± 0,69 ^b	0,59 ± 0,05 ^a	0,021 ± 0,003 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	0,026 ± 0,002 ^a	0,048 ± 0,001 ^a
		400 N	19,90 ± 1,12 ^a	1,84 ± 0,04 ^a	60,67 ± 1,27 ^b	10,33 ± 0,21 ^c	10,35 ± 0,41 ^b	5,82 ± 0,55 ^b	0,75 ± 0,03 ^{ab}	0,023 ± 0,001 ^a	0,06 ± 0,01 ^{ab}	0,041 ± 0,007 ^{ab}	0,045 ± 0,002 ^a
	Folha	ST	35,36 ± 4,75 ^a	2,28 ± 0,22 ^a	22,38 ± 3,19 ^a	12,55 ± 0,66 ^a	8,81 ± 0,71 ^a	6,17 ± 0,80 ^a	0,111 ± 0,019 ^a	0,020 ± 0,003 ^a	0,031 ± 0,012 ^a	0,054 ± 0,005 ^b	0,057 ± 0,004 ^b
		100 N	42,28 ± 4,93 ^{ab}	2,42 ± 0,15 ^a	27,38 ± 3,18 ^{ab}	16,12 ± 1,87 ^b	7,14 ± 0,99 ^a	4,91 ± 1,36 ^a	0,110 ± 0,020 ^a	0,020 ± 0,000 ^a	0,042 ± 0,014 ^a	0,033 ± 0,006 ^a	0,035 ± 0,013 ^a
		200 N	45,99 ± 1,28 ^b	2,40 ± 0,11 ^a	26,70 ± 1,11 ^{ab}	20,31 ± 0,73 ^c	7,54 ± 0,57 ^a	4,47 ± 0,84 ^a	0,097 ± 0,003 ^a	0,020 ± 0,002 ^a	0,031 ± 0,003 ^a	0,028 ± 0,005 ^a	0,034 ± 0,003 ^a
		300 N	50,80 ± 2,03 ^b	2,50 ± 0,19 ^a	31,87 ± 1,97 ^b	21,67 ± 0,54 ^c	8,30 ± 0,30 ^a	4,36 ± 0,66 ^a	0,113 ± 0,002 ^a	0,021 ± 0,002 ^a	0,033 ± 0,001 ^a	0,029 ± 0,007 ^a	0,037 ± 0,004 ^a
		400 N	48,53 ± 1,84 ^b	2,39 ± 0,08 ^a	30,75 ± 0,47 ^b	22,90 ± 1,91 ^c	8,34 ± 0,92 ^a	4,88 ± 0,87 ^a	0,112 ± 0,012 ^a	0,021 ± 0,001 ^a	0,041 ± 0,015 ^a	0,027 ± 0,002 ^a	0,037 ± 0,006 ^a
	FBC	ST	6,56 ± 4,23 ^a	42,97 ± 43,59 ^a	1583 ± 176 ^a	5,77 ± 0,14 ^d	70,03 ± 10,90 ^{ab}	12,47 ± 2,55 ^a	0,22 ± 0,05 ^{ab}	2,25 ± 0,66 ^a	2,65 ± 1,30 ^{ab}	1,46 ± 1,17 ^a	90,57 ± 54,65 ^a
		100 N	9,46 ± 2,23 ^a	78,84 ± 95,56 ^a	1438 ± 666 ^a	4,25 ± 0,36 ^c	89,47 ± 3,16 ^b	17,09 ± 1,70 ^a	0,21 ± 0,02 ^{ab}	2,02 ± 0,23 ^a	3,34 ± 0,10 ^b	1,44 ± 1,24 ^a	110,86 ± 57,11 ^a
		200 N	8,52 ± 1,01 ^a	34,24 ± 38,82 ^a	2050 ± 260 ^a	3,26 ± 0,42 ^b	65,55 ± 14,52 ^{ab}	15,21 ± 6,61 ^a	0,27 ± 0,06 ^b	2,03 ± 0,45 ^a	1,99 ± 0,50 ^{ab}	1,04 ± 0,40 ^a	128,56 ± 42,54 ^a
		300 N	9,40 ± 0,63 ^a	40,10 ± 44,17 ^a	2040 ± 105 ^a	2,15 ± 0,39 ^a	54,42 ± 9,83 ^a	11,84 ± 3,11 ^a	0,17 ± 0,02 ^a	2,03 ± 0,47 ^a	1,58 ± 0,31 ^a	0,52 ± 0,13 ^a	84,15 ± 31,15 ^a
		400 N	9,37 ± 1,05 ^a	122,5 ± 51,56 ^a	2022 ± 42 ^a	2,06 ± 0,14 ^a	49,29 ± 1,97 ^a	14,22 ± 1,67 ^a	0,23 ± 0,02 ^{ab}	1,61 ± 0,77 ^a	1,88 ± 0,33 ^{ab}	1,24 ± 0,44 ^a	116,98 ± 1,53 ^a
Ft	ST	2,19 ± 0,35 ^a	1,26 ± 0,07 ^a	0,48 ± 0,12 ^a	2,52 ± 0,16 ^a	1,27 ± 0,10 ^b	1,72 ± 0,09 ^b	0,18 ± 0,04 ^{ab}	1,262 ± 0,251 ^a	0,54 ± 0,12 ^a	1,10 ± 0,14 ^a	1,28 ± 0,13 ^b	
	100 N	2,43 ± 0,39 ^a	1,33 ± 0,05 ^a	0,79 ± 0,51 ^a	2,22 ± 0,28 ^a	0,80 ± 0,13 ^a	1,02 ± 0,32 ^a	0,15 ± 0,03 ^{ab}	1,157 ± 0,080 ^a	0,54 ± 0,18 ^a	0,77 ± 0,20 ^a	0,75 ± 0,36 ^{ab}	
	200 N	2,52 ± 0,32 ^a	1,37 ± 0,12 ^a	0,44 ± 0,04 ^a	2,29 ± 0,30 ^a	0,86 ± 0,09 ^a	0,79 ± 0,11 ^a	0,11 ± 0,02 ^a	1,167 ± 0,191 ^a	0,54 ± 0,15 ^a	0,74 ± 0,24 ^a	0,69 ± 0,13 ^a	
	300 N	2,46 ± 0,13 ^a	1,44 ± 0,15 ^a	0,52 ± 0,06 ^a	2,38 ± 0,30 ^a	0,88 ± 0,03 ^a	0,72 ± 0,19 ^a	0,19 ± 0,02 ^b	1,025 ± 0,269 ^a	0,65 ± 0,08 ^a	1,12 ± 0,34 ^a	0,88 ± 0,08 ^{ab}	
	400 N	2,44 ± 0,04 ^a	1,30 ± 0,04 ^a	0,51 ± 0,01 ^a	2,21 ± 0,15 ^a	0,81 ± 0,09 ^a	0,84 ± 0,10 ^a	0,15 ± 0,02 ^{ab}	0,914 ± 0,004 ^a	0,70 ± 0,36 ^a	0,66 ± 0,14 ^a	0,78 ± 0,14 ^{ab}	

Letras iguais na mesma coluna (dentro do mesmo período de exposição e para a mesma matriz) não diferem significativamente (teste de Tukey; P < 0,05).

Tabela 2. Continuação.

		Nutrientes											
		N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B	
90 dias	Solo	ST	2,17 ± 0,21 ^a	0,06 ± 0,04 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,83 ± 0,05 ^a	0,07 ± 0,03 ^a	0,29 ± 0,04 ^a	3,43 ± 0,08 ^a	0,013 ± 0,000 ^a	0,023 ± 0,001 ^a	0,050 ± 0,004 ^a	0,001 ± 0,001 ^{a,b}
		100 N	2,10 ± 0,36 ^a	0,09 ± 0,06 ^{a,b}	0,03 ± 0,00 ^a	1,85 ± 0,24 ^{a,b}	0,10 ± 0,00 ^a	0,30 ± 0,05 ^a	3,51 ± 0,43 ^a	0,031 ± 0,021 ^a	0,032 ± 0,005 ^{a,b}	0,057 ± 0,002 ^{a,b}	0,002 ± 0,001 ^b
		200 N	2,00 ± 0,17 ^a	0,13 ± 0,08 ^{a,b,c}	0,03 ± 0,00 ^a	2,65 ± 0,27 ^{a,b,c}	0,12 ± 0,03 ^a	0,37 ± 0,04 ^a	3,85 ± 0,10 ^a	0,057 ± 0,039 ^a	0,031 ± 0,002 ^{a,b}	0,059 ± 0,005 ^{a,b}	0,001 ± 0,000 ^a
		300 N	2,20 ± 0,17 ^a	0,22 ± 0,00 ^{b,c}	0,03 ± 0,00 ^a	3,81 ± 0,77 ^{b,c}	0,23 ± 0,03 ^b	0,33 ± 0,07 ^a	3,82 ± 0,48 ^a	0,011 ± 0,001 ^a	0,039 ± 0,010 ^{b,c}	0,056 ± 0,002 ^{a,b}	0,000 ± 0,000 ^a
		400 N	2,37 ± 0,15 ^a	0,25 ± 0,02 ^c	0,03 ± 0,00 ^a	4,73 ± 1,70 ^c	0,26 ± 0,00 ^b	0,35 ± 0,03 ^a	4,06 ± 0,32 ^a	0,013 ± 0,001 ^a	0,049 ± 0,006 ^c	0,062 ± 0,005 ^b	0,001 ± 0,001 ^{a,b}
	Raiz	ST	10,13 ± 1,70	2,09 ± 0,14	50,01 ± 20,65	5,37 ± 0,49	7,77 ± 0,84	2,86 ± 0,21	0,79 ± 0,03	0,023 ± 0,004	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,01
		100 N	13,56 ± 1,30	2,20 ± 0,15	37,23 ± 3,16	8,39 ± 0,27	8,63 ± 0,09	3,93 ± 0,13	0,82 ± 0,17	0,024 ± 0,007	0,08 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01
		200 N	12,79 ± 0,76	2,37 ± 0,27	44,49 ± 5,88	11,32 ± 0,66	8,10 ± 0,45	5,26 ± 0,94	0,92 ± 0,15	0,024 ± 0,005	0,09 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,08 ± 0,03
		300 N	16,43 ± 5,04	2,32 ± 0,09	44,48 ± 8,54	15,33 ± 1,23	9,07 ± 0,73	5,61 ± 0,84	1,20 ± 0,21	0,030 ± 0,002	0,10 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,01
		400 N	11,27 ± 1,40	2,44 ± 0,15	40,57 ± 13,60	15,22 ± 2,59	9,54 ± 0,68	5,84 ± 0,57	1,19 ± 0,24	0,031 ± 0,003	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,01
	Folha	ST	32,43 ± 2,45 ^{a,b}	3,46 ± 0,49 ^b	27,94 ± 1,80 ^a	27,70 ± 2,51 ^a	15,74 ± 0,43 ^b	13,91 ± 4,47 ^a	0,26 ± 0,07 ^a	0,041 ± 0,018 ^a	0,034 ± 0,009 ^a	0,118 ± 0,019 ^b	0,44 ± 0,06 ^b
		100 N	26,47 ± 0,64 ^a	2,12 ± 0,38 ^a	26,43 ± 2,85 ^a	24,25 ± 6,38 ^a	10,51 ± 2,43 ^a	13,48 ± 6,25 ^a	0,23 ± 0,01 ^a	0,021 ± 0,006 ^a	0,051 ± 0,011 ^a	0,048 ± 0,013 ^a	0,11 ± 0,02 ^a
		200 N	33,04 ± 3,75 ^b	2,13 ± 0,15 ^a	40,22 ± 1,32 ^b	26,21 ± 3,68 ^a	9,17 ± 0,40 ^a	13,42 ± 2,46 ^a	0,31 ± 0,09 ^a	0,032 ± 0,003 ^a	0,041 ± 0,003 ^a	0,039 ± 0,009 ^a	0,11 ± 0,01 ^a
		300 N	36,91 ± 2,46 ^{b,c}	2,22 ± 0,08 ^a	37,58 ± 1,45 ^b	23,19 ± 3,66 ^a	8,18 ± 1,03 ^a	12,64 ± 0,75 ^a	0,17 ± 0,05 ^a	0,026 ± 0,002 ^a	0,037 ± 0,004 ^a	0,029 ± 0,003 ^a	0,08 ± 0,03 ^a
		400 N	39,53 ± 1,52 ^c	2,23 ± 0,14 ^a	35,77 ± 1,74 ^b	22,05 ± 0,19 ^a	8,23 ± 0,15 ^a	10,59 ± 1,32 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,030 ± 0,006 ^a	0,036 ± 0,002 ^a	0,034 ± 0,005 ^a	0,08 ± 0,03 ^a
	FBC	ST	4,70 ± 0,88 ^a	53,07 ± 44,84 ^a	1667 ± 688 ^a	6,47 ± 0,35 ^b	131,07 ± 52,53 ^b	10,07 ± 1,14 ^a	0,23 ± 0,01 ^a	2,38 ± 1,22 ^a	4,01 ± 0,40 ^c	1,40 ± 0,17 ^b	45,80 ± 33,14 ^a
		100 N	6,64 ± 1,71 ^a	51,59 ± 58,02 ^a	1241 ± 105 ^a	4,56 ± 0,46 ^{a,b}	86,33 ± 0,92 ^{a,b}	13,30 ± 1,91 ^{a,b}	0,24 ± 0,08 ^a	1,65 ± 2,04 ^a	2,45 ± 0,20 ^{a,b}	0,85 ± 0,14 ^a	35,39 ± 16,68 ^a
		200 N	6,45 ± 0,98 ^a	24,94 ± 14,36 ^a	1483 ± 196 ^a	4,30 ± 0,56 ^a	71,34 ± 20,31 ^{a,b}	14,06 ± 1,54 ^{a,b}	0,24 ± 0,05 ^a	0,77 ± 0,78 ^a	2,87 ± 0,19 ^b	0,77 ± 0,18 ^a	156,56 ± 50,34 ^a
		300 N	7,61 ± 2,76 ^a	10,55 ± 0,39 ^a	1483 ± 285 ^a	4,09 ± 0,53 ^a	40,16 ± 2,06 ^a	17,92 ± 5,79 ^b	0,32 ± 0,09 ^a	2,82 ± 0,17 ^a	2,77 ± 0,64 ^b	0,96 ± 0,22 ^{a,b}	149,75 ± 68,84 ^a
		400 N	7,86 ± 5,69 ^a	9,93 ± 0,54 ^a	1352 ± 453 ^a	3,54 ± 1,39 ^a	36,68 ± 2,61 ^a	16,53 ± 1,35 ^{a,b}	0,29 ± 0,05 ^a	2,31 ± 0,27 ^a	1,58 ± 0,22 ^a	0,99 ± 0,20 ^{a,b}	77,01 ± 49,15 ^a
Ft	ST	3,28 ± 0,74 ^a	1,66 ± 0,17 ^b	0,62 ± 0,23 ^a	5,20 ± 0,81 ^b	2,04 ± 0,23 ^b	4,95 ± 1,90 ^a	0,33 ± 0,08 ^a	1,74 ± 0,57 ^a	0,38 ± 0,10 ^a	1,71 ± 0,37 ^b	9,10 ± 2,62 ^b	
	100 N	1,97 ± 0,20 ^a	0,96 ± 0,13 ^a	0,71 ± 0,02 ^a	2,91 ± 0,84 ^a	1,22 ± 0,28 ^a	3,47 ± 1,68 ^a	0,29 ± 0,06 ^a	0,93 ± 0,45 ^a	0,64 ± 0,04 ^b	1,00 ± 0,27 ^{a,b}	1,74 ± 0,60 ^a	
	200 N	2,59 ± 0,35 ^a	0,91 ± 0,11 ^a	0,91 ± 0,12 ^a	2,33 ± 0,47 ^a	1,14 ± 0,09 ^a	2,60 ± 0,65 ^a	0,35 ± 0,16 ^a	1,39 ± 0,40 ^a	0,46 ± 0,01 ^a	0,91 ± 0,38 ^a	1,54 ± 0,79 ^a	
	300 N	2,45 ± 1,03 ^a	0,96 ± 0,02 ^a	0,87 ± 0,16 ^a	1,52 ± 0,23 ^a	0,90 ± 0,04 ^a	2,29 ± 0,40 ^a	0,15 ± 0,07 ^a	0,87 ± 0,11 ^a	0,36 ± 0,06 ^a	0,56 ± 0,18 ^a	1,04 ± 0,53 ^a	
	400 N	2,83 ± 1,49 ^a	0,91 ± 0,10 ^a	0,97 ± 0,39 ^a	1,48 ± 0,24 ^a	0,87 ± 0,06 ^a	1,82 ± 0,21 ^a	0,14 ± 0,03 ^a	0,97 ± 0,10 ^a	0,47 ± 0,06 ^a	0,58 ± 0,22 ^a	1,23 ± 0,29 ^a	

Letras iguais na mesma coluna (dentro do mesmo período de exposição e para a mesma matriz) não diferem significativamente (teste de Tukey; P < 0,05).

Para as maiores dosagens de lodo de esgoto higienizado aplicadas foram observados, aos 60 dias, maiores teores de Mg e S nas raízes (Tabela 2). O magnésio possui diversas funções fisiológicas nos sistemas biológicos, estando dentre os nutrientes minerais essenciais para o desenvolvimento vegetal. Esse elemento desempenha um importante papel no carregamento do floema e transporte de fotoassimilados, levando a impactos positivos na fotossíntese, ativação enzimática e desenvolvimento dos órgãos vegetais (Cakmak, 2013). Adicionalmente, o período vegetativo dos cultivos requer um suprimento de enxofre para as raízes, essencial para uma melhor produção e qualidade das plantas (De Kok et al., 2011).

Neste trabalho foram observados altos teores de ferro para todos os tratamentos analisados (Tabela 2), o que representa uma característica dos solos encontrados no Espírito Santo (Souza et al., 2013). Adicionalmente, aos 60 dias, maiores teores de Fe foram observados nas raízes dos tratamentos com maiores dosagens de lodo de esgoto higienizado (Tabela 2). O ferro pode ser armazenado nos vacúolos e como ferritina nos plastídeos, desempenhando um papel crucial no metabolismo primário das plantas (Gollhofer et al., 2011).

Foram observados valores significativos (acima de 1) para ambos os fatores de bioconcentração e translocação para todos os tratamentos, na maioria dos elementos avaliados, confirmando o solo como fonte nutricional para os órgãos de *C. papaya*. Ao final do tempo de exposição (90 dias), foi observada uma tendência de aumento nos valores dos fatores para os tratamentos com solo testemunha. Por se tratarem de relações entre os teores observados em cada matriz avaliada, os teores mais baixos encontrados no solo, em relação às raízes e nas raízes em relação às folhas, justificam os maiores valores observados para a bioacumulação e a translocação, respectivamente (Tabela 2).

3.2 Análise morfológica em *C. papaya*

Todos os parâmetros de crescimento (diâmetro e altura do caule, número de folhas, área foliar, área foliar específica, incremento de raiz e parte aérea e razão raiz/parte aérea) na avaliação dos indivíduos de *C. papaya* mostraram resposta positiva à adição de lodo em relação ao solo testemunha, onde a maioria apresentou comportamento de dose dependência, evidenciado, principalmente, aos 90 dias de exposição (Tabela 3 e Figura 1).

Tabela 3. Resultados da avaliação de crescimento vegetal em indivíduos de *C. papaya* (n=5 para cada dosagem). Valores expressos em média \pm DP. ST: solo testemunha, *Áf*: área foliar, PA: parte aérea, TCR: taxa de crescimento relativo, NA: não avaliado.

		Parâmetros									
		Comprimento do caule (cm)	Diâmetro do caule (mm)	Número de folhas	<i>Áf</i> Total	<i>Áf</i> Específica	Incremento Raiz	Incremento PA	Razão massa seca Raiz/PA	TCR	Densidade estomática
60 dias	ST	34,90 \pm 6,93 ^a	8,92 \pm 2,85 ^a	16,20 \pm 2,59 ^a	486,94 \pm 106,47 ^a	378,28 \pm 120,62 ^a	0,89 \pm 0,24 ^a	2,68 \pm 0,29 ^a	0,33 \pm 0,08 ^a	0,06 \pm 0,0022 ^a	NA
	100 N	37,60 \pm 3,13 ^a	12,19 \pm 0,77 ^b	23,20 \pm 5,54 ^b	1096,57 \pm 270,67 ^b	421,78 \pm 118,42 ^a	1,53 \pm 0,26 ^b	5,64 \pm 0,71 ^b	0,27 \pm 0,02 ^a	0,08 \pm 0,0019 ^b	NA
	200 N	36,60 \pm 2,70 ^a	12,44 \pm 0,83 ^b	30,20 \pm 3,70 ^c	1069,92 \pm 179,69 ^b	348,06 \pm 74,49 ^a	1,80 \pm 0,20 ^b	6,22 \pm 0,20 ^{b,c}	0,29 \pm 0,04 ^a	0,08 \pm 0,0004 ^{b,c}	NA
	300 N	37,00 \pm 2,83 ^a	11,98 \pm 0,39 ^b	33,60 \pm 2,51 ^c	1039,05 \pm 103,57 ^b	361,22 \pm 57,67 ^a	1,73 \pm 0,25 ^b	6,19 \pm 0,18 ^{b,c}	0,28 \pm 0,04 ^a	0,08 \pm 0,0006 ^{b,c}	NA
	400 N	36,00 \pm 1,58 ^a	11,97 \pm 0,80 ^b	34,40 \pm 2,61 ^c	1174,23 \pm 149,54 ^b	339,32 \pm 29,75 ^a	1,91 \pm 0,27 ^b	6,87 \pm 0,38 ^c	0,28 \pm 0,05 ^a	0,08 \pm 0,0011 ^c	NA
90 dias	ST	35,26 \pm 3,52 ^a	11,66 \pm 1,42 ^a	11,66 \pm 1,42 ^a	643,02 \pm 78,39 ^a	530,44 \pm 94,07 ^b	2,10 \pm 0,57 ^a	3,75 \pm 0,78 ^a	0,56 \pm 0,13 ^a	0,05 \pm 0,0023 ^a	133,4 \pm 11,96 ^a
	100 N	41,10 \pm 3,17 ^b	16,15 \pm 2,62 ^b	16,15 \pm 2,62 ^b	1235,78 \pm 185,59 ^b	391,34 \pm 80,76 ^a	5,94 \pm 1,45 ^b	8,90 \pm 2,21 ^b	0,72 \pm 0,34 ^a	0,06 \pm 0,0016 ^b	184,8 \pm 34,39 ^b
	200 N	49,40 \pm 1,95 ^c	19,70 \pm 0,68 ^c	19,70 \pm 0,68 ^c	1848,44 \pm 122,65 ^c	490,19 \pm 58,76 ^{a,b}	8,82 \pm 2,28 ^{b,c}	11,72 \pm 1,72 ^{b,c}	0,78 \pm 0,28 ^a	0,06 \pm 0,0018 ^c	184 \pm 26,96 ^b
	300 N	49,00 \pm 2,55 ^c	18,98 \pm 0,97 ^c	18,98 \pm 0,97 ^d	1914,85 \pm 210,14 ^c	421,82 \pm 48,48 ^{a,b}	9,40 \pm 2,04 ^c	12,82 \pm 1,60 ^c	0,75 \pm 0,22 ^a	0,06 \pm 0,0010 ^c	189,7 \pm 5,58 ^b
	400 N	50,80 \pm 3,27 ^c	20,01 \pm 0,65 ^c	20,01 \pm 0,65 ^{c,d}	1882,46 \pm 107,41 ^c	454,91 \pm 52,10 ^{a,b}	10,26 \pm 1,93 ^c	13,69 \pm 1,36 ^c	0,75 \pm 0,13 ^a	0,06 \pm 0,0013 ^c	186,6 \pm 19,92 ^b

Letras iguais na mesma coluna (dentro do mesmo período de exposição) não diferem significativamente (teste de Tukey; P <0,05).

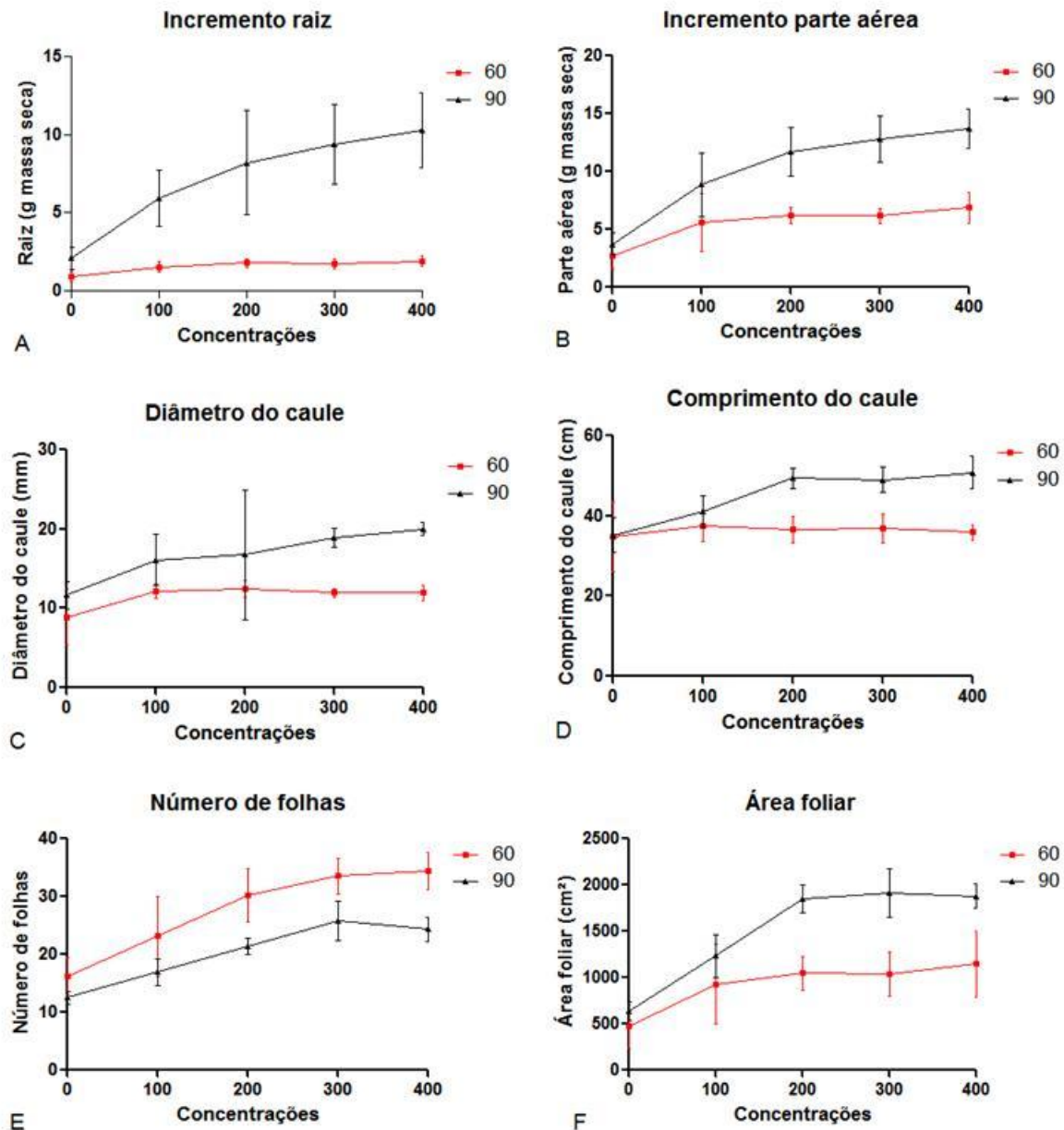


Figura 1: Resposta de dose-dependência dos parâmetros de crescimento de indivíduos de *C. papaya*. (A) Incremento de raiz; (B) Incremento de parte aérea; (C) Diâmetro do caule; (D) Comprimento do caule; (E) Número de folhas; (F) Área foliar.

Considerando a riqueza de nutrientes do lodo de esgoto, sua utilização representa uma fonte nutricional para a planta, levando a um melhor crescimento e desenvolvimento em relação a indivíduos cultivados em solos sem adição do resíduo. Adicionalmente, a quantificação de acumulação de biomassa é frequentemente utilizada no monitoramento dos efeitos de diversas variáveis ambientais, estando

relacionada à elevada disponibilidade nutricional gerada pelo lodo de esgoto (Qasim et al., 2001; Singh e Agrawal, 2010).

A taxa de crescimento relativo (TCR) representa uma medida da eficiência de produção das plantas, onde os valores observados indicaram um aumento conforme maiores teores de lodo de esgoto higienizado foram adicionados, principalmente ao final do período de exposição (Tabela 3), como observado em outros estudos de avaliação do efeito da aplicação de lodo de esgoto e de doses de nitrogênio (Singh e Agrawal, 2010; Jampeetong et al., 2013).

Na avaliação da densidade estomática, ao final do período de exposição (90 dias), foram observados maiores valores nos tratamentos com adição de lodo de esgoto (Tabela 3). Os estômatos são estruturas importantes para a produção vegetal, representando a entrada e escoamento dos gases para a fotossíntese, processo primordial relacionado à produtividade vegetal (Silva et al., 2005). Dessa forma, à medida que aumenta o número de estômatos por área, aumenta a capacidade da folha em captar CO₂ e realizar fotossíntese e converter em biomassa (Corrêa et al., 2009).

A lignina desempenha um papel fundamental no crescimento e adaptação de plantas herbáceas e lenhosas, apresentando uma maior composição energética que a celulose e a hemicelulose, o que sugere que menores teores de lignina geram um menor gasto metabólico para a planta, que pode ser direcionado para um maior desenvolvimento do indivíduo (White, 1987; Novaes et al., 2010). Dessa forma, o controle do crescimento vegetal e os teores de lignina aparentam estar altamente relacionados, fazendo com que maiores taxas de crescimento afetem o conteúdo de lignina nas plantas, como observado em estudos com indivíduos de *Eucalyptus* e *Populus* (Novaes et al., 2010). Na avaliação anatômica qualitativa, realizada neste estudo, os resultados observados corroboram a correlação negativa entre o desenvolvimento vegetal e a lignina, onde no tratamento realizado com solo testemunha foi observada uma maior presença de lignina em relação à maior dosagem de lodo de esgoto higienizado (Tabela 3 e Figura 2).

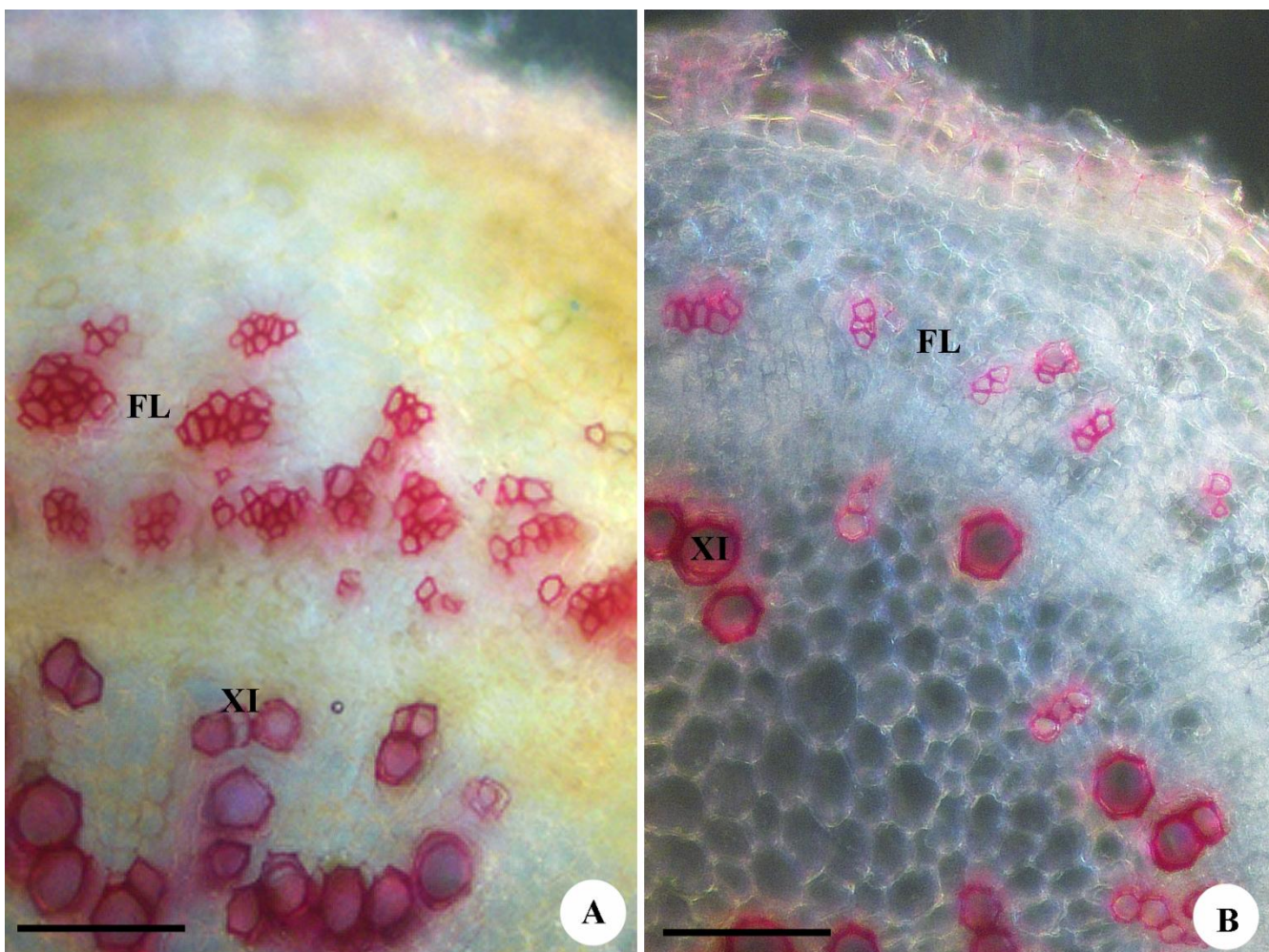


Figura 2: Avaliação qualitativa da anatomia com floroglucinol para detecção de estruturas lignificadas no floema e xilema (destacadas em rosa) da raiz de indivíduos de *C. papaya*. (A) Tratamento somente com solo testemunha (sem adição de lodo de esgoto higienizado); (B) Tratamento com 400 mg de N dm⁻³, maior dosagem aplicada de lodo de esgoto higienizado. FL: floema, XI: xilema.

3.3 Análise de pigmentos fotossintetizantes em *C. papaya*

Na avaliação dos teores de pigmentos fotossintetizantes, foi observada uma maior concentração para todos os pigmentos nos tratamentos com adição de lodo aos 90 dias (Tabela 4), o que pode ser explicado pela maior disponibilidade de nutrientes, como o nitrogênio (Tabela 2), na solução do solo, os quais fazem parte da molécula de clorofila e a sua maior absorção ocorre ao longo tempo (Corrêa et al., 2009). Em geral, os maiores teores de clorofila *a* observados (Tabela 4) podem estar relacionados ao ambiente de desenvolvimento da planta, de alta luminosidade, pois esse pigmento permite uma maior eficiência de absorção de luz mais intensa (Engel e Poggiani, 1991). O mesmo fato explica as altas concentrações de carotenóides, já que esses são pigmentos acessórios que protegem as moléculas de clorofilas e proteínas contra a fotoxidação sob luz excessiva (Taiz e Zeiger, 2004).

Tabela 4. Resultados da avaliação de pigmentos fotossintetizantes e análise de densidade estomática em indivíduos de *C. papaya* (n=5 para cada dosagem). Valores expressos em média \pm DP. *Ca*: clorofila a, *Cb*: clorofila b, *Ct*: clorofilas totais, *Carot*: carotenóides.

		Parâmetros					
		Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total	Carotenóides	Razão <i>Ca/Cb</i>	Razão <i>Ct/Carot</i>
60 dias	Solo testemunha	7,66 \pm 2,38 ^a	1,42 \pm 0,50 ^a	12,49 \pm 3,88 ^a	3,52 \pm 1,21 ^a	5,46 \pm 0,28 ^b	3,57 \pm 0,16 ^a
	100 N	8,86 \pm 1,86 ^a	1,79 \pm 0,40 ^a	14,45 \pm 3,04 ^a	4,17 \pm 0,79 ^a	4,95 \pm 0,16 ^a	3,46 \pm 0,14 ^a
	200 N	8,07 \pm 0,66 ^a	1,58 \pm 0,19 ^a	13,16 \pm 1,08 ^a	3,76 \pm 0,33 ^a	5,12 \pm 0,22 ^{a,b}	3,50 \pm 0,11 ^a
	300 N	7,76 \pm 0,72 ^a	1,54 \pm 0,15 ^a	12,67 \pm 1,17 ^a	3,71 \pm 0,40 ^a	5,05 \pm 0,08 ^a	3,42 \pm 0,06 ^a
	400 N	6,57 \pm 0,67 ^a	1,26 \pm 0,13 ^a	10,71 \pm 1,09 ^a	3,18 \pm 0,26 ^a	5,20 \pm 0,26 ^{a,b}	3,36 \pm 0,09 ^a
90 dias	Solo testemunha	8,79 \pm 1,90 ^a	1,43 \pm 0,44 ^{a,b}	14,32 \pm 3,10 ^a	4,19 \pm 1,01 ^{a,b}	6,25 \pm 0,62 ^a	3,44 \pm 0,12 ^a
	100 N	6,17 \pm 0,74 ^a	0,86 \pm 0,12 ^a	10,04 \pm 1,21 ^a	2,89 \pm 0,35 ^a	7,18 \pm 0,10 ^b	3,48 \pm 0,06 ^a
	200 N	17,12 \pm 5,07 ^b	2,51 \pm 0,78 ^{b,c}	27,87 \pm 8,26 ^b	7,93 \pm 2,41 ^{b,c}	6,84 \pm 0,16 ^{a,b}	3,52 \pm 0,07 ^a
	300 N	19,77 \pm 6,44 ^b	3,16 \pm 1,03 ^c	32,21 \pm 10,48 ^b	9,68 \pm 3,65 ^c	6,33 \pm 0,82 ^{a,b}	3,38 \pm 0,20 ^a
	400 N	19,22 \pm 4,10 ^b	3,04 \pm 0,65 ^c	31,31 \pm 6,68 ^b	9,13 \pm 2,10 ^c	6,33 \pm 0,28 ^{a,b}	3,44 \pm 0,12 ^a

Letras iguais na mesma coluna (dentro do mesmo tempo de exposição) não diferem significativamente (teste de Tukey; P <0,05).

3.4 Análise multivariada

A análise de fatores (AF) foi realizada inicialmente utilizando toda a matriz de dados, incluindo 9 parâmetros de crescimento, 6 parâmetros de análise de pigmentos fotossintéticos, 1 parâmetro anatômico (para avaliação após 90 dias) e 33 parâmetros químicos.

Na avaliação após 60 dias de tratamento, a AF gerou dez fatores (F1 a F10), contabilizando 92,81% da variância acumulada. O primeiro fator (F1), responsável por 38,18% da variância total, apresentou, como parâmetros de crescimento significativos, o número de folhas (0,898), a área foliar total (0,798), os incrementos de raiz (0,833) e de parte aérea (0,959) e a TCR (0,955), juntamente com os parâmetros químicos, no solo, de N (0,783), Ca (0,871) e Mg (0,760); nas raízes, de N (0,727), K (0,893), Ca (0,945), Mg (0,874) e S (0,918); e nas folhas, de N (0,911), K (0,832), Ca (0,935), Mn (-0,902) e B (-0,778). Esses resultados reforçam a importância da disponibilidade nutricional e seus efeitos no crescimento das plantas, corroborando os resultados obtidos nesse estudo, anteriormente descritos. O segundo componente principal (F2), com 15,37% da variância total, apresentou como parâmetros significativos os teores de pigmentos fotossintetizantes observados, evidenciando a relação existente entre eles. Os fatores seguintes (F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9 e F10) apresentaram, respectivamente, 9,84%, 6,86%, 5,41%, 4,99%, 4,55%, 2,98%, 2,41% e 2,21% da variância total, tendo como parâmetros significativos o teor de Fe nas raízes (F3), de P no solo (F4), de Zn nas folhas (F5), a área foliar específica (F6), a razão de incremento de raiz: parte aérea (F7), o teor de Zn nas raízes (F8) e de B também nas raízes (F10). O nono fator (F9) não apresentou parâmetros significativos.

Na avaliação após 90 dias de tratamento, a AF gerou nove fatores (F1 a F9), contabilizando 92,49% da variância acumulada. O primeiro fator (F1), responsável por 47,59% da variância total, apresentou, como parâmetros de crescimento significativos, o comprimento de caule (0,926), o diâmetro do caule (0,923), o número de folhas (0,807), a área foliar total (0,885), os incrementos de raiz (0,813) e de parte aérea (0,892), a TCR (0,911) e a densidade estomática (0,752), juntamente com os parâmetros químicos, no solo, de P (0,791), Ca (0,775), Mg (0,742), S (0,768), Fe (0,799) e Mn (0,819); nas raízes, Ca (0,823) e S (0,835); e nas folhas, de P (-0,768), K (0,761), Mg (-0,859), Mn (-0,826) e B (-0,821). As significâncias desses fatores nutricionais corroboram os resultados observados ao final do período de exposição, onde todos os fatores de crescimento avaliados, adicionalmente à avaliação anatômica, apresentaram resultados de estímulo com a adição do resíduo. O segundo componente principal (F2), com 13,98% da variância total, apresentou como parâmetros significativos os teores de pigmentos fotossintetizantes observados e a razão clorofilas totais: carotenóides, evidenciando a relação existente entre eles. Os fatores seguintes (F3, F4, F5, F6, F7, F8 e F9) apresentaram, respectivamente, 7,83%, 5,79%, 4,62%, 3,96%, 3,41%, 3,14% e 2,15% da variância total, tendo como parâmetros significativos o teor de Cu no solo (F3), a razão de incremento de raiz: parte aérea (F4), a área foliar específica e o teor de Cu nas folhas (F5), os teores de Ca e S nas folhas (F6), de K nas raízes (F7), de Zn nas raízes (F8) e de Cu também nas raízes (F9).

4. Conclusões

O presente estudo indica que a adição de lodo de esgoto higienizado ao solo modifica as características nutricionais do mesmo, levando a melhorias no desenvolvimento das plantas quanto aos aspectos de crescimento vegetal, principalmente devido ao seu elevado teor de nitrogênio e outros elementos. A representatividade de mais de um terço da variância total por parâmetros nutricionais e de crescimento corroboram os valores observados para as maiores dosagens do resíduo na avaliação de pigmentos fotossintetizantes e a correlação negativa quanto à presença de lignina, caracteriza.

5. Referências bibliográficas

- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals - Concepts and applications. *Chemosphere* 91, 869-881.
- Antolín, M.C., Pascual, I., García, C.Polo, A., Sánchez-Díaz, M., 2005. Growth, yield and solute content of barley in soils treated with sewage sludge under semiarid Mediterranean conditions *Field Crop Res.* 94, 224–237.
- Bettiol, W., Camargo, O.A., 2006. A disposição de lodo de esgoto em solo agrícola. In: Bettiol, W., Camargo, O.A. (eds.). *Lodo de esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura*. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, pp. 25-35.
- Brasil, 2006. Resolução CONAMA N° 375/2006, de 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. Brasília, Brasil.
- Bukatsch, F., 1972. Bermerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61, 255.
- Cakmak, I., 2013. Magnesium in crop production, food quality and human health. *Plant Soil* 368, 1-4.
- Campostrini, E., Glenn, D.M., 2007. Ecophysiology of papaya: a review. *Braz. J. Plant Physiol.* 19, 413-424.

Carbonell, G., Pro, J., Gómez, N., Babín, M.M., Fernández, C., Alonso, E., Tarazona, J.V., 2009. Sewage sludge applied to agricultural soil: Ecotoxicological effects on representative soil organisms. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 1309-1319.

CEC (Council of the European Communities), 1986. Council Directive 86/278/EEC, of 12 June 1986. On the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. *Official Journal* 181, pp. 6-18.

Corrêa, R.M., Pinto, J.E.B.P., Reis, E.S., Oliveira, C., Castro, E.M., Brant, R.S., 2009. Características anatómicas foliares de plantas de orégano (*Origanum vulgare* L.) submetidas a diferentes fontes e níveis de adubação orgânica. *Maringá* 31, 439-444.

Costa, A.N., Costa, A.F.S., 2011. Manual de uso agrícola e disposição do lodo de esgoto para o Estado do Espírito Santo. Incaper, Vitória.

Costa, A.F.S., Costa, A.N., Caetano, L.C.S., Maia, F.G., 2011. Disposição do lodo de ETE no solo e seu efeito na produção agrícola. In: Costa, A.N., Costa, A.F.S. (Org.). Manual de uso agrícola e disposição do lodo de esgoto para o estado do Espírito Santo. Incaper, Vitória, pp. 37-43.

Dantas, J.L.L., 2000. Introdução. In: Trindade, A.V. (Org.). Mamão: Produção - Aspectos Técnicos. Embrapa, Brasília, 9 p.

De Kok, L.J., Stulen, I., Hawkesford, M.J., 2011. Sulfur Nutrition in Crop Plants. In: Hawkesford, M.J., Barraclough, P. (eds). *The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 295-309.

Engel, V.L., Poggiani, F., 1991. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. *Braz. J. Plant Physiol.* 3, 39-45.

Fernandes, F., Silva, S.M.C.P., 1999. Manual Prático para a Compostagem de Biossólidos. Universidade Estadual de Londrina, Programa de Pesquisa em Saneamento Básico, 91p.

Gollhofer, J., Schläwicke, C., Jungnick, N., Schmidt, W., Buckhout, T.J., 2011. Members of a small family of nodulin-like genes are regulated under iron deficiency in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 557-564.

Grotto, D., Carneiro, M.F.H., Sauer, E., Garcia, S.C., Melo, W.J., Barbosa Jr, F., 2013. Evaluation of biochemical and redox parameters in rats fed with corn grown in soil amended with urban sewage sludge. *Ecotox. Environ. Safe.* 95, 188-194.

Hunt, R., 1978. *Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis*. Edward Arnold Publishers, London, 80 p.

Jampeetong, A., Konnerup, D., Piwpuan, N., Brix, H., 2013. Interactive effects of nitrogen form and pH on growth, morphology, N uptake and mineral contents of *Coix lacryma-jobi* L. *Aqua. Bot.* 111, 144-149.

Johansen, D.A., 1940. *Plant microtechnique*. 3 ed. Paul B. Hoeber Inc., Nova York, 790 p.

Kelessidis, A., Stasinakis, A.S., 2012. Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. *Waste Manag.* 32, 1186–1195.

Lichtenthaler, H.K., Welburn, A.R., 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Transac.* 11, 591-592.

Lima, M.F., Mattos, C.N., Vieira, P.L.C., Almeida, L.F., 2011. Geração de lodo de esgoto e seu potencial como fonte de matéria orgânica para a agricultura. In: Costa, A.N., Costa, A.F.S. (Org.), *Manual de uso agrícola e disposição do lodo de esgoto para o estado do Espírito Santo*. Incaper, Vitória, pp. 11-17.

Monferrán, M.V., Pignata, M.L., Wunderlin, D.A., 2012. Enhanced phytoextraction of chromium by the aquatic macrophyte *Potamogeton pusillus* in presence of copper. *Environ. Pollut.* 161, 15-22.

Nogueira, O.L., Conceição, H.E.O., 2000. Análise de crescimento de açaizeiros em áreas de várzea do estuário amazônico. *Pesq. Agropec. Bras.* 35, 2167-2173.

Novaes, E., Kirst, M., Chiang, V., Winter-Sederoff, H., Sederoff, R., 2010. Lignin and Biomass: A Negative Correlation for Wood Formation and Lignin Content in Trees. *Plant Physiol.* 154, 555-561.

- Pascual, I., Antolín, M.C., García, C., Polo, A., Sánchez-Díaz, M., 2004. Plant availability of heavy metals in a soil amended with a high dose of sewage sludge under drought conditions. *Biol. Fert. Soils* 40, 291–299.
- Qasim, M., Javed, Himayatullah, N., Subhan, M., 2001. Effect of sewage sludge on the growth of maize crop. *J. Biol. Sci.* 1,52–54.
- Rocha, A.C., Canal, E.C., Campostrini, E., Reis, F.O., Cuzzuol, G.R.F., 2009. Influence of chromium in *Laguncularia racemosa* (L). Gaertn f. physiology. *Braz. J. Plant Physiol.* 21, 87-94.
- Scheible, W.R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M.K., Stitt, M., 2004. Genome-Wide Reprogramming of Primary and Secondary Metabolism, Protein Synthesis, Cellular Growth Processes, and the Regulatory Infrastructure of *Arabidopsis* in Response to Nitrogen. *Plant Physiol.* 136, 2483–2499.
- Silva, L.M., Alquini, Y., Cavallet, V.J., 2005. Interrelações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. *Acta Bot. Bras.* 19, 183-194.
- Singh, R.P., Agrawal, M., 2010. Variations in heavy metal accumulation, growth and yield of rice plants grown at different sewage sludge amendment rates. *Ecotox. Environ. Safe.* 73, 632-641.
- Souza, L.S., Coelho, E.F., Oliveira, A.M.G., 2000. Calagem, Exigências Nutricionais e Adubação. In: Trindade, A.V. (Org.). *Mamão: Produção - Aspectos Técnicos*. Embrapa, Brasília, pp. 26-34.
- Souza, I.C., Duarte, I.D., Pimentel, N.Q., Rocha, L.D., Morozesk, M., Bonomo, M.M., Azevedo, V.C., Pereira, C.D.S., Monferrán, M.V., Milanez, C.R.D., Matsumoto, S.T., Wunderlin, D.A., Fernandes, M.N., 2013. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. *Environ. Pollut.* 180, 136-144.
- Stitt, M., Krapp, A., 1999. The molecular physiological basis for the interaction between elevated carbon dioxide and nutrients. *Plant Cell Environ.* 22, 583–622.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2004. *Plant physiology*. Sinauer, Massachusetts.

USEPA (United States Environmental Protection), 1995. Process design manual: Land application of sewage sludge and domestic septage. EPA 625/R-95/001. Washington D. C.

White, R.H., 1987. Effect of lignin content and extractives on the higher heating value of wood. *Wood Fiber Sci.* 19, 446–452.

Artigo 2

Após tradução este artigo será submetido à revista “Environmental Research”.

ISSN: 0013-9351

Caracterização química e efeitos citotóxicos e enzimáticos de doses de lodo de esgoto higienizado em plantas

Autores: Marina Marques Bonomo^a, Mariana Morozesk^a, Iara da Costa Souza^b, Livia Dorsch Rocha^a, Ian Drumond Duarte^a, Adelaide de Fátima Santana da Costa^c, Maria Tereza W. Dias Carneiro Lima^d, Eustáquio Vinícius Ribeiro de Castro^d, Marisa Narciso Fernandes^b e Silvia Tamie Matsumoto^a.

^aDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, 29075-910, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

^bDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Av. Washington Luiz, Km 235, 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brasil.

^cInstituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, Rua Afonso Sarlo, 160, 29052-010, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

^dDepartamento de Química, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, 29075-910, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

* Correspondência do autor: 55 27 33357251, siltamie@gmail.com.

Resumo

A aplicação de lodo de esgoto na agricultura é uma prática crescente em muitos países, devido a seus inúmeros benefícios para o solo e para as plantas. Porém, o monitoramento dos efeitos da utilização do resíduo é de extrema importância, considerando que este apresenta contaminantes com potencial tóxico para os organismos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas da aplicação agrícola de doses de lodo de esgoto higienizado em plantas, por meio da integração de análises químicas e biológicas, visando elucidar os potenciais riscos da utilização deste resíduo. Apesar dos níveis de poluentes estarem dentro dos limites preconizados pelas principais legislações vigentes, foram observados efeitos citogenéticos e de atividade enzimática nas maiores concentrações do lodo de esgoto higienizado, indicando que a adição de uma quantidade excessiva do resíduo pode levar a efeitos prejudiciais para a planta. Dessa forma, a correlação entre análises químicas, genéticas e enzimáticas compõe uma importante ferramenta na avaliação dos efeitos da aplicação do lodo de esgoto higienizado em *C. papaya*, devido à complexidade do resíduo.

Palavras-chave: *Carica papaya* L.; *Allium cepa* L.; Estresse oxidativo; Mutagenicidade; Citotoxicidade.

1. Introdução

O tratamento de efluentes sanitários é realizado em diversas etapas e leva à produção de lodo de esgoto, resíduo que apresenta diferentes composições químicas e biológicas, variando de acordo com o método de estabilização e tratamento utilizado (Kelessidis e Stasinakis, 2012). Conseqüentemente, são necessários métodos alternativos para uma disposição final do resíduo ambientalmente segura (Grotto et al., 2013). Dentre as alternativas de disposição final, as mais comumente aplicadas são a utilização como insumo agrícola, disposição em aterros, reutilização industrial e incineração (Costa e Costa, 2011; Kelessidis e Stasinakis, 2012).

A aplicação do lodo de esgoto na agricultura é uma prática crescente em diversos países, sendo as concentrações permitidas de nutrientes, metais, poluentes orgânicos e patógenos estabelecidas pela legislação correspondente de cada região (CEC, 1986; USEPA, 1995; Brasil, 2006; Carbonell et al., 2009). As dosagens utilizadas são determinadas de acordo com cada cultura e podem ser realizadas, após processos complementares de tratamento, pela adição de cal, o que eleva o pH, a fim de reduzir os níveis de patógenos do resíduo (Brasil, 2006; Costa e Costa, 2011).

Análises químicas fornecem somente parte do conhecimento necessário para a avaliação de misturas complexas, sendo restrita a informação dos constituintes químicos dos compostos avaliados (Wang et al., 2003). Adicionalmente, ensaios em laboratório são ferramentas de monitoramento que permitem a avaliação dos efeitos de contaminantes ambientais no aparato metabólico dos organismos, possibilitando estimar os possíveis danos e benefícios frente ao gasto energético exigido para o desenvolvimento nas condições estabelecidas (Carballeira et al., 2012; Sales et al., 2013). Nesse contexto, a avaliação da atividade de enzimas relacionadas à biotransformação e processos antioxidantes tem sido amplamente utilizada em estudos ambientais (Atli et al., 2006; Sakuragui et al., 2013). Adicionalmente, o potencial tóxico de compostos pode ser investigado por meio da avaliação de danos citogenéticos (Fenech et al., 2003), considerando a capacidade de muitos químicos em causar alterações no DNA, levando ao acionamento de mecanismos de reparo e à possível fixação de danos que podem comprometer processos essenciais no metabolismo do organismo (Caritá e Marin-Morales, 2008; Singh et al., 2009).

A espécie *Carica papaya* L. é uma herbácea tipicamente tropical de grande importância econômica (Dantas, 2000; Campostrini e Glenn, 2007). Considerando seu cultivo tradicional em solos com baixos teores de matéria orgânica e pobre em nutrientes e sendo o nitrogênio (N) um dos nutrientes mais exigidos pelo mamoeiro, estudos de viabilidade técnica do uso de lodo de esgoto em campo foram inicialmente desenvolvidos com a cultura dessa espécie. Nestes estudos foram observados aumentos na produção do

mamoeiro em função das doses crescentes do lodo higienizado com cal virgem (Souza et al., 2000; Costa et al., 2011).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação agrícola em *C. papaya* de doses de lodo de esgoto higienizado, por meio da integração de análises químicas e biológicas, visando elucidar os custos metabólicos da utilização deste resíduo, para uma interpretação eficaz da viabilidade do uso deste resíduo e dos potenciais danos que este lodo de esgoto higienizado promove nessa cultura.

2. Materiais e Métodos

2.1 Tratamento de higienização do lodo de esgoto

O lodo de esgoto digerido por reatores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) foi cedido pela Companhia Espírito Santense de Saneamento (CESAN) onde, após coleta, foi realizado o tratamento com caleação, por meio da mistura com cal virgem na proporção de 30% do peso seco do lodo bruto (Lima et al., 2011).

2.2 Determinação das dosagens a serem avaliadas

Para determinação das dosagens utilizadas no experimento inicialmente foi realizada a análise elementar (CHN) (Leco CHNS-932) do lodo tratado e higienizado para determinação do teor de nitrogênio do resíduo. Foram testadas cinco doses de nitrogênio: 0; 100; 200; 300 e 400 mg de N dm⁻³. A mistura dos diferentes teores de lodo higienizado foi feita com solo (latossolo) até completar o volume do vaso (8L) e foi realizada com auxílio de betoneira.

2.3 Cultivo de *C. papaya*

Mudas da espécie *C. papaya*, variedade THB solos, com média aproximada de 15 cm de comprimento, foram obtidas no viveiro da Fazenda Experimental de Jucuruaba do INCAPER (20° 25' 20.02"S, 40° 28' 42.56"O), localizada no município de Viana/Espírito Santo. Para cada tratamento, foram montados 20 vasos. Foi calculada a capacidade de campo média para cada tratamento para irrigação uniforme dos indivíduos, mantendo cerca de 80% da capacidade máxima. O experimento teve duração de 90 dias e foi

realizado em casa de vegetação, localizada no campus de Goiabeiras da Universidade Federal do Espírito Santo/UFES (20° 16' 29.97"S, 40° 18' 21.19"O).

2.3 Análise química

Foram coletadas amostras de lodo de esgoto bruto, lodo de esgoto higienizado e de solo (latossolo). As amostras do lodo de esgoto bruto foram encaminhadas para o Centro Tecnológico de Análises – CETAN, Vitória/ES, para análise de benzenos clorados (EPA 8260-B); ésteres de ftalatos (EPA 8061); fenóis clorados e não clorados e poluentes orgânicos persistentes (EPA 8270-D); hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (SM 6440-B); nitrogênio amoniacal, nitrato, nitrito e sólidos totais voláteis (EPA-SW 846); mercúrio (EPA 7470-A); molibdênio (EPA 6010-C) e parâmetros biológicos (EPA 1682, EPA-SW 846, CETESB L5.550, CETESB L5.504, CETESB L5.506) e enquadramento na legislação vigente. Três amostras do lodo de esgoto higienizado e do solo foram embaladas, etiquetadas e enviadas para o Centro de Análises Químicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para a caracterização dos macro e micronutrientes, seguindo os métodos de semi-micro-Kjeldahl para quantificação de nitrogênio (LABTEC LB 62-03); colorimetria do metavanadato para fósforo (SPECTRU SP-2000 UV); turbidimetria do sulfato de bário para enxofre (SPECTRU SP-2000 UV); fotometria de chama de emissão para potássio (MICRONAL B 462); espectrofotometria de absorção atômica para cálcio, magnésio, ferro, cobre, zinco e manganês (VARIAN SPETRAA 55 B); e colorimetria de curcumina para boro (SPECTRU SP-2000 UV).

2.4 Biomarcadores Bioquímicos

O extrato enzimático foi preparado a partir de amostras das folhas apicais de *C. papaya* coletadas após 30, 60 e 90 dias de tratamento. A concentração de proteína total em cada amostra foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) a 595 nm, utilizando albumina bovina sérica para determinação da curva padrão em microplaca (Dynex Technologies Ltd.,USA). Para avaliação de exposição, seis biomarcadores foram avaliados: superóxido dismutase (SOD), como descrito por McCord e Fridovich (1969); catalase (CAT), conforme descrito por Beutler (1975); e glutathione-S-transferase (GST), descrito por Habig e Jakoby (1981). Adicionalmente, foi realizada a análise da do peroxidase ascorbato (APX) conforme Nakano e Asada (1981) e de ATPase total/H⁺-ATPase segundo metodologia de Gibbs e Somero (1989) com adaptações (Kultz e Somero, 1995; Gonzales et al., 2005). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e adaptados para microplaca.

2.5 Ensaio *Allium cepa*

Para a avaliação citogenética em *A. cepa*, foram preparados solubilizados de cada tratamento, em adição a uma amostra de lodo higienizado. Após secagem em estufa (37,5 °C) até obtenção de peso constante, 250 g de cada amostra foram adicionados a 1000 mL de água deionizada e agitados a baixa velocidade por 5 minutos. Posteriormente foram deixados em repouso por 7 dias (24 °C) e em seguida o solubilizado foi filtrado utilizando membrana de 45µm (ABNT, 2004).

O ensaio em *A. cepa* foi realizado com base no protocolo estabelecido por Grant (1982) com adaptações, utilizando sementes da variedade Baia Periforme de mesmo lote. Como controle negativo foi utilizado água deionizada e como controle positivo metil metano sulfonato (MMS) na concentração final de 4×10^{-4} M. Após medições das radículas, a coloração foi realizada de acordo com a metodologia convencional de Feulgen, na qual as raízes foram expostas ao reativo de Schiff, por duas horas em local escuro. Lâminas foram confeccionadas a partir das regiões de meristema e F1 das raízes e analisadas em microscopia de luz. Aproximadamente 1000 células de cada região foram contabilizadas por lâmina, totalizando cinco lâminas para cada tratamento para o cálculo dos índices mitótico, índice de aberrações cromossômicas (índice de genotoxicidade) e mutagênico.

2.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa InfoStat, com aplicação de ANOVA seguido de teste de Tukey ($P < 0,05$) para comparação das médias.

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise química

Os resultados obtidos na análise do lodo de esgoto bruto (Tabela 1) mostram o enquadramento deste resíduo nos limites preconizados pela legislação para todos os parâmetros e poluentes avaliados (CEC, 1986; USEPA, 1995; Brasil, 2006). Com base no teor de nitrogênio foi calculada a quantidade de lodo higienizado a ser misturada com o solo para obtenção das dosagens avaliadas. As concentrações de carbono, nitrogênio, hidrogênio e nutrientes observadas (Tabela 2) confirmam o potencial de utilização do

resíduo como insumo agrícola e as concentrações de mercúrio e molibdênio observadas estão até 10 vezes abaixo do preconizado pela legislação (Brasil, 2006).

Tabela 1. Avaliação química do lodo de esgoto bruto para enquadramento nas condições estabelecidas pela legislação.

Parâmetro	CONAMA 375/06	Lodo de Esgoto Bruto
Benzenos clorados		
1,2-Diclorobenzeno	0,73	< 0,0001
1,3-Diclorobenzeno	0,39	< 0,0001
1,4-Diclorobenzeno	0,39	< 0,0001
1,2,3-Triclorobenzeno	0,01	< 0,0001
1,2,4- Triclorobenzeno	0,011	< 0,0001
1,3,5-Triclorobenzeno	0,5	< 0,0001
1,2,3,4-Tetraclorobenzeno	0,16	< 0,0001
1,2,4,5-Tetraclorobenzeno	0,01	< 0,0001
1,2,3,5- Tetraclorobenzeno	0,0065	< 0,0001
Esteres de ftalatos		
Di-n-butil ftalato	0,7	< 0,001
Di (2-etihexil)-ftalato (OEHP)	1,0	< 0,001
Dimetil-ftalato	0,25	< 0,001
Fenóis não clorados		
o-Cresol	--	0,00019
m-Cresol	--	0,00015
p-Cresol'	--	0,00034
Fenóis clorados		
2,4-Diclorofenol	0,031	< 0,0001
2,4,6- Triclorofenol	2,4	< 0,0001
Pentaclorofenol	0,16	0,00066
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH)		
Benzo(a)antraceno	0,025	< 0,0001
Benzo(a)pireno	0,052	< 0,0001
Benzo(k)fluoranteno	0,38	< 0,0001
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,031	< 0,0001
Naftaleno	0,12	< 0,0001
Fenantreno	3,3	< 0,0001
Lindano	0,001	< 0,0001
Poluentes orgânicos persistentes (POP)		
Aldrin.	--	< 0,0001
Dieldrin	--	< 0,0001
Endrin	--	< 0,0001
Clordano	--	< 0,0001
Heptacloro	--	< 0,0001
DDT	--	< 0,0001
Toxafeno	--	< 0,0001

Tabela 1. Continuação.

Parâmetro	CONAMA 375/06	Lodo de Esgoto Bruto
Poluentes orgânicos persistentes (POP)		
Mirex	--	< 0,0001
Hexaclorobenzeno	--	< 0,0001
PCB (Bifenilas Policloradas)	--	< 0,0001
Dioxinas e Furanos	--	< 0,0001
Parâmetros físicos e químicos		
Nitrogênio amoniacal	--	9580
Nitrato	--	268,6
Nítrito	--	6,58
Merúrio	17	0,04
Molibdênio	50	6,25
Sólidos Totais Voláteis	--	458.500
Parâmetros biológicos		
<i>Salmonella</i> spp.		8 UFC/10mg
Coliformes Termotolerantes	Classe A: Coliformes Termt. <10 ³ NMP/g de ST; Ovos viáveis <0,25 ovo/g de ST; <i>Salmonella</i> (UFC) ausente em 10mg de ST; Vírus <0,25 UFP ou UFF/g de ST	3,5 x 10 ⁸ NMP/g
Ovos viáveis de Helmintos		6 ovo/g
Adenovírus	Classe B: Coliformes Termt. <10 ⁶ NMP/g de ST; Ovos viáveis <10 ovos/g de ST	0,5 UFP/g
Gênero Enterovirus (Poliovírus, Echovirus, Coxsackievírus)		0,75 UFP/g

Tabela 2. Caracterização elementar das amostras de lodo de esgoto higienizado e do solo testemunha. Valores expressos em média \pm DP (% para N, C e H e mg kg^{-1} de massa seca para demais elementos).

	Elementos												
	N	C	H	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B
Lodo de esgoto higienizado	1,21 \pm 0,09 ^b	10,72 \pm 0,65 ^b	2,62 \pm 0,62 ^b	2,63 \pm 0,03 ^b	3,22 \pm 0,03 ^b	91,4 \pm 0,03 ^b	3,38 \pm 0,02 ^b	5,6 \pm 0,03 ^b	8340 \pm 0,4 ^b	118 \pm 0,42 ^b	400 \pm 0,55 ^b	136 \pm 0,35 ^b	2,76 \pm 0,02 ^b
Solo testemunha	0,24 \pm 0,05 ^a	2,95 \pm 0,58 ^a	0,51 \pm 0,08 ^a	0,69 \pm 0,51 ^a	0,17 \pm 0,02 ^a	2,05 \pm 0,13 ^a	0,16 \pm 0,02 ^a	0,38 \pm 0,03 ^a	4524 \pm 1,5 ^a	9,9 \pm 0,36 ^a	46,2 \pm 0,47 ^a	83,9 \pm 0,31 ^a	0,001 \pm 0,0 ^a

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (teste de Tukey; $P < 0,05$).

3.2 Biomarcadores bioquímicos

A análise enzimática realizada em *C. papaya* após 30 dias de tratamento demonstrou a ocorrência de um aumento nas atividades das enzimas de estresse oxidativo SOD, APX e GST na maioria dos tratamentos com adição de lodo de esgoto higienizado (Tabela 3). Esses resultados podem indicar uma resposta inicial da planta à presença de contaminantes, considerando o papel dessas enzimas na proteção a radicais livres e xenobióticos (Singh et al., 2004). A SOD constitui a primeira linha de defesa contra a presença de radicais livres, rapidamente os convertendo em O_2 e H_2O_2 (Alscher et al., 2002). Considerando a alta toxicidade do peróxido para a integridade celular, devido ao seu caráter oxidante, este necessita de uma rápida neutralização, sendo este papel exercido pela ação da APX (Mishra et al., 2006). Dessa forma, a liberação de peróxido constitui um sinal sistêmico para a indução da atividade da APX (Morita et al., 1999). Adicionalmente, a atividade da GST está relacionada a presença de contaminantes no solo (Yadav et al., 2010), o que corrobora os resultados observados, considerando que os níveis de poluentes aumentam de forma diretamente proporcional à adição de lodo de esgoto.

Os resultados observados na avaliação após 60 dias indicam um início de resposta da planta à disponibilidade nutricional, havendo um aumento na atividade da enzima APX para o tratamento com solo testemunha, sem adição de lodo (Tabela 3). Baixos níveis de nutrientes no solo podem levar a um aumento das atividades antioxidantes (Agrawal e Rathore, 2007), fato este corroborado pelos resultados observados, considerando que o lodo de esgoto higienizado consiste em uma expressiva fonte de matéria orgânica e nutrientes para as plantas (Lima et al., 2011). Por outro lado, uma maior atividade das enzimas CAT e GST foi verificada para nos tratamentos 200 N e 300 N (Tabela 3) o que representa a continuidade da resposta da planta à presença de contaminantes. O aumento da atividade da CAT está relacionado com a presença de poluentes, representando um das vias de neutralização do peróxido cuja produção é induzida por estes contaminantes (Lakhdar et al., 2010; Cardoso et al., 2005).

A resposta da planta aos teores nutricionais foi intensificada após 90 dias de tratamento, corroborada pela atividade das enzimas CAT, GST e APX que apresentaram maiores valores no tratamento com solo testemunha (Tabela 3). Em contrapartida, a atividade da SOD foi mais expressiva nos tratamentos 200 N, 300 N e 400 N (Tabela 3). Conforme Kandlbinder et al. (2004), a catalase é um sensível indicador da deficiência de nutrientes, enquanto a atividade da SOD é induzida, em plantas, pela presença de metais pesados (Zhang et al. 2007).

As ATPases possuem um importante papel na geração do gradiente de prótons na membrana plasmática, essencial para a ativação do transporte da maioria dos íons e metabólitos, atuando também na prevenção à

entrada de metais na célula (Morsomme e Boutry, 2000; Astolfi et al., 2005). Diferenças significativas na atividade da ATPase total e da H⁺-ATPase foram detectadas a partir de 60 dias de tratamento, onde observou-se maiores valores nos tratamentos com adição de lodo de esgoto higienizado (Tabela 3). A disponibilidade nutricional afeta diretamente as ATPases, onde nutrientes como nitrato, ferro e fósforo estão correlacionados com o aumento na atividade dessas enzimas (Santi et al., 2003; Alvarez-Pizarro et al., 2011).

Tabela 3. Análise enzimática em folhas de *C. papaya* (n=3 para cada dosagem). Valores expressos em média \pm DP ($\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca).

	Biomarcadores					
	SOD	CAT	GST	APX	ATPase total	H+-ATPase
30 dias						
Solo testemunha	18,14 \pm 3,17 ^a	0,40 \pm 0,13 ^a	1,62 \pm 0,21 ^a	0,86 \pm 0,32 ^a	0,27 \pm 0,02 ^a	0,15 \pm 0,01 ^a
100 N	35,67 \pm 5,73 ^{ab}	0,35 \pm 0,06 ^a	2,71 \pm 0,57 ^a	2,20 \pm 1,36 ^c	0,25 \pm 0,02 ^a	0,13 \pm 0,02 ^a
200 N	26,22 \pm 2,87 ^a	0,49 \pm 0,11 ^a	6,25 \pm 0,96 ^c	2,03 \pm 0,30 ^c	0,26 \pm 0,03 ^a	0,13 \pm 0,04 ^a
300 N	20,80 \pm 2,98 ^a	0,57 \pm 0,26 ^a	4,56 \pm 0,27 ^b	1,04 \pm 0,45 ^{ab}	0,33 \pm 0,03 ^b	0,20 \pm 0,04 ^a
400 N	46,15 \pm 24,84 ^b	0,59 \pm 0,44 ^a	6,69 \pm 1,44 ^c	1,95 \pm 0,36 ^{b,c}	0,27 \pm 0,03 ^a	0,22 \pm 0,015 ^a
60 dias						
Solo testemunha	22,57 \pm 13,62 ^a	0,87 \pm 0,39 ^a	1,99 \pm 0,45 ^a	3,40 \pm 1,40 ^c	0,20 \pm 0,02 ^a	0,10 \pm 0,02 ^a
100 N	10,48 \pm 4,81 ^a	0,73 \pm 0,42 ^a	2,08 \pm 0,56 ^{ab}	2,25 \pm 0,45 ^b	0,47 \pm 0,05 ^c	0,35 \pm 0,03 ^c
200 N	23,54 \pm 6,59 ^a	1,12 \pm 0,32 ^{ab}	3,16 \pm 0,91 ^{b,c}	1,66 \pm 0,51 ^{ab}	0,34 \pm 0,11 ^b	0,23 \pm 0,08 ^b
300 N	19,60 \pm 12,20 ^a	1,85 \pm 0,26 ^b	3,39 \pm 0,70 ^c	1,56 \pm 0,39 ^{ab}	0,36 \pm 0,03 ^b	0,25 \pm 0,02 ^b
400 N	15,03 \pm 4,09 ^a	0,99 \pm 0,76 ^a	1,82 \pm 0,51 ^a	1,18 \pm 0,32 ^a	0,49 \pm 0,07 ^c	0,33 \pm 0,02 ^c
90 dias						
Solo testemunha	4,83 \pm 1,88 ^a	28,29 \pm 0,89 ^c	35,17 \pm 10,95 ^b	13,43 \pm 3,41 ^b	0,63 \pm 0,23 ^a	0,57 \pm 0,18 ^a
100 N	2,61 \pm 2,25 ^a	0,25 \pm 0,06 ^a	6,96 \pm 2,64 ^a	4,05 \pm 2,55 ^a	0,68 \pm 0,17 ^a	0,51 \pm 0,07 ^a
200 N	20,31 \pm 5,74 ^b	14,39 \pm 5,48 ^b	0,60 \pm 0,10 ^a	2,10 \pm 0,46 ^a	1,30 \pm 0,37 ^c	0,62 \pm 0,22 ^a
300 N	15,64 \pm 5,23 ^b	3,91 \pm 0,97 ^a	2,88 \pm 1,63 ^a	2,77 \pm 0,64 ^a	1,06 \pm 0,13 ^{b,c}	0,56 \pm 0,15 ^a
400 N	16,44 \pm 7,51 ^b	2,35 \pm 1,27 ^a	3,97 \pm 0,66 ^a	2,31 \pm 1,01 ^a	0,94 \pm 0,17 ^{ab}	0,52 \pm 0,15 ^a

Letras iguais na mesma coluna (dentro do mesmo período de exposição) não diferem significativamente (Tukey; P < 0,05).

3.3 Análise em *A. cepa*

É difundido que a aplicação agrícola do lodo de esgoto higienizado com cal virgem resulta em diversos benefícios nutricionais às plantas (Lima et al., 2011). Por outro lado, estudos relatam que a aplicação do lodo de esgoto influencia no comprimento das raízes de espécies normatizadas (Papadimitriou et al., 2008). O índice mitótico reflete diretamente os níveis de proliferação celular, consistindo em um importante parâmetro para avaliar a taxa de crescimento radicular das plantas, estando, conseqüentemente, correlacionado com o comprimento de raiz no teste de *A. cepa* (Seth et al., 2008). Neste estudo, os resultados obtidos na medição do comprimento de raiz (Tabela 4 e Figura 1) corroboram os valores encontrados para o índice mitótico (Tabela 4 e Figura 1), onde o tratamento somente com a amostra de lodo de esgoto higienizado levou à inibição do desenvolvimento radicular de *A. cepa*. Alterações no índice de divisão celular podem ser um importante indicativo no monitoramento dos níveis de poluentes no ambiente, detectando a presença de compostos potencialmente citotóxicos (Hoshina e Marin-Morales, 2009).

Os resultados de genotoxicidade, obtidos pelo índice de aberrações cromossômicas, revelaram que apenas o tratamento 400 N promoveu alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* (Tabela 4 e Figuras 2 e 3). Aberrações cromossômicas (perdas cromossômicas, pontes, C-metáfases, aderências, entre outras) são caracterizadas por mudanças tanto na estrutura quanto no número total de cromossomos, podendo ocorrer de forma espontânea ou como resultado de exposição a agentes físicos ou químicos (Leme e Marin-Morales, 2009). Dentre as aberrações cromossômicas existentes, nesse estudo foram observadas a predominância da formação de pontes, consequência geralmente relacionada à presença de metais pesados em compostos (Matsumoto et al., 2006, Bianchi et al., 2011). A formação de pontes cromossômicas pode resultar em eventos de quebra, formação de fragmentos acêntricos e posterior fixação do dano na forma de micronúcleo (Leme e Marin-Morales, 2008).

Na avaliação da frequência de micronúcleo, foi observado efeito mutagênico no tratamento 400 N, em ambas células meristemáticas (Tabela 4 e Figuras 2 e 3) e F1 (células não-meristemáticas) (Tabela 4 e Figuras 2 e 3). O micronúcleo tem sido considerado o biomarcador mais eficaz e simples para a análise de efeitos mutagênicos promovidos por químicos, sendo resultado de fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal, durante o ciclo de divisão celular, devido à ação de agentes clastogênicos ou danificadores do fuso – aneugênicos (Leme e Marin-Morales, 2009). A presença de micronúcleo em células F1 ocorre por meio de danos não reparados ou reparados de forma incompleta a partir das células parentais, como a ocorrência de pontes cromossômicas na avaliação de células meristemáticas (Leme e Marin-Morales, 2008; Fernandes et al., 2007).

Tabela 4. Avaliação genética de dosagens de lodo de esgoto tratado em *A. cepa* (n=5). Valores expressos em média \pm DP. CN: controle positivo, CP: controle positivo.

	CN	CP	Lodo	Solo testemunha	100 N	200 N	300 N	400 N
Raízes								
Comprimento	3,00 \pm 0,48 ^b	2,76 \pm 0,99 ^b	0,86 \pm 0,76 ^a	3,66 \pm 1,25 ^b	2,59 \pm 0,52 ^b	3,18 \pm 0,92 ^b	2,34 \pm 0,58 ^{a,b}	2,64 \pm 0,76 ^b
Células Meristemáticas								
Índice Mitótico	0,04 \pm 0,01 ^b	0,05 \pm 0,02 ^b	0,01 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,01 ^b	0,05 \pm 0,02 ^b	0,06 \pm 0,03 ^b	0,07 \pm 0,01 ^b	0,07 \pm 0,01 ^b
Índice de Genotoxicidade	0,01 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,01 ^b	0,02 \pm 0,01 ^a	0,03 \pm 0,01 ^{a,b}	0,02 \pm 0,01 ^{a,b}	0,03 \pm 0,01 ^{a,b}	0,03 \pm 0,01 ^{a,b}	0,05 \pm 0,03 ^b
Índice de Mutagenicidade	0,01 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,01 ^b	0,01 \pm 0,01 ^a	0,02 \pm 0,01 ^{a,b}	0,02 \pm 0,01 ^{a,b}	0,02 \pm 0,01 ^{a,b}	0,03 \pm 0,01 ^{a,b}	0,05 \pm 0,03 ^b
F1								
Índice de Mutagenicidade	0,003 \pm 0,003 ^a	0,02 \pm 0,003 ^b	0,001 \pm 0,001 ^a	0,01 \pm 0,002 ^a	0,005 \pm 0,004 ^a	0,010 \pm 0,004 ^a	0,004 \pm 0,001 ^a	0,020 \pm 0,003 ^b

Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente (Tukey; P <0,05).

Contaminantes apresentam forte correlação com danos genéticos, mesmo quando presentes em concentrações permitidas pelas legislações ambientais (Matsumoto et al., 2006). Considerando o potencial tóxico dos efluentes envolvidos no processo de formação do lodo de esgoto, a exposição de plantas ao resíduo deve ser criteriosamente monitorada, mesmo quando sua caracterização química apresenta valores dentro dos limites preconizados.

Valores de genotoxicidade e mutagenicidade não foram observados para o tratamento com lodo de esgoto higienizado. Altos índices de citotoxicidade resultam em baixos níveis de divisão e comprimento da raiz, influenciando os índices de alterações cromossômicas e de micronúcleo devido à alta frequência de morte celular, podendo levar a resultados falso-negativos de toxicidade (Fernandes et al., 2007). Por fim, os índices fornecidos pelo teste *A. cepa* devem ser avaliados de forma integrada, possibilitando uma análise consistente dos efeitos potencialmente tóxicos de amostras ambientais.

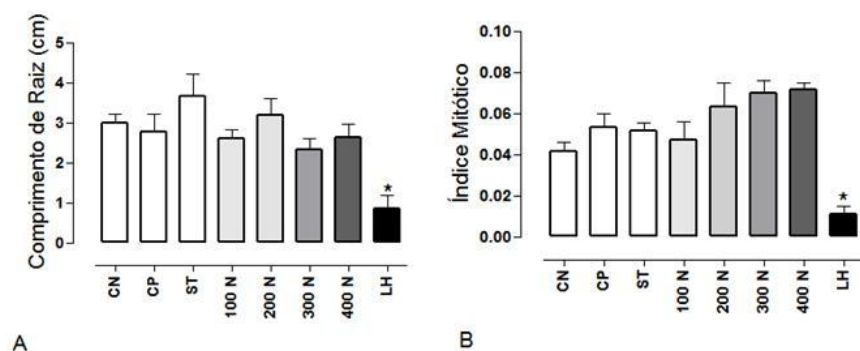


Figura 1: Avaliação citogenética em *A. cepa*. (A) Comprimento de raiz; (B) Índice Mitótico. ST: Solo Testemunha, LH: Lodo Higienizado.

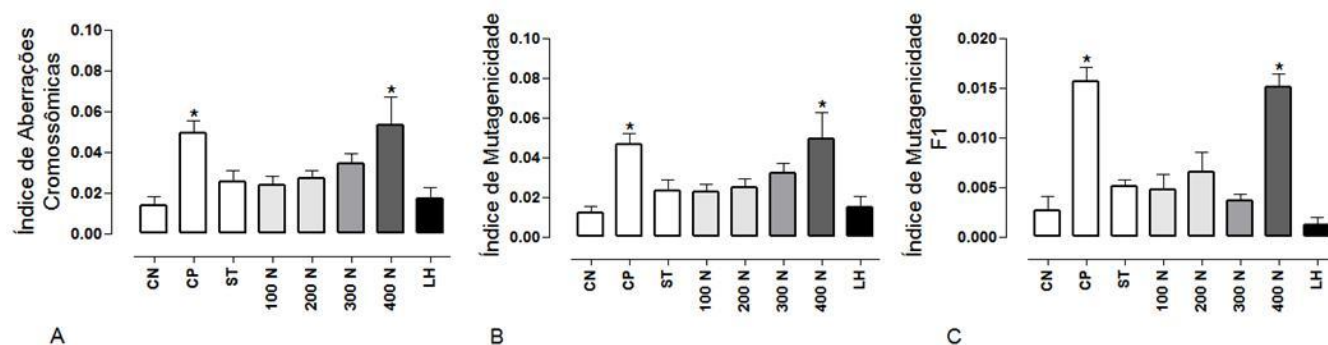


Figura 2: Avaliação citogenética em *A. cepa*. (A) Índice de Aberrações Cromossômicas; (B) Índice de Mutagenicidade em células meristemáticas; (C) Índice de Mutagenicidade em células F1. ST: Solo Testemunha, LH: Lodo Higienizado.

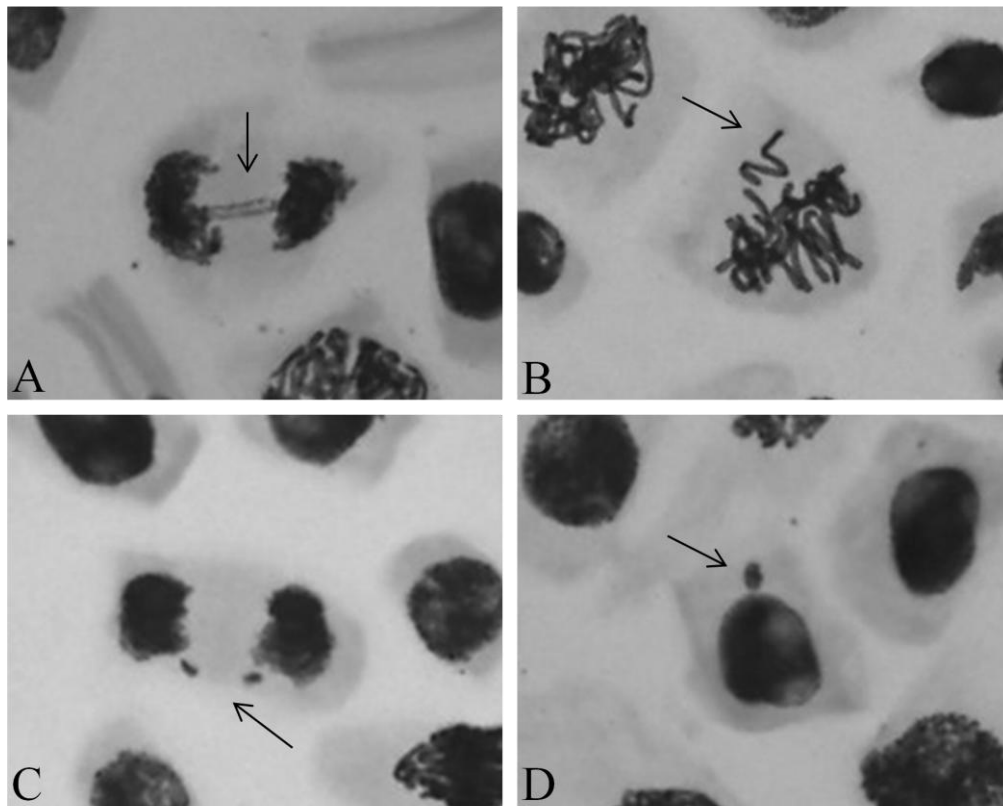


Figura 3: Danos observados em *A. cepa* (indicados pela seta). (A) Ponte cromossômica; (B) Perda cromossômica; (C) C-metáfase; (D) Micronúcleo.

4. Conclusões

A mistura de lodo de esgoto higienizado em solos agricultáveis representa uma alternativa de disposição final prática e benéfica, levando a melhorias na condição do solo e no crescimento e produtividade de plantas, principalmente devido ao seu elevado teor de nitrogênio. Os resultados observados a longo prazo indicaram a necessidade de uma compensação bioquímica frente ao estresse gerado pelo déficit nutricional nas plantas, corroborando os potenciais benéficos da utilização deste resíduo como insumo. Porém, considerando a presença de contaminantes no lodo de esgoto higienizado, foram observadas alterações citogenéticas e enzimáticas nas maiores concentrações, indicando que a adição de uma quantidade excessiva do resíduo pode levar a um maior custo energético para a planta como resposta à adaptação a condições de estresse e possível geração de danos. Dessa forma, fica evidenciada a necessidade de ponderar custos e benefícios para o organismo, visando a escolha de uma dosagem ideal para aplicação. Devido à complexidade do resíduo, a correlação entre análises químicas, genéticas e enzimáticas foi uma importante ferramenta na avaliação dos efeitos da aplicação do lodo de esgoto higienizado em *C. papaya*.

5. Referências bibliográficas

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 2004. NBR – 10006 – Procedimento para obtenção de substrato solubilizado de resíduos sólidos. ABNT, Rio de Janeiro, 21p.

Agrawal, S.B., Rathore, D., 2007. Changes in oxidative stress defense system in wheat (*Triticum aestivum* L.) and mung bean (*Vigna radiata* L.) cultivars grown with and without mineral nutrients and irradiated by supplemental ultraviolet-B. *Environ. Exp. Bot.* 59, 21–33.

Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53, 1331–1341.

Alvarez-Pizarro, J.C., Gomeas-Filho, E., Prisco, J.T., Grossi-de-Sá, M.F., Oliveira-Neto, O.B., 2011. NH₄⁺-stimulated low-K⁺ uptake is associated with the induction of H⁺ extrusion by the plasma membrane H⁺-ATPase in sorghum roots under K⁺ deficiency. *J. Plant Physiol.* 168, 1617– 1626.

Atli, G.L.Z., Alptekin, O., Tükel, S., Canli, M., 2006. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicol. Pharmacol.* 143, 218-224.

Beutler, E., 1975. The preparation of red cells for assay. In: Beutler, E. (Ed.), *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. Grune & Stratton, New York, pp. 8-18.

Beyenbach, K.W., Wieczorek, H., 2006. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Exp. Biol.* 209, 577-89.

Bianchi, J., Espindola, E.L.G., Marin-Morales, M.A., 2011. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotox. Environ. Safe.* 74, 826–833.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brasil, 2006. Resolução CONAMA N° 375/2006, de 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. Brasília, Brasil.

Campostrini, E., Glenn, D.M., 2007. Ecophysiology of papaya: a review. *Braz. J. Plant Physiol.* 19, 413-424.

Carballeira, C., De Orte, M.R., Viana, I.G., Carballeira, A., 2012. Implementation of a minimal set of biological tests to assess the ecotoxic effects of effluents from land-based marine fish farms. *Ecotox. Environ. Safe.* 78, 148-161.

Carbonell, G., Pro, J., Gómez, N., Babín, M.M., Fernández, C., Alonso, E., Tarazona, J.V., 2009. Sewage sludge applied to agricultural soil: Ecotoxicological effects on representative soil organisms. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 1309-1319.

Cardoso, P.F., Gratao, P.L., Gomes-Junior, R.A., Medici, L.O., Azevedo, R.A., 2005. Response of *Crotalaria juncea* to nickel exposure. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 262–272.

CEC (Council of the European Communities), 1986. Council Directive 86/278/EEC, of 12 June 1986. On the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. *Official Journal* 181, pp. 6-18.

Costa, A.N., Costa, A.F.S., 2011. Manual de uso agrícola e disposição do lodo de esgoto para o Estado do Espírito Santo. Incaper, Vitória.

Costa, A.F.S., Costa, A.N., Caetano, L.C.S., Maia, F.G., 2011. Disposição do lodo de ETE no solo e seu efeito na produção agrícola. In: Costa, A.N., Costa, A.F.S. (Org.). Manual de uso agrícola e disposição do lodo de esgoto para o estado do Espírito Santo. Incaper, Vitória, pp. 37-43.

Dantas, J.L.L., 2000. Introdução. In: Trindade, A.V. (Org.). Mamão: Produção - Aspectos Técnicos. Embrapa, Brasília, 9 p.

Dietz, K.J., Tavakoli, N., Kluge, C., Mimura, T., Sharma, S.S., Harris, G.C., Chardonnens, A.N., Gollmack, D., 2001. Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *J. Exp. Bot.* 52, 1969-80.

Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 534, 65-75.

Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C., Marin-Morales, M.A., 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pest. Biochem. Physiol.* 88, 252–259.

Geiszinger, A., Bonnineau, C., Faggiano, L., Guasch, H., López-Doval, J.C., Proia, L., Ricart, M., Romání, A., Rotter, S., Muñoz, I., Schmitt-Jansen, M., Sabater, S., 2009. The relevance of the community approach linking chemical and biological analyses in pollution assessment. *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 28, 619–626.

Gibbs, A., Somero, G.N., 1989. Pressure adaptation of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of marine teleosts. *J. Experim. Biol.* 143, 475–492.

Gonzalez, R.J., Cooper, J., Head, D., 2005. Physiological responses to hyper-saline waters in sailfin mollies (*Poecilia latipinna*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 142, 397–403.

Grant, W.F., 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the US Environmental Agency Gene - Toxicology Program. *Mut. Res.* 99, 273- 291.

Grotto, D., Carneiro, M.F.H., Sauer, E., Garcia, S.C., Melo, W.J., Barbosa Jr, F., 2013. Evaluation of biochemical and redox parameters in rats fed with corn grown in soil amended with urban sewage sludge. *Ecotox. Environ. Safe.* 95, 188-194.

Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Met. Enzym.* 77, 398-405.

Hoshina, M.M., Marin-Morales, M.A., 2009. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 2090–2095.

Kandlbinder, A., Finkemeier, I., Wormuth, D., Hanitzsch, M., Dietz, K.J., 2004. The antioxidant status of photosynthesizing leaves under nutrient deficiency: redox regulation, gene expression and antioxidant activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 120, 63–73.

Kelessidis, A., Stasinakis, A.S., 2012. Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. *Waste Manag.* 32, 1186–1195.

Kültz, D., Somero, G.N., 1995. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. *J. Exp. Biol.* 198, 1883–1894.

Lakhdar, A., Iannelli, M.A., Debez, A., Massacci, A., Jedidi, N., Abdelly, C., 2010. Effect of municipal solid waste compost and sewage sludge use on wheat (*Triticum durum*): growth, heavy metal accumulation, and antioxidant activity. *J. Sci. Food Agric.* 90, 965–971.

Leme, D.M., Marin-Morales, M.A., 2008. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - a case study. *Mutat. Res.* 650, 80–86.

Leme, D.M., Marin-Morales, M.A., 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat. Res.* 682, 71–81.

Lima, M.F., Mattos, C.N., Vieira, P.L.C., Almeida, L.F., 2011. Geração de lodo de esgoto e seu potencial como fonte de matéria orgânica para a agricultura. In: Costa, A.N., Costa, A.F.S. (Org.), *Manual de uso agrícola e disposição do lodo de esgoto para o estado do Espírito Santo*. Incaper, Vitória, pp. 11-17.

Matsumoto, S.T., Mantovani, M.S., Malagutti, M.I.A., Dias, A.L., Fonseca, I.C., Marin-Morales, M.A., 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genet. Mol. Biol.* 29, 148–158.

McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.

Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Kumar, R., Seth, C.S., Gupta, D.K., 2006. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatin and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere* 65, 1027–1039.

- Monferrán, M.V., Pignata, M.L., Wunderlin, D.A., 2012. Enhanced phytoextraction of chromium by the aquatic macrophyte *Potamogeton pusillus* in presence of copper. *Environ. Pollut.* 161, 15-22.
- Morita, S., Kaminaka, H., Masumura, T., Tanaka, K., 1999. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress signaling. *Plant Cell Physiol.* 40, 417-422.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867-880.
- Papadimitriou, C.A., Haritou, I., Samaras, P., Zouboulis, A.I., 2008. Evaluation of leaching and ecotoxicological properties of sewage sludge-fly ash mixtures. *Environ. Res.* 106, 340-348.
- Passuello, A., Mari, M., Nadal, M., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., 2010. POP accumulation in the food chain: Integrated risk model for sewage sludge application in agricultural soils. *Environ. Int.* 36, 577-583.
- Sakuragui, M.M., Paulino, M.G., Pereira, C.D.S., Carvalho, C.S., Sadauskas-Henrique, H., Fernandes, M.M., 2013. Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. *Environ. Pollut.* 178, 41-51.
- Sales, C.R.G., Ribeiro, R.V., Silveira, J.A.G., Machado, E.C., Martins, M.O., Lagoa, A.M.M.A., 2013. Superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improve the recovery of photosynthesis in sugarcane plants subjected to water deficit and low substrate temperature. *Plant Physiol. Biochem.* 73, 326-336.
- Santi, S., Locci, G., Monte, R., Pinton, R., Varanini, Z., 2003. Induction of nitrate uptake in maize roots: Expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H⁺-ATPase isoforms. *J. Exp. Bot.* 54, 1851-1864.
- Seth, C.S., Misra, V., Chauhan, L.K.S., Singh, R.R., 2008. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 711-716.

Singh, B.N., Singh, B.R., Singh, R.L., Prakash, D., Singh, D.P., Sarma, B.K., Upadhyay, G., Singh, H.B., 2009. Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1161–1167.

Singh, S., Sinha, S., Saxena, R., Pandey, K., Bhatt, K., 2004. Translocation of metals and its effects in the tomato plants grown on various amendments of tannery waste: evidence for involvement of antioxidants. *Chemosphere* 57, 91–99.

Souza, L.S., Coelho, E.F., Oliveira, A.M.G., 2000. Calagem, Exigências Nutricionais e Adubação. In: Trindade, A.V. (Org.). *Mamão: Produção - Aspectos Técnicos*. Embrapa, Brasília, pp. 26-34.

USEPA (United States Environmental Protection), 1995. Process design manual: Land application of sewage sludge and domestic septage. EPA 625/R-95/001. Washington D. C.

Wang, C., Wang, Y., Kiefer, F., Yediler, A., Wang, Z., Kettrup, A., 2003. Ecotoxicological and chemical characterization of selected treatment process effluents of municipal sewage treatment plant. *Ecotox. Environ. Safe.* 56, 211-217.

White, C.C., Viernes, H., Krejsa, C.M., Botta, D., Kavabagg, D.T.J., 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. *Anal. Biochem.* 318, 175-180.

Yadav, S.K., Dhote, M., Kumar, P., Sharma, J., Chakrabarti, T., Juwarkar, A.A., 2010. Differential antioxidative enzyme responses of *Jatropha curcas* L. to chromium stress. *J. Hazard. Mat.* 180, 609–615.

Zhang, F.Q., Wang, Y.S., Lou, Z.P., Dong, J.D., 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). *Chemosphere* 67, 44–50.

7 CONCLUSÕES

Os teores nutricionais observados nas análises químicas corroboram o potencial de utilização do lodo de esgoto higienizado como condicionante de solo e fonte de nutrientes, bem como os baixos níveis dos contaminantes analisados fazem com que o resíduo esteja dentro dos padrões exigidos pela legislação. A alta atividade enzimática observada no tratamento sem adição do resíduo nos períodos de 60 e 90 dias confirmam que o déficit nutricional ocasionado pela falta de suplementação ao solo pode levar a um alto custo metabólico para as plantas. Adicionalmente, a adição de lodo de esgoto higienizado estimulou o desenvolvimento dos indivíduos, levando a obtenção de maiores valores de crescimento com o aumento da dosagem aplicada. Por outro lado, as análises dos efeitos citogenéticos e bioquímicos também complementam os resultados observados na avaliação de crescimento de *C. papaya* para a confirmação da dosagem ideal do resíduo a ser aplicada. Foram observados efeitos genotóxicos e mutagênicos e uma maior atividade enzimática na maior dosagem aplicada. Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo indicam que a adição de uma quantidade excessiva do resíduo pode exigir da planta respostas para adaptação às condições de estresse e levar a uma possível geração de danos, sendo essencial a ponderação dos custos e benefícios da aplicação do resíduo no cultivo de plantas.