
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOGENÉTICA DA TORTA DE FILTRO,
OBTIDO DO BENEFICIAMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR,
ANTES E APÓS PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO.**

LEONARDO RAMOS ANACLETO

**Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Campus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular).**

**Rio Claro/SP
Fevereiro de 2014**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOGENÉTICA DA TORTA DE FILTRO,
OBTIDO DO BENEFICIAMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR,
ANTES E APÓS PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO.**

LEONARDO RAMOS ANACLETO

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**Rio Claro/SP
Fevereiro de 2014**

604.6 Anacleto, Leonardo Ramos
A532a Avaliação ecotoxicogenética da torta de filtro, obtido do
beneficiamento da cana-de-açúcar, antes e após processo de
biodegradação / Leonardo Ramos Anacleto. - Rio Claro, 2014
114 f. : il., figs., gráfs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maria Aparecida Marin Morales

1. Resíduos. 2. Subproduto. 3. Eisenia andrei. 4. Allium
cepa. 5. Respirômetria. 6. Genética ecotoxicológica. I. Título.

Dedico este trabalho para minha família,
em especial para minha esposa Daiane
e meus filhos Vinícius e Rafael.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e disposição para estar todos os dias nesse empreitada.

Agradeço minha família, pelo suporte, pelo orgulho e pelo entendimento do prazer que tenho em fazer pesquisa e por mais que seja difícil o caminho sempre estão do meu lado me reerguendo e me fazendo seguir.

Agradeço em especial meus pais Roberto e Maria e a minha irmã Gabriela, por todas as alegrias que me fazem seguir em frente e por mais que por muitas vezes seja difícil entender meu trabalho sempre estão comigo.

Agradeço minha esposa Daiane que se dedica todos os dias para tornar os meus dias mais fáceis, que cada dia me ama e me incentiva mais e mais para fazer meu melhor. Sempre me auxiliando, tanto quando necessitava vir aos finais de semana quanto em casa. Muito obrigado por ser meu alicerce e meu porto seguro. Te amo!

Agradeço meus filhos Vinícius e Rafael, pelos sorrisos e abraços de todos os dias, peço desculpas por muitas vezes estar ausente e por inúmeras vezes ocupado, só busco o orgulho e a aprovação de vocês. Papai lhes ama demais.

Agradeço aos meus sogros, José e Roseli por cuidar de minha família quando estou ausente e o suporte dado a ela.

Agradeço a Profª. Dra. Maria. A. Marin-Morales, pela oportunidade de realizar meu sonho, pelas indicações, pelas broncas, por nos auxiliar em nossas dificuldades e por muitas vezes sacrificar de seu tempo para que possamos cumprir nossos prazos. Um exemplo a ser seguido como pesquisadora e como pessoa.

Agradeço a todos Mutagênicos, por todos os momentos juntos, pelas ajudas, pelas risadas e por tornarem o trabalho menos desgastante, em especial ao Matheus Mantuanelli Roberto e a Marcia Hoshina por me ajudarem nas correções e nos vários auxílios durante

o processo de confecção desta dissertação. A Maria Tereza pela ajuda nas análises de *A. cepa*.

Agradeço a nossa técnica Roberta Kleiner, pelo auxílio durante toda pesquisa.

Agradeço a Nádia pela força e pelas risadas, mostrando que sempre tem alguém com mais problemas que você.

Agradeço a minha amiga dos cafês da manhã Ana Matraca.

Agradeço ao Instituto de Biociências da UNESP por fornecer toda a infraestrutura necessária para este trabalho.

Agradeço à FAPESP pela bolsa de Mestrado concedida, Processo 2012/02812-0.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos Aparecido Pizzano que forneceu as minhocas utilizadas neste trabalho.

Agradeço a Profª. Dra. Dejanira de Angelis, seus ensinamentos foram imprescindíveis a realização deste trabalho em especial ao teste de respirometria.

Agradeço a todos os funcionários do laboratório de microbiologia por auxílio prestado durante todo trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos E. Levy, pelas análises dos microrganismos.

Muito Obrigado a todos que de alguma forma auxiliaram neste trabalho direta ou indiretamente, agradeço de coração.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.

(Simone de Beauvoir)

RESUMO

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de açúcar e etanol, o que vem necessitando, cada vez mais, de extensas áreas de cultivo de cana-de-açúcar. A alta produção da indústria sucroalcooleira gera uma grande quantidade de resíduos que acaba por alterar a qualidade do solo, da água e do ar. Esta atividade agrícola tem como poluentes, além dos agroquímicos usados na cultura e dos subprodutos da queima da cana-de-açúcar, resíduos gerados desde a colheita até o processo produtivo, tais como o *Bagaço de Cana-de-Açúcar* (BCA), a vinhaça e a *Torta de Filtro* (TF), sendo esta última derivada do processo de destilação/fermentação e da filtração, a vácuo, do lodo retido nos clarificadores. Tanto a vinhaça como a TF vem sendo utilizadas como agentes recuperadores dos solos das culturas de cana-de-açúcar. Porém, não existem ainda muitas informações sobre os efeitos deletério desses produtos à biota exposta, no momento da sua aplicação ou em longo prazo; os cuidados necessários para o armazenamento destes produtos; e a quantidade indicada para a aplicação na cultura. Assim, este estudo teve como objetivo analisar a biodegradabilidade da TF misturada com solo e BCA, por meio do teste de respirometria de Bartha, bem como avaliar os efeitos tóxicos deste resíduo e de suas misturas nos organismos testes *Eisenia andrei* (teste de toxicidade e de fuga) e *Allium cepa* (citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade). Os resultados demonstraram que tanto a TF pura como em altas concentrações tiveram potencial tóxico para *E.andrei* e potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico para *A.cepa*. Porém, estes efeitos foram atenuados, após seis meses de biodegradação, demonstrando que este processo pode ser uma interessante estratégia para detoxificar a TF e tornar este resíduo passível de ser usado como condicionante de solo agricultáveis.

Palavras Chaves: *Allium cepa*, *Eisenia andrei*, subproduto da cana-de-açúcar, respirometria de Bartha, genética toxicológica

ABSTRACT

Currently Brazil is the largest producer of sugar and ethanol, which comes necessitating increasingly large areas of cultivation of cane sugar. The high production of sugarcane industry generates a lot of waste that ends up changing the quality of soil, water and air. This agricultural activity has as pollutants, beyond the agrochemicals used in crop and by-products of the burning of cane sugar, waste generated from harvest to the production process, such as rape-Cane Sugar (BCA), the vinasse and filter cake (TF), the latter being derived from distillation / fermentation and filtration under vacuum, retained in the sludge clarifiers. Both vinasse as TF has been used as fertilizer agents of soil crop of cane sugar. However, there are still a lot of information about the deleterious effects of these products to exposed biota, at the time of application or long term; necessary for the storage of these products care, and the indicated amount for application in culture. Thus, this study aimed to examine the biodegradability of TF mixed with soil and BCA, through respirometry Bartha test and evaluate the toxic effects of this waste and mixtures in test organisms *Eisenia andrei* (toxicity test and leakage) and *Allium cepa* (cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity). The results showed that both pure TF as toxic in high concentrations have potential to *E.andrei* and cytotoxic, mutagenic and genotoxic potential to *A.cepa*. However, these effects were attenuated after six months of biodegradation demonstrating that this process can be an interesting strategy to detoxify TF and make this able to be used as a reconditioner in agricultural culture.

Key words: *Allium cepa*, *Eisenia andrei*, chromosomal aberrations, micronuclei, Acute test, avoidance test, respirometry.

Sumário

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 OBJETIVOS	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 Produção de cana-de-açúcar	14
3.2 Produção de Torta de Filtro (TF)	15
3.3 O uso do teste de respirometria, para a avaliação da biodegradação	17
3.4 O uso da espécie <i>E. andrei</i> como organismo teste	19
3.5 O uso da espécie <i>A. cepa</i> como organismo teste	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Material Biológico	23
4.2 Composto Avaliado	23
4.3 Processamento do composto para preparo dos ensaios	23
4.4 Ensaios de Biodegradação	25
4.5 Bioensaios com os organismos testes	28
4.6 Teste de determinação da Biodegradabilidade de solo, pelo método Respirométrico de Bartha e Pramer (1965).	25
4.6.1 Preparo das Amostras	26
4.6.2 Padronização do Ácido Clorídrico (HCl) 0,1N	26
4.6.3 Padronização do Hidróxido de Potássio (KOH) 0,4N	26
4.6.4 Titulação do Branco e das amostras	26
4.6.5 Cálculo da taxa de respiração:	27
4.7 Testes com o organismo teste <i>Eisenia andrei</i>	27
4.7.1 Teste de toxicidade aguda	27
4.7.2 Teste de fuga	28
4.8 Teste de Citotoxicidade (IM), genotoxicidade (AC) e mutagenicidade (MN), utilizando o organismo teste <i>Allium cepa</i> .	29
5 RESULTADOS	31
5.1 Artigo I	31
5.2 Artigo II	68
6 CONCLUSÕES GERAIS	102
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil se destaca mundialmente por ser um país com grande potencial agrícola. Dentre as culturas de maior importância no Brasil destaca-se a de cana-de-açúcar, cujo cultivo tem aumentado progressivamente, principalmente nos estados das Regiões Centro-Oeste e Sudeste, sendo o estado de São Paulo o maior produtor desta cultura, com 4.419,46 mil hectares plantados (CONAB,2013).

As atividades antrópicas geram, de maneira geral, impactos ambientais, devido aos danos causados pelos resíduos que são lançados, inadequadamente, no ambiente. Segundo Guarnieri e Januzzi (1992), o aumento da necessidade da produção de etanol e açúcar também tem levado a severos impactos no solo, no ar, bem como nas águas superficiais e subterrâneas.

Dentre os subprodutos do beneficiamento da cana-de-açúcar está a *Torta de Filtro* (TF) que, dependendo do tipo de processo de fabricação utilizado, chega a produzir cerca de 30 a 40 kg de TF por tonelada de cana processada. A TF apresenta uma composição química com altos teores de matéria orgânica, fósforo, nitrogênio e cálcio, possuindo também teores consideráveis de potássio, magnésio e micronutrientes. Essa sua característica química confere a este resíduo uma potencialidade de ser usado com fertilizante agrícola.

Solos destinados ao cultivo de cana-de-açúcar tem recebido incorporação de TF, com o objetivo de diminuir os custos de produção e de minimizar a utilização de adubos químicos comerciais. Este resíduo tem sido aplicado na entressafra da cana-de-açúcar, especificamente em pré-plantio, no sulco ou nas entrelinhas de toda a área cultivada (CORTEZ et al., 1992). Entretanto, existem poucos estudos sobre a quantidade, forma de aplicação, armazenagem e toxicidade deste composto.

Cardozo et al.(1988) afirmam que a aplicação da TF ou de associações de torta com bagaço de cana-de-açúcar leva a uma melhoria na disponibilidade de nutrientes e, conseqüentemente, a uma maior produtividade da área agrícola. Rodella et al. (1990) demonstraram que a TF, aplicada na área total de cultura de cana-de-açúcar, promove alterações nas propriedades químicas do solo, como um aumento do fósforo, cálcio, carbono orgânico, além de trocas catiônicas e a diminuição do alumínio móvel. O aumento dos compostos inorgânicos no solo, pela adição de TF, também foi confirmado por Ramalho e Sobrinho (2001), que relataram o aumento significativo de Cd, Co, Cr, Cu, Ni e Pb, tendo alguns como conhecidamente tóxicos.

Na literatura internacional, não há registros de pesquisas relacionadas à toxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade ou outro parâmetro ecotoxicológicos ao uso da TF. Como a

TF pode conter substâncias com potencial tóxico, há uma necessidade de desenvolvimento de bioensaios com organismos sensíveis, que sejam capazes de responder às potencialidades tóxicas dos compostos presentes neste resíduo e avaliar, assim, a ação destes sobre o material genético desses bioindicadores.

As análises químicas são importantes ferramentas de avaliação das condições ambientais, mas não fornecem, por si só, um diagnóstico sobre os impactos que os compostos descartados no ambiente podem promover nos ecossistemas. Segundo Zhou et al. (2008), o desenvolvimento de bioensaios pode conferir vantagens adicionais aos dados obtidos em análises químicas. Quando esses dois tipos de ensaios são associados, eles permitem avaliar, não só os contaminantes presentes no meio, mas os possíveis riscos que esses contaminantes podem desencadear sobre a saúde ambiental (KLOBUCAR et al., 2003; EGITO et al., 2007).

Segundo Siviero (1999), o ensaio de respirometria consiste na análise da quantidade de CO₂ produzida pela degradação biológica da matéria orgânica, o que permite relacionar, então, a geração de CO₂ com a biodegradação da matéria orgânica. Desta forma, os testes de biodegradação têm sido considerado uma alternativa simples e de baixo custo para avaliar também as taxas de biodegradação de contaminantes presentes no solo.

Os oligoquetas entram em contato com os poluentes do solo pelo seu deslocamento neste substrato (via indireta) ou quando ingerem partículas contaminadas, presentes neste solo (contato direto). Uma vez expostas, as minhocas podem sobreviver, se intoxicar, morrer, incorporar ou até bioacumular poluentes em seus tecidos (ANDRÉA, 2008). Por estas características, as minhocas são consideradas ótimas bioindicadores de contaminação do solo, destacando-se nesta função as espécies terrestres *Eisenia fetida* (Savigny) e *Eisenia andrei* (Bouché), ambas pertencentes à família Lumbricidae.

O teste de fuga ou de preferência permite avaliar, rapidamente, a potencialidade de um composto causar efeitos nocivos e/ou repulsão ao organismo testado. Silva e van Gestelb (2009) realizaram o teste de fuga com os oligoquetas *E. andrei* (espécie endêmica dos trópicos) e *Perionyx excavatus* (espécie de referência), para avaliar os efeitos do inseticida Clorpirifós. Os resultados mostraram que a espécie *E.andrei* foi mais sensível ao inseticida do que *P. excavatus*, portanto mais indicada para o teste.

Ensaios realizados com vegetais superiores são eficazes na avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de diversas substâncias químicas (RANK et al., 2002). Dentre estes vegetais, a espécie *Allium cepa* é rotineiramente utilizada para avaliar a poluição ambiental e os mecanismos de ação de compostos genotóxicos e/ou mutagênicos (LEME, DE ANGELIS e MARIN-MORALES, 2008; LEME e MARIN-MORALES, 2009; SOUZA et al., 2009; SRIVASTAVA e MISHRA, 2009; FERNANDES, MAZZEO e MARIN-MORALES, 2007; VENTURA-CAMARGO et al., 2011; BIANCHI, ESPINDOLA e MARIN-MORALES, 2011; HERRERO et al., 2012).

A espécie *A. cepa* é frequentemente utilizada como organismo-teste devido ao bom conhecimento de seu ciclo celular e de suas diferentes respostas a muitos agentes genotóxicos/mutagênicos (EVSEEVA et al., 2003). A determinação da frequência de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos (MN) em células meristemáticas de *A. cepa* consiste em um método fácil para se determinar os mecanismos de ação de diversos compostos genotóxicos e mutagênicos (LEME e MARIN-MORALES, 2009; MAZZEO, FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011), inclusive para se determinar o impacto provocado sobre ambientes aquáticos (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; LEME, ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008) e sobre o solo (SOUZA et al., 2009; 2013).

Frente a toda problemática que envolve a disposição de resíduos derivados de atividades sucroalcooleiras, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de biodegradação, o potencial tóxico (com os organismos testes *E. andrei* e *A. cepa*) e o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico (com o organismo teste *A. cepa*) de um de seus resíduos, a torta de filtro (TF), tanto em seu estado *in natura*, como associado a solo e/ou a bagaço de cana-de-açúcar (BCA).

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial de degradabilidade de um resíduo da indústria sucroalcooleira, a torta de filtro, e avaliar os efeitos tóxicos deste material, puro ou em associações com solo e bagaço de cana-de-açúcar, por meio de bioensaios com dois diferentes organismos testes, como segue:

- Avaliar o potencial de degradação da TF, pura e em associações com solo, por meio de ensaios de respirometria de Bartha e Pramer, antes e após processo de biodegradação por micro-organismos autóctones da TF e do solo;
- Avaliar os efeitos tóxicos da TF, pura e em associações com solo, antes e após processo de biodegradação por micro-organismos autóctones, por meio do teste de fuga (preferência) com *Eisenia andrei*;
- Avaliar os efeitos tóxicos da TF, pura e em associações com solo, antes e após processo de biodegradação por micro-organismos autóctones, por meio do teste de toxicidade aguda com *Eisenia andrei*;
- Avaliar os efeitos citotóxico da TF, pura e em associações com solo, antes e após processo de biodegradação por micro-organismos autóctones, por meio do ensaios do Índice Mitótico, realizado com o organismo teste *Allium cepa*;
- Avaliar os efeitos genotóxico da TF, pura e em associações com solo, antes e após processo de biodegradação por micro-organismos autóctones, por meio do ensaios de Alterações cromossômicas, realizado com o organismo teste *Allium cepa*;
- Avaliar os efeitos mutagênicos da TF, pura e em associações com solo, antes e após processo de biodegradação por micro-organismos autóctones, por meio do ensaios do de MN e Aberrações Cromossômicas realizado com o organismo teste *Allium cepa*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

As atividades humanas, dentre elas as industriais, urbanas e agrícolas, geram alterações ambientais, devido aos lançamentos de efluentes e resíduos químicos, que descaracterizam os ambientes naturais e promovem alterações nos sistemas biológicos.

Na agricultura brasileira, o agronegócio da cana-de-açúcar ocupa posição de destaque, quer seja pelas grandes áreas cultivadas e em constante crescimento, pela alta produção agrícola e pela importância econômica e social que esta cultura representa. No setor agrícola, sobretudo da cultura de cana-de-açúcar, a degradação ambiental acontece em decorrência do uso indiscriminado e abusivo de agroquímicos; da compactação do solo, devido ao uso intensivo de implementos agrícolas; da emissão de gases na atmosfera, devido à queima da palha da cana-de-açúcar antes da colheita; dos subprodutos derivados no processo de beneficiamento da cana-de-açúcar; e da disposição inadequada dos resíduos gerados no processo da produção sucroalcooleiros (EMBRAPA, 2013).

3.1 Produção de cana-de-açúcar

O agronegócio sucroalcooleiro movimenta no Brasil cerca de R\$ 36 bilhões por ano, com faturamentos diretos e indiretos, que correspondem a aproximadamente 3,5% do PIB (FRAVET, 2010). Além de fortalecer a economia nacional, este setor agrícola é o que mais emprega no país, gerando, cerca de, 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos, beneficiando, também, mais de 70 mil agricultores (ÚNICA, 2011).

A produção mundial de açúcar está concentrada em 10 países, que são responsáveis por 74% de toda a produção de açúcar no mundo. Atualmente, a cana-de-açúcar é cultivada em diversas regiões de clima tropical do planeta, totalizando 19,5 milhões de hectares; sendo 8,6 milhões na Ásia, 6,1 milhões na América do Sul, 2,9 milhões na América Central e do Norte, 1,4 milhões na África e 0,5 milhões na Oceania. Os maiores produtores de cana-de-açúcar, no mundo, são o Brasil, com uma área plantada de 5 milhões de hectares e a Índia, com 3,7 milhões de hectares (PINTO, 2002).

O cultivo desta gramínea, no Brasil, é feito, principalmente, no Centro-Sul, Sudeste e Norte-Nordeste, em dois períodos de safra distintos, o que representa uma grande vantagem competitiva para o país. A região norte-nordeste colhe sua safra no período de novembro a abril, enquanto que a região centro-sul/Sudeste realiza essa atividade de maio a outubro (NUNES JUNIOR et al., 1999). O Estado de maior produção de cana-de-açúcar é São Paulo, com 4.458,31 mil hectares plantados, seguido por Minas Gerais, com 750,15 mil hectares e Goiás,

com 673,38 mil hectares (CONAB, 2013). Ainda segundo o Conselho Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013), essas áreas continuam a aumentar, principalmente, nos estados das regiões Centro-Oeste e Sudeste. Essas regiões são as responsáveis pela maior produção do país, como pode ser visto na safra 2012/2013, onde das 559,215 mil toneladas de cana-de-açúcar processadas, as regiões Sudeste e Centro-Oeste contribuíram com 493,159 mil toneladas (CONAB, 2012).

As exportações de etanol em 2013 chegaram, a 2,1 bilhões de litros (12% da produção) e, as de açúcar, a 18,15 milhões de toneladas (quase 70% da produção). As vendas no mesmo ano, geraram receitas de US\$ 3,9 bilhões, no caso do açúcar, e de US\$ 765,53 milhões em álcool combustível, valores 100% maiores que os observados em 2005 (ÚNICA, 2011).

Em 2012, as exportações brasileiras de etanol atingiram um volume financeiro de 46,5 % maior em relação a 2011. As receitas chegaram a US\$ 2,18 bilhões. Em comparação ao ano anterior, houve aumento de 55,3% na quantidade exportada de etanol, mas queda de 5,7% no preço, segundo dados divulgados pelo Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC, 2013).

A expansão do mercado de açúcar e álcool leva o setor sucroalcooleiro a projetar um aumento na produção de cana-de-açúcar, que deverá atingir 600 milhões de toneladas na safra 2013/2014.

Por todo exposto acima, pode perceber que a cana-de-açúcar apresenta, em termos energéticos e econômicos, vantagens competitivas claras quando comparada com outras culturas (NUNES JUNIOR et al., 1999), por isso esse setor está em seu franco crescimento produtivo.

3.2 Produção de Torta de Filtro (TF)

Um dos subprodutos gerados, em quantidade, na produção de álcool e açúcar é a *Torta de Filtro* (TF). A composição deste resíduo depende do tipo do processo de fabricação utilizado, podendo chegar de 30 a 40 kg de TF por tonelada de cana processada.

A TF é obtida em uma etapa do processo de clarificação do caldo de cana-de-açúcar produzidos nas moendas, processo este usado para a purificação deste caldo. Neste processo, adiciona-se ao caldo aquecido uma suspensão de hidróxido de cálcio, que promove a elevação do pH e, como consequência, a floculação de colóides orgânicos, bem como a precipitação de sais de cálcio, sobretudo o do fosfato (NUNES JUNIOR, 2005).

A suspensão obtida neste processo é mantida em repouso, resultando em um caldo límpido e um precipitado formado por compostos orgânicos e inorgânicos insolúveis. Este

precipitado contém, ainda, uma grande quantidade de caldo clarificado, que é recuperado por um processo de filtração ou prensagem. Como o precipitado não tem consistência apropriada para ser trabalhado, ele é misturado ao bagaço da cana, finamente moído. Esta mistura é submetida à filtragem a vácuo, resultando em uma matéria com umidade em torno de 75- 80 %, que é denominada de torta de filtro (NUNES JUNIOR, 2005).

A TF tem altos teores de matéria orgânica, fósforo, nitrogênio e cálcio, além de potássio, magnésio e micronutrientes. Segundo Korndörfer (1997), a origem da TF, por usinas ou destilarias autônomas, é um fator diferencial para a definição da sua composição química. Os teores de micronutrientes também variam com a própria característica do solo da cultura: ferro (0,8 a 1,20 %), manganês (500 a 800 ppm), cobre (40 a 80 ppm) e zinco (150 a 220 ppm) (NUNES JUNIOR, 2005; NASCIMENTO, 2006; PIACENTE, 2005). Nardin (2007) afirma ainda que a composição da TF pode variar tanto em decorrência da variedade da cana como do tipo de solo, da maturação da cana, do processo de clarificação do caldo ou ainda de outros fatores.

A TF gerada por usinas têm aproximadamente o dobro de fósforo que as produzidas pelas destilarias (aproximadamente 2 % de P_2O_5 na torta de usina e 1 % na de destilaria, na base seca). Já com relação ao teor de nitrogênio, as tortas provenientes de destilarias têm 25 % a mais do que as tortas geradas pelas usinas (nas destilarias: média de 1,6 % de nitrogênio; nas usinas: média de 1,3 %, na base seca).

O fósforo existente na TF provém da adição de produtos auxiliares para a floculação das impurezas do caldo e sua liberação no solo ocorre, gradativamente, por mineralização e ataque de micro-organismos endêmicos. Assim, torna-se necessário considerar a relação C/N do resíduo, para se estimar a quantidade adequada de TF a ser aplicada no solo, cuidando para que as características químicas e físicas deste solo não sejam alteradas, negativamente, e que os nutrientes necessários para a adubação sejam fornecidos ao vegetal (NUNES JUNIOR, 2005).

A (TF) tem sido incorporada ao cultivo de cana-de-açúcar, visando uma diminuição da utilização de adubos químicos comerciais. Este resíduo tem sido aplicado na entressafra da cana-de-açúcar, especificamente em pré-plantio, no sulco ou nas entrelinhas de toda a área cultivada (CORTEZ et al., 1992). Entretanto, existem poucos estudos sobre a quantidade, forma de aplicação, armazenagem e toxicidade deste composto.

A TF, segundo Cardozo et al.(1988), melhora a mobilidade e disponibilidade dos nutrientes do solo e, conseqüentemente, melhora a produtividade da área agrícola. Rodella et al. (1990) verificaram que a torta de filtro, quando aplicada em cultura de cana-de-açúcar, aumenta, no solo, a quantidade do fósforo, cálcio, carbono orgânico, além proporcionar trocas

catiônicas e a diminuição do alumínio móvel. Porém, Ramalho e Sobrinho (2001) observaram que a TF aumentou, significativamente os índices dos metais Cd, Co, Cr, Cu, Ni e Pb do solo onde foi aplicado.

Embora existam alguns estudos que avaliam a qualidade do solo, após a aplicação da TF, pouco foi investigado sobre a sua toxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade ou outro parâmetro ecotoxicológicos relacionados ao uso deste resíduo na agricultura. Como os potenciais genotóxico e mutagênico de poluentes ambientais podem estar relacionados com processos de carcinogênese, teratogênese e a uma série de outros distúrbios, e a TF conter substâncias com potencial tóxico, torna-se necessário que este produto seja melhor avaliado, quanto a sua toxicidade, antes da sua disposição no ambiente.

3.3 Importância do uso de bioensaios

As análises químicas são importantes ferramentas de avaliação das condições ambientais, mas não fornecem, por si só, um diagnóstico completo sobre os impactos que os compostos descartados no ambiente podem promover nos ecossistemas, pois não levam em consideração a variedade de efeitos que os poluentes possam induzir, direta ou indiretamente, na biota associada. O desenvolvimento de bioensaios é uma estratégia vantajosa (ZHOU et al., 2008) e de avaliação mais real sobre os efeitos que a contaminação ambiental pode ocasionar nos organismos vivos. Quando os dados de ensaios biológicos são associados às avaliações químicas e físico-químicas, é possível chegar a um melhor diagnóstico sobre os possíveis riscos dos contaminantes sobre a saúde ambiental (KLOBUCAR et al., 2003; EGITO et al., 2007). Os bioensaios devem ser desenvolvidos com organismos sensíveis, que sejam capazes de responder às potencialidades tóxicas dos compostos presentes no meio e avaliar, assim, a ação deles sobre o material genético.

3.3.1 O uso do teste de respirometria, para a avaliação da biodegradação

Para que alguns resíduos sólidos possam ser descartados no ambiente, é necessário que estes passem, primeiro, por um período de biodegradação. A biodegradação pode ser avaliada pelos CO₂ produzido nas atividade microbiana, durante o processo de respiração. Este parâmetro (respiração) é considerado um bom indicador de atividade biológica, constituindo-se, assim, em uma ferramenta importante para ser usada para este fim. Segundo Siviero (1999), o ensaio de respirometria consiste na análise da quantidade de CO₂ produzida pela degradação biológica da matéria orgânica, o que permite relacionar a geração de CO₂ com a biodegradação dessa matéria orgânica. Desta forma, os testes de biodegradação, que têm sido considerado uma

alternativa simples e de baixo custo (CETESB, 1990), são indicados para avaliar também as taxas de biodegradação de contaminantes presentes no solo.

Para avaliar a degradação de resíduos em solo, podem ser usadas várias técnicas como: respirômetro de Bartha (BARTHA E PRAMER, 1968); técnica colorimétrica baseada no indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) (HANSON et al. 1993); respirometria manométrica (KARHU et al., 2009). Pelo ensaio de respirometria, pode-se estimar a velocidade e o tempo necessário para que a degradação se complete, sendo uma importante ferramenta para se determinar as taxas e a frequência de aplicação do resíduo no solo (SIVIERO et al, 1998).

O método respirométrico provê dados adequados para testar diferentes opções no tratamento biológico como o efeito de diferentes fatores sobre a biodegradação. O teste pode ser usado, também, para confirmar a degradação de compostos, antes de ser utilizado em um processo de biorremediação em grande escala (BALBA et al., 1998).

As tecnologia de biodegradação começaram a ser implementadas nas décadas de 1980 e 1990 e suas aplicações têm crescido, rapidamente, em todo o mundo. A biorremediação tornou-se um dos métodos mais comumente usados nos tratamentos de descontaminação de solos e águas, por ter custos reduzidos, em relação a outros métodos, como a escavação de solos e disposição destes em aterros, e bombeamento da água contaminada com consequente tratamento da mesma. A biorremediação também é mais segura e menos prejudicial do que os métodos convencionais de tratamentos de descontaminação (STEMPVOORT E BIGGAR, 2007).

Baseado na premissa de que todo composto orgânico potencialmente biodegradável apresenta uma possibilidade de ser descartados no solo e na água, muitos trabalhos de biodegradação começaram a ser implementados, na tentativa de reduzir os impactos causados por contaminantes orgânicos, derivados de diversas atividades antrópicas.

Coneglian et al. (2006) avaliaram as taxas de biodegradação de solo de “landfarming”, derivado de uma refinaria de petróleo do estado de São Paulo, para estimar se este solo possuía uma biota endêmica, que pudesse biodegradar os seus vários compostos. Os autores verificaram que quando adicionaram borra oleosa ao solo, houve uma maior eficiência de degradação, do que quando utilizaram lodo biológico. Porém, a aplicação combinada da borra oleosa e lodo biológico, misturados na proporção de 1:1, propiciou uma melhora na eficiência da biodegradação, em relação ao lodo biológico, mas ainda foi menor do que a degradação obtida somente com a borra oleosa. Os resultados demonstraram que solo do “landfarming” apresentou uma microbiota autóctone, que possui a capacidade de degradar vários compostos presentes nos resíduos de refinaria de petróleo. O estudo também mostrou que a eficiência da biodegradação

estava relacionada com a proporção de aplicação dos resíduos no solo, pois a quantidade de resíduo constitui um fator limitante para a qualidade do solo.

Lopes e Bidoia (2009) avaliaram, pelo método respirométrico de Bartha e Pramer, a biodegradação, em meio líquido, de óleos lubrificantes automotivos. Os resultados deste estudo revelaram que óleos usados possuem uma maior potencialidade de biodegradação que óleos novos, fenômeno explicado pela alteração que os lubrificantes sofrem, quando submetidos às altas pressões e às temperaturas dos motores (BALBA, 1998).

Kaakinen et al. (2007), estudaram a biodegradação de óleo de canola em solos de florestas. Quando o solo foi estudado in natura (sem adição de nutrientes), a biodegradabilidade foi muito baixa. Com o ajuste do pH para 8,0, a biodegradação aumentou ligeiramente (7,4 %). Porém, com a adição de nutrientes, após 30 dias de contínuo processo de biodegradação, já houve um significativo aumento desta biodegradabilidade (43,2 %). Quando foi realizada a adição combinada de nutrientes com pH ajustado, houve um aumento da biodegradação para 75,8 %, nos 30 dias do processo. Os autores concluíram que o ajuste do pH e a adição de minerais em solo otimiza o processo de biodegradação, e que os ensaios de respirometria manométrica se mostraram indicados para a avaliação dos índices respirométricos do solo estudado.

Camargo et al. (2009) utilizaram o teste de biodegradação, por respirometria de Bartha e Pramer (1965), para analisar a degradação da vinhaça. Os autores simularam a percolação deste composto, para avaliar qual profundidade do solo possuía a melhor taxa de biodegradabilidade. Os resultados mostraram que a melhor taxa ocorreu aos 30 cm de profundidade, conclusão está baseada na presença de altas taxas de matéria orgânica derivada da vinhaça nas outras profundidades avaliadas.

3.3.2 O uso da espécie *E. andrei* como organismo teste

Os invertebrados pertencentes à classe Oligochaeta somam cerca de 3.100 espécies, incluindo espécies de ambientes terrestres e de água doce (RUPPERT & BARNES, 1996). Dentro deste grupo, as mais importantes, quanto ao número de espécies, são as representantes de ambientes terrestres. Estes invertebrados estão entre os organismos terrestres mais abundantes e mais diversificados, que podem ser encontrado em tipos variados de solo e em todo o globo terrestre (HAMELINK et al., 1994; GUPTA; CHAKRAVORTY; KAVIRAJ, 2011).

Segundo Bispo et al. (2009), os oligoquetas são responsáveis diretos pela qualidade do solo, pois auxiliam na aeração; promovem aumento da capacidade de campo e melhorarem a

qualidade do solo, devido a decomposição da matéria orgânica e ciclagem do carbono, nitrogênio, fósforo presentes no solo; além de evitar problemas com erosão.

Os oligoquetas terrestres também são muito reconhecidos por sua alta sensibilidade aos poluentes ambientais, pois entram em contato com os poluentes do solo tanto durante o seu deslocamento (via indireta) como quando ingerem partículas contaminadas deste solo (contato direto). Uma vez expostas, as minhocas podem sobreviver, se intoxicar, morrer, incorporar ou até bioacumular poluentes em seus tecidos (LANNO et al., 2004; ANDRÉA, 2008). Outra importante característica é o papel ecológico que esses organismos ocupam na cadeia alimentar, já que são presas de inúmeros vertebrados e constituem uma via de dispersão de contaminantes para os níveis tróficos superiores (LANGDON et al., 2003; CHEN et al., 2011). Por estas características, as minhocas são consideradas ótimas bioindicadores de contaminação do solo, destacando-se nesta função as espécies terrestres *Eisenia fetida* (Savigny) e *Eisenia andrei* (Bouché), ambas pertencentes à família Lumbricidae. De acordo com Domínguez (2004) e Belmeskine et al. (2012), essas duas espécies são as mais comumente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos, principalmente porque têm distribuição mundial, por estarem onipresentes nos ambientes, por terem ciclos de vida curtos, por possuírem tolerância a um vasto intervalo de temperatura e umidade e por serem de fácil manipulação e manutenção. Este organismo teste tem sido amplamente utilizado em ensaios de fuga ou preferência (NATAL DA LUZ; RIBEIRO; SOUSA, 2004; MOREIRA, SOUSA, CANHOTO, 2008; NATAL DA LUZ; RÖMBLE; SOUSA, 2008; NATAL-DA-LUZ et al., 2008), de reprodução (MOREIRA, SOUSA, CANHOTO, 2008; CHELINHO et al., 2009; GRUMIAUX et al., 2010) de toxicidade aguda (LACHANCE et al., 2004; GRUMIAUX et al., 2010; BELMESKINE et al., 2012), e para a avaliação de efeitos celulares e moleculares (PIOLA et al. 2013), entre outros.

O teste de fuga ou de preferência é eficiente para avaliar compostos que possam causar algum tipo de efeitos nocivos e/ou causar repelência do organismo teste ao composto testado.

Owojori e Reinecke (2009) testaram, pelo teste de preferência e de reprodução, duas espécies de minhocas (*Aporrectode. caliginosa* e *E.fetida*), para avaliar qual delas seria a mais indicada para ser usada como indicadora de toxicidade de solos salinos, tanto artificiais quanto naturais. Os autores encontraram que a espécie *E. fetida* apresentou a melhor resposta de sensibilidade, independentemente do tipo de solo avaliado. Os valores observados para *E. fetida* nos testes de preferência, foram essenciais para o estabelecimento da sensibilidade da espécie e também para a continuidade dos estudos realizados com o teste de reprodução. Estes resultados sugerem a relevância do uso do teste de preferência como um método de triagem adequado para indicar as primeiras tendências da ação de contaminantes sobre os organismos

expostos. Já De Silva e van Gestelb (2009) utilizaram outros dois tipos de oligoquetas (*E. andrei*, uma espécie de referência e *P. excavatus*, uma espécie tropical), para a realização do teste de preferência. Os resultados obtidos por esses autores mostraram uma maior sensibilidade para *E. andrei*, quando as minhocas foram expostas ao inseticida Clorpirifós. O EC₅₀ (Concentração Efetiva que induz uma resposta em 50% dos organismos experimentados) obtido pela espécie *E. andrei* foi até três vezes menor que o observado para a espécie *P. excavatus*. Esses resultados também mostram que os testes de preferência devem ser utilizados como ferramenta de prevenção para a avaliação dos riscos de pesticidas. Os Endpoints obtidos pelos testes de preferência mostram, neste estudo, ser menos sensível do que os de reprodução e mais sensível do que os de toxicidade, demonstrando ser eficientes para uma triagem inicial para avaliação de risco ambiental.

Arnaud et.al. (2000) demonstraram, em testes comparativos de solos artificiais e solos naturais, que os solos naturais mostram ter uma representatividade melhor e uma sensibilidade maior, quando comparados aos testes realizados com solo artificial.

3.3.3 O uso da espécie *A. cepa* como organismo teste

Vegetais superiores se caracterizam como um importante material biológico para a avaliação de danos genéticos induzidos por contaminantes ambientais e vem sendo considerados como excelentes bioindicadores de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de ambientes contaminados com substâncias químicas (GRANT, 1994; YI e MENG, 2003). Testes realizados com esse grupo de organismos se caracterizam por serem baratos, de fácil reprodução e apresentarem uma alta sensibilidade a agentes químicos (GRANT, 1994), além de serem ótimos bioindicadores para avaliação de contaminantes presentes no solo (WHITE e CLAXTON, 2004).

Dentre os vegetais superiores, a espécie *A. cepa* se destaca como um importante organismo teste, por apresentar características, como, crescimento rápido de suas raízes, grande número de células em divisão, alta tolerância a diferentes condições de cultivo, cromossomos em número reduzido (2n=16) e de grande tamanho, ter disponibilidade de obtenção durante o ano todo e poder ser testado diretamente no material a ser investigado (RANK e NIELSEN, 1998; MATSUMOTO et al., 2006).

Estudos realizados por Grant (1978; 1982) indicam uma correlação de 75 % a 90 % entre *A. cepa* e sistemas-teste de mamíferos. Segundo Rank e Nielsen (1998), os testes realizados com *A. cepa* apresentaram uma sensibilidade superior a 82 %, quando comparados com testes realizados com bactérias *S. typhimurium*, *Escherichia coli* (Microscreen) e com

roedores. Para Grover et al. (1990), existe uma relação superior a 90 % entre os resultados obtidos com o teste de aberrações cromossômicas e MN realizados com este sistema-teste vegetal e os testes com mamífero, utilizando diferentes concentrações de pesticidas. Quando comparada a outros vegetais superiores como a *Vicia faba* ou *Trandescantia*, a espécie *A. cepa* apresenta uma sensibilidade ainda mais apurada (MA et al., 1995; COTELLE et al., 1999; MIGID et al., 2007).

A espécie *A. cepa* é frequentemente utilizada como organismo-teste, devido ao conhecimento sobre seu ciclo celular e suas diferentes respostas a muitos agentes genotóxicos/mutagênicos conhecidos (EVSEEVA et al., 2003). A determinação da frequência de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos (MN), durante a mitose de células meristemáticas de *A. cepa*, consiste em um método fácil para se determinar os mecanismos de ação de diversos compostos genotóxicos e mutagênicos (LEME e MARIN-MORALES, 2009; MAZZEO, FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011), e determinar os impactos que os ambientes aquáticos e terrestres sofrem com a poluição ambiental (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME, ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; SOUZA et al., 2009; SOUZA et al., 2013).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

Para a realização dos bioensaios, foram utilizados ensaios de toxicidade aguda e de fuga (ou de preferência) no qual utilizou-se do organismo terrestre *Eisenia andrei* (minhoca) e, para os ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, a espécie *Allium cepa*.

4.2 Composto Avaliado

O composto avaliado neste trabalho foi um resíduo da indústria sucroalcooleira, denominado de *Torta de Filtro* (TF), obtido junto à uma empresa sucroalcooleira situada na cidade de General Salgado, região de São José do Rio Preto/SP – Brasil, juntamente com o *Bagaço de Cana-de-Açúcar* (BCA).

4.3 Processamento do composto para preparo dos ensaios

A TF, obtida junto a empresa sucroalcooleira, foi processada no laboratório de Mutagênese Ambiental, do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro. Primeiramente o composto foi peneirado em uma mesa agitadora, com peneira de granulometria de 2 mm, conforme exige a Norma ABNT NBR NM ISO 3310-1:2010. Após este processo, foi avaliada a capacidade de campo da mistura TF/solo, pesando 500g de solo e mais 500g de TF. Os materiais foram secos em estufa a 105 ± 2 °C por 24 horas. As amostras foram então resfriadas em dessecador e pesadas novamente, para ser calculada a quantidade de água presente nas amostras. Após esse procedimento, a amostra foi colocada em um funil de vidro, contendo fibra de vidro, onde foi adicionada água até a saturação do solo. Em seguida, o solo foi deixado para descansar, por mais 24 horas, e as amostras foram novamente pesadas para ser calculada a capacidade de campo, pela diferença entre o peso seco obtido e a absorção total de água na amostra.

Para o preparo do solo, foi necessário estimar, primeiramente, o peso seco do solo a ser utilizado nos ensaios. Para isso, foram pesados 10 g do substrato, antes e após a secagem em estufa com temperatura aproximada de 105 °C. O cálculo do peso seco do substrato, foi realizado conforme ABNT NBR ISO 17616:2010 sendo utilizada a fórmula:

Equação 1 - Cálculo da umidade inicial do solo controle e das associações de TF

$$\text{Umidade Inicial (\%)} = \frac{(\text{Peso úmido} - \text{Peso seco})}{\text{Peso Seco}} \times 100$$

Para o cálculo da capacidade de retenção de água, foram pesados 250 g de TF, que foram dispostos em um funil coberto com papel de filtro. Em seguida, foram adicionados 500 mL de água destilada sobre este funil e sobre um outro funil recoberto apenas com papel de filtro, isto é, sem amostra. Após 12 horas de drenagem da água pelos funis, foram avaliados os volumes finais de água drenada para ambos os funis. Pela diferença de volume entre eles, foi calculada a quantidade de água que ficou retida no substrato. O mesmo foi realizado para o solo controle.

Para que as amostras pudessem ser preparadas e avaliadas, quanto a sua biodegradação, houve a necessidade de se ajustar a umidade da TF (que estava em torno de 27 %) e do solo controle (que estava em torno de 18 %). Para o cálculo da umidade final foi feita a média da umidade da TF e do solo, para que o valor da umidade final fosse corrigido para 65 %, com a adição de água, conforme a norma ABNT NBR 15537 (2007), apresentada na tabela 1.

Tabela 1 -Ajuste do teor de umidade das várias concentrações utilizadas no teste

Método Baseado na ABNT NBR 15537 (2007)	
Massa úmida substrato1 (g)	750
Teor de umidade (%)	65
Volume água calculado (mL)	150
Massa seca do substrato (g)	600
Consistência final	Pastosa

Obs. 1 - Massa úmida recomenda pela ABNT 15537 (2007).

Fonte: Adaptado de ABNT NBR 15537 (2007).

Após o cálculo para correção da umidade, foi determinado o volume de 150 mL de água e 600 g de massa total do substrato seco, totalizando 750 g de massa úmida final.

O pH do substrato, que variou de 6,0 a 7,5, foi medido em uma mistura de substrato e água destilada (na proporção de 1:5, respectivamente), previamente homogeneizada por agitação de 12 horas, seguida de repouso de mais 12 horas.

O solo usado como controle foi coletado no jardim experimental do IB/Unesp – Campus de Rio Claro, por ser considerado isento de contaminantes (MAZZEO, 2013).

Foram preparadas 13 diferentes associações entre TF, solo e Bagaço de Cana-de-Açúcar (BCA), conforme descrito na tabela 2

Tabela 2 - Proporção de TF/solo/BCA, para o preparo das diferentes concentrações

Concentração em TF	TF (kg)	Solo (kg)	BCA (kg)	Massa total (kg)
0%	0	8	0	8
5%	0,4	7,6	0	8
10%	0,8	7,2	0	8
25%	2	6	0	8
50%	4	4	0	8
75%	6	2	0	8
100%	8	0	0	8
0%	0	7,6	0,4	8
5%	0,4	7,2	0,4	8
10%	0,8	6,8	0,4	8
25%	2	5,6	0,4	8
50%	4	3,6	0,4	8
75%	6	1,6	0,4	8

TF= Torta de Filtro; BCA=Bagaço de cana-de-açúcar

4.4 Ensaios de Biodegradação

Os ensaios de biodegradabilidade foram realizados pelo método de Bartha e Pramer (1965), com amostras de TF, pura e em associações com solo e BCA (tabela 2), extraídas das misturas obtidas no tempo zero (T0), ou seja, no tempo inicial da montagem do experimento.

4.5 Teste de determinação da Biodegradabilidade de solo, pelo método Respirométrico de Bartha e Pramer (1965).

O teste de biodegradabilidade de solo foi desenvolvido de acordo com a norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 14283 (1999), cujos passos estão descritos abaixo.

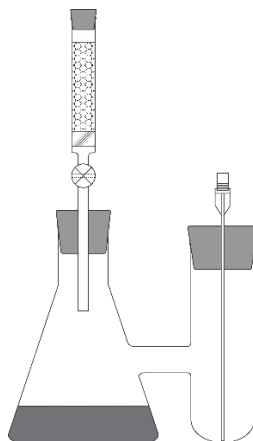


Figura 1 - Representação Esquemática do Respirômetro de Bartha e Pramer.

Fonte: Arquivo pessoal

4.5.1 Preparo das Amostras

Foram pesados 50 g de cada uma das 13 associação (TF/solo/BCA- Tabela 2) a serem testada e transferidos, individualmente, para os Respirômetro de Bartha (Figura 1).

4.5.2 Padronização do Ácido Clorídrico (HCl) 0,1N

Para a padronização do ácido clorídrico, foram transferidos 20 mL de solução padrão de carbonato de sódio 0,1 N para um Erlenmeyer de 125 mL, onde foram adicionadas duas gotas do indicador metil-orange. Após este procedimento, a solução foi titulada com solução de HCl 0,1 N, até ocorrer sua neutralização, que se deu quando houve a mudança na coloração da solução de amarelo para laranja. O volume de HCl usado na titulação foi anotado em uma planilha e utilizado nos cálculos da produção de CO_2 .

4.5.3 Padronização do Hidróxido de Potássio (KOH) 0,4N

Uma alíquota de 10 mL da solução de KOH 0,4 N foi transferida para um Erlenmeyer de 125 mL, onde foram adicionados 20 mL de água destilada isenta de CO_2 , com 3 gotas de fenolftaleína e mais 1 mL de BaCl_2 . O composto foi então titulado com uma solução de HCl 0,1 N, até a coloração mudar de rosa para incolor. O volume de HCl usado na titulação foi anotado em uma planilha e utilizado nos cálculos da produção de CO_2 .

4.5.4 Titulação do Branco e das amostras

Para a titulação do branco, uma alíquota de 10 mL de solução de KOH 0,4 N foi transferida para um Erlenmeyer de 125 mL, onde foram adicionados mais 20 mL de água isenta

de CO₂. Para a titulação das amostras, foi retirado o KOH presente no braço do respirômetro, sendo este braço lavado duas vezes com 10 mL de água isenta de CO₂. Após este processo, foram adicionados 1,0 mL de solução BaCl₂ e três gotas do indicador fenolftaleína. A titulação foi realizada com solução de HCl 0,1 N, onde o volume de HCl usado foi anotado na planilha de respirometria para posterior cálculo de respiração do respirômetro.

4.5.5 Cálculo da taxa de respiração:

4.5.5.1 Para o teste controle:

Equação 2 - Cálculo da produção de CO₂ nos respirômetros controles:

$$Tx \text{ de resp. Controle} = \left[(Média \text{ do Branco} - Média \text{ das Réplicas}) \times \left(\frac{Qtd \text{ de HCl dia}}{Qtd \text{ de KOH anterior}} \right) \right] \times 50 \times 0,044$$

4.5.5.2 Para o testes com as amostra:

Equação 3 - Cálculo da produção de CO₂ nos respirômetros contendo as associações de torta de filtro, solo e bagaço.

$$Tx \text{ de resp. das amostras} = \{ [(Média \text{ do Branco} - Média \text{ das Amostras}) \times \left(\frac{Qtd \text{ de HCl dia}}{Qtd \text{ de KOH gasto}} \right)] \times 50 \times 0,044 \} - \text{Controle}$$

O fator de correção usado para transformar µmol em mg de CO₂, para 50,0 g de solo foi de 0,044.

4.6 Testes com o organismo teste *Eisenia andrei*

Os testes com *E. andrei* foram realizados segundo a norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 15537 (2007) e L.6.401 (1990) da CETESB, sempre em quadruplicata.

4.6.1 Teste de toxicidade aguda

Para os ensaios de toxicidade aguda, foram utilizadas minhocas adultas e cliteladas com idade superior a dois meses e com peso individual entre 300 e 600 mg. Após seleção, os espécimes foram aclimatados em solo artificial, por 24 horas, antes de serem utilizados nos ensaios.

Após a adição de 750 g do substrato (1 tipo de substrato por pote) em potes de polipropileno de 2 litros, foram colocados, sobre o substrato, dez organismos-testes. Os potes foram dispostos em local climatizados com temperatura de 18 e 22 °C e com iluminação contínua. No 7º e 14º dias de experimento, os organismos foram pesados e as mortalidades dos indivíduos registradas. A temperatura e a umidade relativa do ambiente foram monitoradas, diariamente, e os resultados expressos em concentração letal inicial mediana (CL50; 14 dias), calculados pelo método estatístico Trimmed Spearman-Kärber, para estimar a concentração média letal (HAMILTON et al., 1977).

4.7 Bioensaios com os organismos testes

Os ensaios de toxicidade aguda e de fuga (ou de preferência) foram realizados com o organismo-teste *E. andrei*, expostos às mesmas associações descritas na Tabela 2, para os tempos T0 (inicial), T1 (3 meses) e T2 (6 meses).

4.7.1 Teste de fuga

O teste de fuga foi realizado de acordo com a norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR ISO 17512-1 (2011). Para o desenvolvimento dos testes, foram utilizados dois tipos de substratos: solo controle e amostras das associações de TF/solo/BCA. Inicialmente foram dispostos, em um recipiente de 2 L, 200 g do solo controle em um dos lados do recipiente e 200 g de cada amostra (uma por frasco) do outro lado deste mesmo recipiente. As amostras foram inicialmente separadas por uma divisória, para que as elas não se misturassem. Depois da disposição das amostras nos recipientes, as divisórias foram retiradas e aí expostos, nos centros do recipiente (distribuição homogenia), 10 espécimes de minhocas por concentração testada. Os ensaios foram feitos em quintuplicatas. Os organismos ficaram expostos por 48 horas, nas mesmas associações citadas na Tabela 2. Após este período, foi realizada a leitura dos resultados. O controle positivo foi realizado com uma substância referência para este teste (ácido bórico, na concentração de 750 mg H₂BO₃ por quilograma de solo seco).

Para a validação do teste, o número de indivíduos mortos e/ou perdidos não pôde ultrapassar 10 % do total de organismos expostos aos tratamento. O cálculo e a apresentação dos resultados foram feitos com base nas porcentagens dos efeitos observados em cada

concentração, comparando o número de indivíduos vivos presentes nas concentrações testadas com indivíduos vivos presentes nos controles negativos e positivos, conforme a fórmula abaixo:

Equação 4 - Equação para o cálculo de porcentagem de fuga (AMORIM et al. (2005))

$$A = \left(\frac{C-T}{N} \right) \times 100$$

Onde:

- A = Efeito observado (%);
- C = Número de indivíduos presentes no solo controle;
- T = Número de indivíduos presente no substrato testado;
- N = Número total de indivíduos em cada tratamento (geralmente dez por tratamento).

Os resultados foram submetidos a análise de variância, pelo programa Graphpad 5, expressos em CL₅₀. Os resultados com morte inferior a 20 % dos indivíduos foram considerados não tóxicos.

4.8 Teste de Citotoxicidade (IM), genotoxicidade (AC) e mutagenicidade (MN), utilizando o organismo teste *Allium cepa*.

Para os ensaios de Índice Mitótico (IM), de Aberrações Cromossômicas (AC) e de Micronúcleos (MN), em células meristemáticas de raiz de cebola, foi utilizado o protocolo descrito por Grant (1982), com algumas modificações.

Sementes de *Allium cepa* foram colocadas para germinar em placas de Petri forradas com papel filtro, contendo as associações de TF, solo e BCA, e contendo o solubilizado destas associações, em três tempos (T0 = momento da mistura; T1 = 3 meses após o início do experimento; T2 = 6 meses após o início do experimento). Para o controle negativo, foi utilizado água Mili-Q. Os controles positivos foram realizados com uma solução aquosa de metilmetano sulfonato (MMS) (4×10^{-4}), para comparações de clastogenicidade, e com Trifluralina (0,84 mg/L), para comparações de aneugenicidade.

Após germinação, quando as radículas atingiram o tamanho de 1,5 centímetros, parte delas foi coletada e fixada em Carnoy 3:1 (três partes de etanol para um de ácido acético – v: v). A outra parte foi lavada e transferida para outras placas de Petri contendo somente água ultra-pura, por um período de 48 horas, para se estimar a potencialidade de recuperação do

organismo exposto, quando as condições retornam à normalidade. Após essas 48 horas, as raízes também foram coletadas, fixadas em Carnoy 3:1 e ambas as coletas mantidas em geladeira, até a confecção das lâminas.

Após as raízes serem retiradas do fixador, elas foram lavadas em água destilada, por três vezes, e submetidas à hidrólise ácida em HCl 1 N a 60 °C, por 8 minutos e, novamente, lavadas em água destilada (3 banhos). Após essa etapa, as raízes foram ligeiramente secas em papel filtro e transferidas para frascos escuros contendo reativo de Schiff por, aproximadamente, 2 horas. Realizada a reação, as raízes passaram novamente por três banhos em água destilada, até a total retirada do excesso de corante. Para a confecção das lâminas, os meristemas foram recobertos com lamínula e suavemente esmagados em uma gota de carmim acético (2 %). As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas, permanentemente, com resina sintética.

Para a análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, foram confeccionadas dez lâminas para cada amostra e examinadas, no mínimo, 500 células de cada lâmina feita, totalizando 5000 células por tratamento.

Os índices mitóticos (IM), os Índices Interfásicos (II) e Índices de Morte Celular (IMC) foram obtidos de acordo com as fórmulas a seguir:

$$\text{I.M.} = (\text{N}^\circ \text{ de Células em Divisão}) / (\text{N}^\circ \text{ Total de Células Observada}) \times 100$$

$$\text{I.I.} = (\text{N}^\circ \text{ de Células Em Interfase}) / (\text{N}^\circ \text{ de Células Observadas}) \times 100$$

$$\text{I.M.C.} = (\text{N}^\circ \text{ de Células em Morte Celular}) / (\text{N}^\circ \text{ de Células Observadas}) \times 100$$

Para a análise dos efeitos genotóxicos e mutagênicos, foram considerados os diferentes tipos de AC (perdas, quebras, aderências cromossômicas, pontes, atrasos, etc.) e a presença de MN em células meristemáticas de *Allium cepa*, em diferentes fases da divisão mitótica. Foi considerado como endpoint de genotoxicidade as alterações do tipo perdas, aderências, pontes, atrasos cromossômicos e outras. A mutagenicidade foi registrada a partir das observações de alterações do tipo quebras cromossômica e presença de MN.

Após a obtenção dos resultados de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, foi realizada a análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em forma de artigos.

5.1 Artigo I

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E BIODEGRADABILIDADE DA TORTA DE FILTRO DERIVADA DO BENEFICIAMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR.

Leonardo Ramos Anacleto¹, Marcia Miyuki Hoshina¹ e Maria A. Marin-Morales¹

1 Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Avenida 24 A, 1515, CP 199, 13506-900 Rio Claro, SP, Brasil.

RESUMO

O Brasil sempre se destacou como um dos maiores produtores mundiais de álcool e açúcar. Na última década, o país ocupou o primeiro lugar tanto em produção como em área plantada com cana-de-açúcar. A elevada produção das indústrias sucroalcooleiras acarreta na geração também elevada de resíduos derivados do processo de produção de açúcar e de etanol. Alguns resíduos da indústria sucroalcooleira tornam-se subprodutos reutilizáveis no próprio cultivo da cana-de-açúcar, como é o caso do bagaço de cana-de-açúcar (BCA), da vinhaça e da torta de filtro (TF). A TF é um subproduto derivado do processo de clarificação do caldo de cana-de-açúcar, usado na produção do açúcar e do etanol. Este subproduto possui altos índices de micronutrientes que, devido a esta característica, tem sido utilizado como adubo natural, em substituição aos fertilizantes agrícolas artificiais. Porém, na literatura não há informações sobre os efeitos deste composto sobre a biota endêmica dos ambientes agrícolas. Considerando que a minhoca é um organismo de grande importância para o solo, principalmente para a ciclagem de seus nutrientes e que a TF tem um controverso potencial tóxico para o solo, este trabalho avaliou a potencialidade tóxica de TF para o organismo teste *Eisenia andrei*, em testes de toxicidade aguda e de fuga, além de também avaliar o potencial de biodegradabilidade deste composto, por meio do teste proposto por Bartha e Pramer. Os resultados do teste de biodegradação, demonstraram que a TF tem uma rápida degradação, comprovada pela alta produção de CO₂ obtida em 112 dias de incubação, tanto na ausência quanto na presença de BCA, quando comparada com a degradação do solo controle. Já para o teste de toxicidade aguda, foi verificada uma alta toxicidade para as amostras com concentrações de 50, 75 e 100 % de TF, sem incorporação de BCA e para a concentração de 75 % de TF + BCA, comprovando que a adição do bagaço auxiliou na diminuição da toxicidade da TF presente no início da biodegradação. Com o passar do tempo de biodegradação, foi observado um decréscimo paulatino no potencial tóxico da TF, chegando no final do processo com uma ausência de toxicidade.

Palavras-chave: Teste de respirometria, resíduo de cana-de-açúcar, resíduos industriais, toxicidade aguda, teste de fuga, *Eisenia andrei*.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca mundialmente por ser um país com grande potencial agrícola. Dentre as culturas de maior destaque em nosso país estão as lavouras de cana-de-açúcar, cujo cultivo tem apresentado um aumento progressivo, principalmente nos estados das regiões Centro-Oeste e Sudeste. A safra brasileira estimada para 2013/2014, de 600 milhões de toneladas de cana-de-açúcar processadas, corresponde a 3,7 % a mais que a safra de 2012/2013. O estado de maior produção de cana-de-açúcar é o de São Paulo, com 4.419,46 mil hectares plantados (CONAB, 2013). O Brasil movimenta, através do crescimento do negócio sucroalcooleiro, cerca de R\$ 36 bilhões por ano, que corresponde a cerca de 3,5 % do PIB nacional (FRAVET et al., 2010).

O aumento da área de plantio da cana-de-açúcar tem levado, segundo Guarnieri e Januzzi (1992), a severos impactos ambientais tanto no solo como nas águas superficiais e subterrâneas. A degradação destes ambientes acontece em decorrência do uso indiscriminado e abusivo de agrotóxicos; da compactação do solo, devido ao uso intensivo de implementos agrícola; da emissão de gases na atmosfera, devido à queima da palha da cana-de-açúcar antes da colheita; dos subprodutos gerados no processo de beneficiamento da cana-de-açúcar; e da disposição inadequada dos resíduos do processo da produção sucroalcooleira, dentre eles os resíduos vegetais deixados no campo após a colheita; bagaço (BCA); água de lavagem; vinhaça e torta de filtro (TF) (RASUL et al. 1999; PARTHA et. al, 2006; NUNES JUNIOR, 2013 EMBRAPA, 2011.).

A TF é um dos subprodutos mais produzidos pelas indústrias sucroalcooleiras, chegando de 30 a 40 kg de torta de filtro por tonelada de cana-de-açúcar processada. Como o composto é rico em nutrientes, ele tem sido aplicado nos sulcos ou nas entrelinhas da cultura de cana-de-açúcar, em substituição aos fertilizantes químicos (CARDOZO, 1988; CORTEZ et al., 1992; NARDIN, 2007).

A respiração da comunidade microbiana de um dado ambiente é utilizada como indicador de atividade biológica, sendo importante na avaliação do potencial de biodegradação de compostos orgânicos do meio. Segundo Siviero (1999), o ensaio de respirometria consiste na análise da quantidade de CO₂ produzida pela degradação biológica da matéria orgânica, o que permite relacionar a produção de CO₂ com a biodegradação da matéria orgânica. Desta forma, os testes de biodegradação têm se caracterizado em uma alternativa eficiente, de baixo custo e simples para avaliar as taxas de biodegradação de contaminantes presentes no solo.

A avaliação da potencialidade de biodegradação de compostos orgânicos presentes no solo é uma importante ferramenta para se avaliar se estes compostos são passíveis de serem descartados no solo. Coneglian et al. (2006) avaliaram as taxas de biodegradação de solo de

“landfarming”, derivado de uma refinaria de petróleo do estado de São Paulo, para estimar se este solo possuía uma biota autóctone que pudesse biodegradar os seus vários compostos. Nesta avaliação, os autores adicionaram borra oleosa e lodo biológico ao solo, na tentativa de incrementar a biodegradação dos componentes tóxicos do landfarming. Os resultados indicaram que houve uma maior eficiência de degradação quando houve o acréscimo de borra oleosa, seguida da adição da associação borra e lodo biológico (proporção de 1:1) e, por último, da adição somente do lodo biológico. Esses resultados demonstraram que solo do “landfarming” apresenta uma microbiota autóctone capaz de degradar os vários compostos presentes nos resíduos de refinaria de petróleo, mas que, para uma melhor eficiência da biodegradação, é necessário estabelecer, previamente, a quantidade de resíduo que deve ser aplicado ao solo, pois este constitui em um fator limitante para a qualidade do solo receptor.

Kaakinen et al. (2007) estudaram a biodegradação de óleo de canola em solos de florestas. Os autores observaram que, quando o solo foi testado *in natura* (sem adição de nutrientes), a biodegradabilidade foi muito baixa. O ajuste do pH para 8,0 aumentou ligeiramente a biodegradação (7,4 %) e a adição de nutrientes já promoveu um aumento significativo nesta biodegradabilidade (43,2 %). Porém, a maior degradação deste solo foi observada quando se combinou o ajuste do pH (8,0) com a adição de nutrientes, cujos índices de respiração mostraram uma biodegradação da ordem de 75,8 %. Os autores concluíram, então, que o ajuste do pH e a adição de minerais em solo otimizam o processo de biodegradação, e que o uso da respirometria é eficiente para medir os índices respirométricos de solo.

Camargo et al. (2009) utilizaram do teste de biodegradação por respirômetros de Bartha e Pramer (1965), para analisar a degradação da vinhaça em diferentes profundidades do solo. Os autores observaram que a melhor taxa de biodegradação ocorreu a 30 cm de profundidade, por essa amostra ter os menores índices de matéria orgânica, quando comparada com as outras amostras testadas.

Os solos são sistemas extremamente complexos e dinâmicos, influenciados por uma série de diferentes fatores abióticos e biológicos que determinam os efeitos de substâncias potencialmente tóxicas inseridas neste substrato. As minhocas são organismos terrestres de grande importância ecológica. Estes invertebrados, pertencentes à classe Oligochaeta, são representadas por cerca de 3.100 espécies, incluindo espécies de ambientes terrestres e de água doce (RUPPERT & BARNES, 1996). Dentro deste grupo, as mais importantes, quanto ao número de espécies, são as representantes de ambientes terrestres.

Os oligoquetas entram em contato com os poluentes do solo tanto durante o seu deslocamento pelo solo (via indireta) como quando ingerem partículas contaminadas (contato

direto). Uma vez expostas, as minhocas podem sobreviver, se intoxicar, morrer, incorporar ou até bioacumular poluentes em seus tecidos (ANDRÉA, 2008). Por estas características, as minhocas se destacam como ótimos bioindicadores de contaminação do solo, destacando-se nesta função as espécies terrestres *Eisenia fetida* (Savigny) e *Eisenia andrei* (Bouché), ambas pertencentes à família Lumbricidae. De acordo com Domínguez (2004), essas duas espécies são as mais comumente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos, principalmente porque são de distribuição mundial, onipresentes nos ambientes, têm ciclos de vida curtos, possuem tolerância a um vasto intervalo de temperatura e umidade e são de fácil manipulação e manutenção.

O teste de fuga ou preferência confere uma resposta rápida para avaliar compostos que possam causar efeitos nocivos e/ou repelência aos organismos teste, frente a exposição a um dado composto. Udovic e Lestan (2010) demonstraram que, para o teste de preferência, utilizando *E. fetida*, não houve fuga significativa dos espécimes aos solos contaminados, por lixiviação, com chumbo, zinco e cádmio, disponibilizados no solo.

De Silva e van Gestel (2009) utilizaram, no teste de preferência, outros dois tipos de oligoquetas, *E. Andrei* (uma espécie tropical) e *P. Excavatus* (espécie referência), para avaliar os efeitos do inseticida Clorpirifós em solo artificial. Os resultados sugerem uma maior sensibilidade da espécie *E. andrei*, pois o EC_{50} obtido pela esta espécie foi até três vezes menor, quando comparado com o da espécie *P. excavatus*. Os autores sugerem que o teste de preferência também deve ser utilizado como ferramenta para a avaliação dos riscos ambientais de pesticidas. Os *endpoints* gerados, neste estudo, pelo teste de preferência, indicaram que este teste é menos sensível do que o de reprodução e mais sensível do que o de toxicidade, indicando ser eficiente para uma triagem inicial da avaliação de risco ambiental.

Arnoud et. al. (2000) demonstraram, por meio de testes comparativos realizados com minhocas expostas a solos artificiais e a solos naturais, que os solos naturais têm melhor representatividade e conferem maior sensibilidade aos organismos do que os solos artificiais.

Frente a toda problemática que envolve a disposição de resíduos derivados de atividades sucroalcooleiras, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de biodegradação de um de seus resíduos, a torta de filtro, tanto em seu estado *in natura*, como em associação com solo e/ou bagaço de cana-de-açúcar, bem como avaliar o potencial tóxico destas associações, através do teste de fuga ou preferência e do teste de toxicidade aguda, por meio de ensaios desenvolvidos com os organismos-testes *Eisenia andrei*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Biológico

Para a realização dos ensaios de toxicidade aguda e de fuga, foi utilizado, como organismo teste, o oligoqueta terrestre *Eisenia andrei* (minhoca).

2.2 Composto Avaliado

O composto avaliado foi um resíduo da indústria sucroalcooleira, denominado de torta de filtro (TF). Este composto e o bagaço de cana-de-açúcar (BCA) foram obtidos junto à uma empresa sucroalcooleira situada na cidade de General Salgado, região de São José do Rio Preto/SP – Brasil. Esses dois resíduos da indústria são utilizados como adubo para mudas nativas.

2.3 Processamento do composto para preparo dos ensaios

A TF foi peneirada em uma mesa agitadora, com peneira de granulometria de 2 mm, conforme exige a Norma ABNT NBR NM ISO 3310-1:2010.

Para o preparo do solo, foi necessário estimar, primeiramente, o seu peso seco. Para isso, foram pesados 10 g do substrato, antes e após a secagem em estufa com temperatura aproximada de 105°C. O cálculo do peso seco do substrato foi realizado conforme ABNT (2007), sendo utilizada a fórmula:

Equação 1 - Cálculo da umidade inicial do solo controle e das associações de TF

$$\text{Umidade Inicial (\%)} = \frac{(\text{Peso úmido} - \text{Peso seco})}{\text{Peso Seco}} \times 100$$

Para o cálculo da capacidade de retenção de água, foram pesados 250 g de TF, que foram dispostos em um funil coberto com papel de filtro. Em seguida, foram adicionados 500 mL de água destilada sobre este funil e sobre um outro funil recoberto somente com papel de filtro, isto é, sem amostra. Após 12 horas de drenagem da água pelos funis, foram avaliados os volumes finais de água drenada para ambos os funis. Pela diferença de volume entre eles, foi calculada a quantidade de água que ficou retida no substrato. O mesmo foi realizado para o solo controle.

Para que as amostras pudessem ser preparadas e avaliadas, quanto a sua biodegradação, houve a necessidade de ajustar a umidade da TF (que estava em torno de 27%) e do solo controle (que estava em torno de 18%). Para o cálculo da umidade final foi feita a média da umidade da TF e do solo, para que o valor da umidade final fosse corrigido para 65%, com a adição de água, conforme a norma NBR 15537 (2007), apresentada na tabela 1.

Tabela 1 - Ajuste do teor de umidade das várias concentrações utilizadas no teste

Método Baseado na NBR 15537 (2007)	
Massa úmida substrato1 (g)	750
Teor de umidade (%)	65
Volume água calculado (mL)	150
Massa seca do substrato (g)	600
Consistência final	Pastosa

Obs. 1 - Massa úmida recomenda pela ABNT (2007).

Fonte: Adaptado de ABNT NBR 15537 (2007).

Após o cálculo para correção da umidade, foi determinado o volume de 150 mL de água e 600 g de massa total do substrato seco, totalizando 750 g de massa úmida final.

O pH do substrato, que variou de 6,0 a 7,5, foi medido em uma mistura de substrato e água destilada (na proporção de 1:5, respectivamente), previamente homogeneizada por agitação de 12 horas, seguida de repouso de mais 12 horas.

O solo usado como controle foi coletado no jardim experimental do IB/Unesp – Campus de Rio Claro, por ser considerado isento de contaminantes (MAZZEO, 2013).

Foram preparadas 13 diferentes associações entre TF, solo e BCA, conforme descrito na tabela 2

Tabela 2 - Proporção de TF/solo/BCA, para o preparo das diferentes concentrações

Concentração em TF	TF (Kg)	Solo (Kg)	BCA (Kg)	Massa total (Kg)
0%	0	8	0	8
5%	0,4	7,6	0	8
10%	0,8	7,2	0	8
25%	2	6	0	8
50%	4	4	0	8
75%	6	2	0	8
100%	8	0	0	8
0%	0	7,6	0,4	8
5%	0,4	7,2	0,4	8
10%	0,8	6,8	0,4	8
25%	2	5,6	0,4	8
50%	4	3,6	0,4	8
75%	6	1,6	0,4	8

TF= Torta de Filtro; BCA=Bagaço de cana-de-açúcar

2.4 Bioensaios

Os ensaios de biodegradabilidade foram realizados pelo método de Bartha e Pramer (1965), com as amostras extraídas das misturas obtidas no tempo zero (T0), ou seja, no tempo inicial da montagem do experimento.

Os ensaios de toxicidade aguda e de fuga foram realizados com o organismo-teste *E. andrei*, expostos às mesmas associações descritas na Tabela 2, para os tempos T0 (inicial), T1 (3 meses) e T2 (6 meses).

2.4.1 Teste de determinação da Biodegradabilidade de solo, pelo método Respirométrico de Bartha e Pramer (1965).

O teste de biodegradabilidade de solo foi desenvolvido de acordo com a norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 14283 (1999), cujos passos estão descritos abaixo.

2.4.1.1 Preparo das Amostras

Foram pesados 50 g de cada uma das 13 associações (TF/solo/BCA) a serem testadas (Tabela 2) e transferidas, individualmente, para os Respirômetro de Bartha (Figura 1).

2.4.1.2 Montagem dos Respirômetros

Para a montagem dos respirômetros foram pesados 50 g de cada associação e colocada nos respirômetros. Nos braços do respirômetros foram adicionados 20 mL de KOH, para a captura do gás carbônico produzido. Os respirômetros foram selados com suas tampas, conforme a figura 1, sendo que em uma tampa havia cal sodada para evitar a entrada de CO₂ externo.

2.4.1.3 Titulação do Branco e das amostras

Para a titulação do branco, uma alíquota de 10 mL de solução de KOH 0,4 N foi transferida para um Erlenmeyer de 125 mL, onde foram adicionados mais 20 mL de água isenta de CO₂. Para a titulação das amostras foi retirado o KOH presente no braço do respirômetro, sendo este braço lavado duas vezes com 10 mL de água isenta de CO₂. Após este processo, foram adicionados 1,0 mL de solução BaCl₂ e três gotas do indicador fenolftaleína. A titulação foi realizada com solução de HCl 0,1 N, onde o volume de HCl usado foi anotado na planilha de respirometria e utilizado nos cálculos da produção de CO₂. Os respirômetros foram montadas em quadruplicata. Durante este processo, o respirômetro passou por aeração artificial para renovação do ar interno.

2.4.1.4 Cálculo da taxa de respiração:

2.4.1.4.1 Para o teste controle:

Equação 2 - Cálculo da produção de CO₂ nos respirômetros controles:

$$Tx \text{ de resp. Controle} = \left[(\text{Branco dia anterior} - \text{Média das Réplicas}) \times \left(\frac{Qtd \text{ de HCl dia}}{Qtd \text{ de KOH anterior}} \right) \right] \times 50 \times 0,044$$

2.4.1.4.2 Para os testes com as amostras:

Equação 3 - Cálculo da produção de CO₂ nos respirômetros contendo as associações de torta de filtro, solo e bagaço.

$$Tx \text{ de resp. das amostras} = \left\{ [(\text{Branco dia anterior} - \text{Média das Amostras}) \times \left(\frac{Qtd \text{ de HCl dia}}{Qtd \text{ de KOH anterior}} \right)] \times 50 \times 0,444 \right\} - \text{Controle}$$

O fator de correção usado para transformar μmol em mg de CO₂, para 50,0 g de solo foi de 0,044.

2.4.2 Ensaios com o organismo teste *Eisenia andrei*

Os testes de toxicidade com *E. andrei* foram realizados segundo a norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 15537 (2007) e L.6.401 (1990) da CETESB, sempre em quadruplicata e no teste de fuga em quintuplicatas.

2.4.2.1 Teste de toxicidade aguda

Para os ensaios de toxicidade aguda, foram utilizadas minhocas adultas e cliteladas com idade superior a dois meses e com peso individual entre 300 e 600 mg. Após seleção, os espécimes foram aclimatados em solo artificial, por 24 horas, antes de serem utilizados nos ensaios.

Após a adição de 750 g do substrato (1 tipo de substrato por pote) em potes de polipropileno de 2 litros, foram colocados, sobre o substrato, dez organismos-teste. Os potes foram dispostos em local climatizado, com temperatura variando entre 18 e 22 °C, e com iluminação contínua. No 7º e 14º dias de experimento foram registradas as mortalidades dos indivíduos. A temperatura e a umidade relativa do ambiente foram monitoradas diariamente e os resultados expressos em concentração letal inicial mediana (CL₅₀; 14 dias), calculados pelo método estatístico Trimmed Spearman-Kärber, para estimar a concentração média letal (HAMILTON et al., 1977).

2.4.2.2 Teste de fuga

O teste de fuga foi realizado de acordo com a norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR ISO 17512-1.

Para o desenvolvimento dos testes, foram utilizados dois tipos de substrato: solo controle e amostras das associações de TF/solo/BCA. Inicialmente foram dispostos, em um recipiente de 2 L, 200 g do solo controle em um dos lados do recipiente e 200 g de cada amostra (uma por frasco) do outro lado deste mesmo recipiente. As amostras foram inicialmente separadas por uma divisória, para que não se misturassem. Depois da disposição das amostras nos recipientes, as divisórias foram retiradas e aí expostos, nos centro do recipiente (distribuição homogeneia), os 10 espécimes de minhocas por concentração testada. Os organismos ficaram expostos por 48 horas, nas mesmas associações citadas na Tabela 2. Após este período, foi realizada a leitura dos resultados. O controle positivo foi realizado com uma substância

referência para este teste (ácido bórico, na concentração de 750 mg H₂BO₃ por quilograma de solo seco).

Para a validação do teste, o número de indivíduos mortos e/ou perdidos não pode ultrapassar 10% do total de organismos expostos aos tratamentos. O cálculo e a apresentação dos resultados foram feitos com base nas porcentagens dos efeitos observados em cada concentração, comparando o número de indivíduos vivos presentes nas concentrações testadas com indivíduos vivos presentes nos controles negativo e positivo, conforme a fórmula abaixo:

Equação 4 - Equação para o cálculo de porcentagem de fuga (AMORIM et al. (2005))

$$A = \left(\frac{C - T}{N} \right) \times 100$$

Onde:

A = Efeito observado (%);

C = Número de indivíduos presentes no solo controle;

T = Número de indivíduos presente no substrato testado;

N = Número total de indivíduos em cada tratamento (geralmente dez por tratamento).

Os resultados foram submetidos à análise de variância, pelo programa Graphpad 5, expressos em CL₅₀. Os resultados com morte inferior a 20% dos indivíduos foram considerados não tóxicos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como os componentes da TF podem conter substâncias com potencial tóxico, o descarte deste resíduo no ambiente pode acarretar em um comprometimento nas atividades biológicas dos organismos expostos. Desta forma, como este material vem sendo descartado indiscriminadamente no ambiente, há hoje a necessidade de uma melhor avaliação dos possíveis impactos que este resíduo possa promover nos ecossistemas onde são descartados.

3.1 Caracterização química da Torta de Filtro (TF)

As análises químicas são importantes ferramentas de avaliação das condições ambientais, mas não fornecem informações sobre os efeitos que os poluentes possam induzir, direta ou indiretamente, na biota exposta ao composto encontrado. Já os bioensaios podem conferir

vantagens adicionais aos dados obtidos em análises químicas (ZHOU et al., 2008), pois refletem os efeitos da poluição sobre a biota associada a ela. Assim, segundo Klobucar et al., 2003; Egito et al. (2007) os dados obtidos em ensaios biológicos completam as avaliações químicas e físico-químicas, permitindo um melhor diagnóstico sobre os possíveis riscos que os contaminantes possam promover à saúde ambiental.

A amostra de TF foi analisada quimicamente pela empresa Analytical Technologies/SP e os resultados estão expressos na tabela 3, tendo como base a norma de referência USEPA 6010C (2007).

Tabela 3 - - Caracterização química da torta de filtro no início e no final dos testes

Parâmetros	TORTA DE FILTRO (mg/kg)		VALORES ORIENTADORES (CETESB) (mg/kg)		
	Análise Inicial (T0)	Análise final(T2)	Ref.	Prev.	Interv.
Cd	< 2,55	< 1,29	<0,5	1.3	3
Co	< 3,83	< 1,93	13	25	35
Cr	30,6	18,3	40	75	150
Ni	< 5,10	< 2,58	13	30	70
Pb	< 5,10	< 2,58	17	72	180
Zn	177,2	43,1	60	300	450
Cu	51,3	22,2	35	60	200
Fe	8910,7	11743,6	-	-	-
K	4517,9	1239,4	-	-	-
P	2107,4	686,0	-	-	-
Mg	1369,9	362,8	-	-	-
Na	62	47,8	-	-	-
COT	88,6*	3,62*	-	-	-
N	6122,4	330,35	-	-	-

T0 = tempo inicial do experimento; T2 = tempo final do experimento; * Em porcentagem;

A torta de filtro tem sido proposta há muito tempo como fertilizante natural de solos agrícolas (ROTH, 1971), devido à sua composição altamente rica em nitrogênio, fósforo e outros elementos, como pode ser observado na Tabela 3.

Após o período de 6 meses de degradação, foi observado um decréscimo considerável na relação Nitrogênio/Fósforo e Carbono/Nitrogênio presentes na TF. Como esses elementos são os principais nutrientes responsáveis pelo perfilhamento da cana-de-açúcar e a deficiência de fósforo pode limitar o crescimento da planta (DELGADO, 1973; FRAVET, 2010), o uso da TF como fertilizante poderia ser, então, inviável. Singh e Sharma (2002) obtiveram resultados

parecidos, quando utilizaram o processo de vermicompostagem. Os autores observaram uma perda de 30,10 % a 26,48 % no teor de carbono orgânico total, nos primeiros 20 dias de biodegradação do composto TF + palha de trigo. Deste modo, apesar de ser rica em matéria orgânica, a TF sofre, ao longo do tempo, uma decomposição que diminui o seu potencial de ser utilizada como fertilizante natural. Uma alternativa sugerida por Meunchang et al. (2005) seria adicionar BCA à TF, pois esta mistura poderia promover uma conservação de nitrogênio no meio, uma vez que ambos os compostos têm o potencial para uso agrícola. Segundo os mesmos autores, a mistura de TF+BCA pode ajudar na manutenção de nitrogênio e reduzir a perda deste composto no substrato durante o período de incubação, auxiliando os microrganismos do meio.

A diminuição dos parâmetros químicos analisados, observada após seis meses, pode ser explicado pelo processo de biodegradação, corroborando as descrições de Roth (1971), que observou que à medida que os compostos orgânicos da TF são decompostos, as propriedades físicas, químicas e microbiológicas do substrato mudam. O único elemento que apresentou elevação em sua quantidade foi o ferro, fator este que pode ser explicado pela própria degradação dos óxidos de ferro na TF (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2011), em íons de ferro da TF degradada (GUPTA, 2011), uma vez que a presença de óxido de ferro dificulta a detecção do elemento no substrato.

3.2 *Correção de umidade e variação de pH*

Os valores dos pHs das associações de TF estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - pHs das associações TF\solo\ BCA, segundo a norma ABNT NBR 15537

pHs das associações TF + Solo	
Concentração	pH
Solo	3,4
5%	6,1
10%	6,1
25%	6,5
50%	7
75%	7
100%	7,5
pHs das associações TF + Solo + BCA	
Concentração	pH
5%	7,2
10%	7,3
25%	7,2
50%	7,5
75%	7,4

TF= Torta de Filtro; BCA=Bagaço de cana-de-açúcar

Foi observado que, à medida que se adicionou uma maior quantidade de TF ao solo, houve um aumento nos valores de pH. Nossos resultados corroboram os observados por Almeida Júnior et al. (2011), onde os autores concluíram que a adição de TF no solo leva a uma leve alcalinidade do solo, efeito este, provavelmente, decorrente da adição de cal, usado durante o processo de clarificação, uma das etapas da fabricação de açúcar.

3.3 Biodegradação pelo teste de Bartha e Pramer (1965)

O período de incubação, para degradação das amostras das associações TF/solo/BCA, pelo teste de Bartha e Pramer, foi de 112 dias, pois, para que o resíduo sólido fosse considerado biodegradado, teve que ter seu volume reduzido em 30 %. As figuras 2 e 3, representam as variações diárias da produção de CO₂, medidas através de titulação e calculada conforme a fórmula citada no item 2.4.1.5. Nas figuras 4 e 5, estão representadas a produção acumulada de CO₂, para todo o período de incubação. Já na figura 6, estão demonstrados as porcentagens de diminuição na produção de CO₂, ocorridos no processo de incubação.

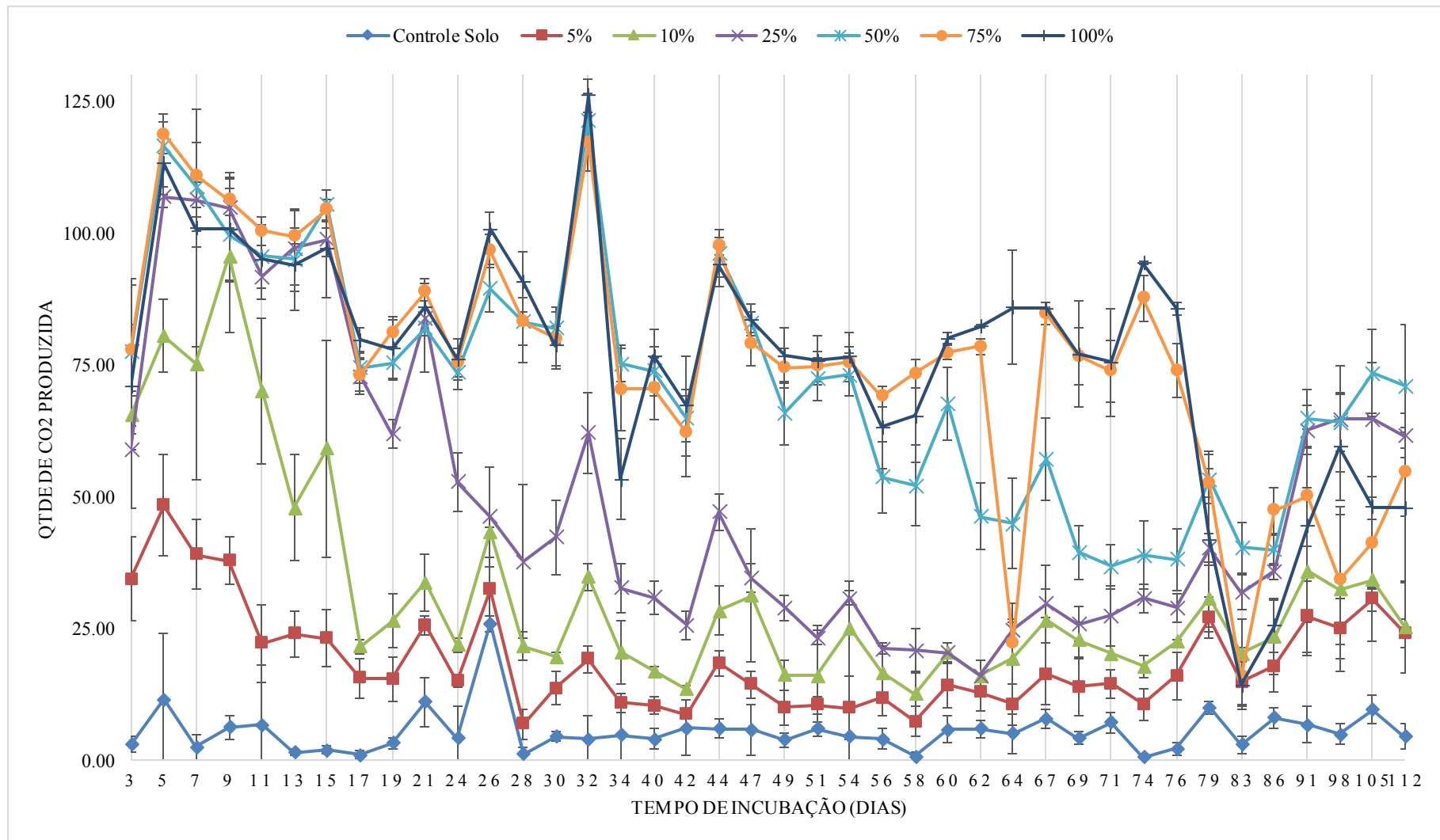


Figura 1 - Produção diária de CO₂ das associações de TF, sem a adição de BCA, durante o período de 112 dias de biodegradação

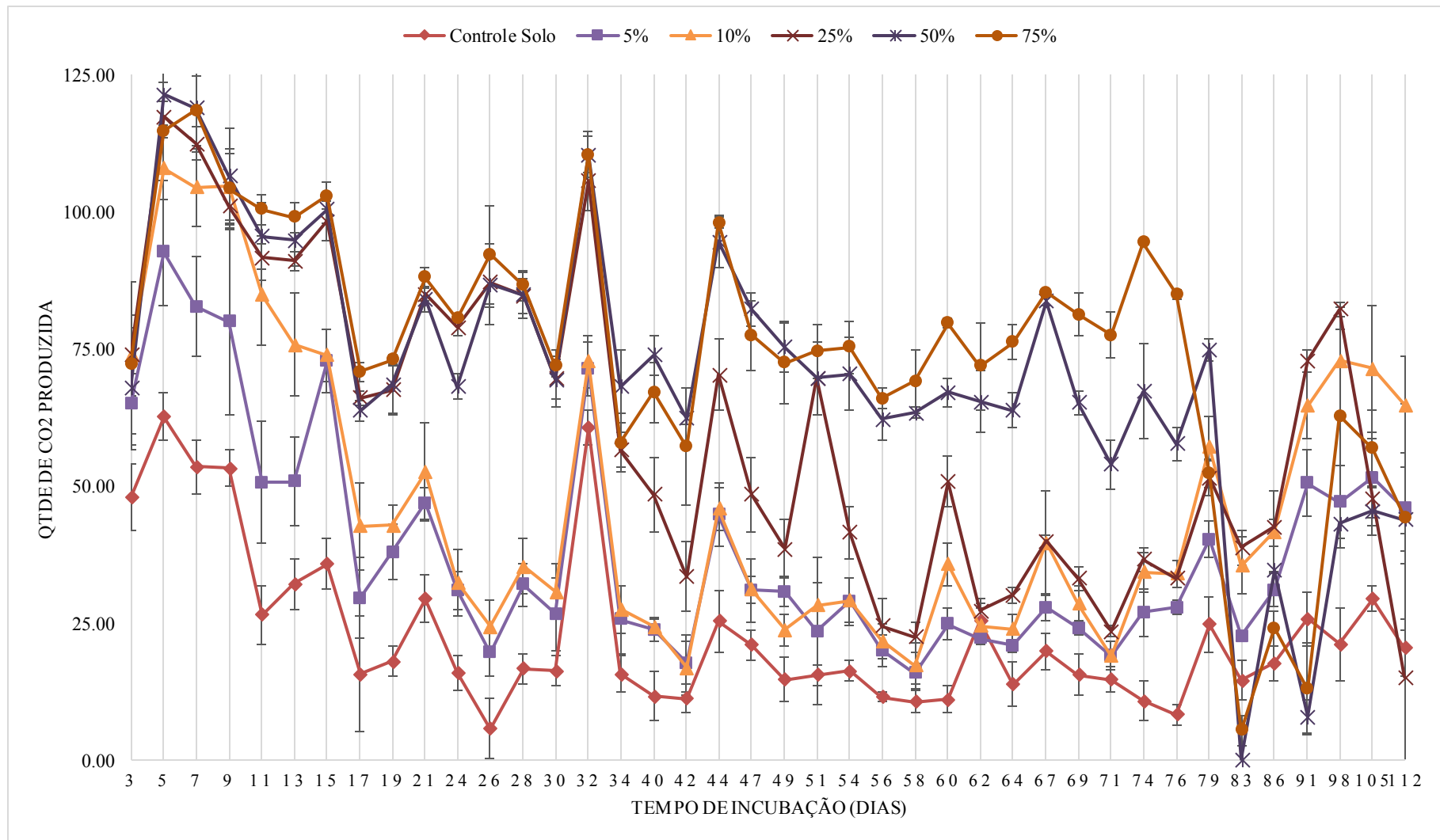


Figura 2 - Produção diária de CO₂ das associações de TF, com a adição de BCA, durante o período de 112 dias de biodegradação

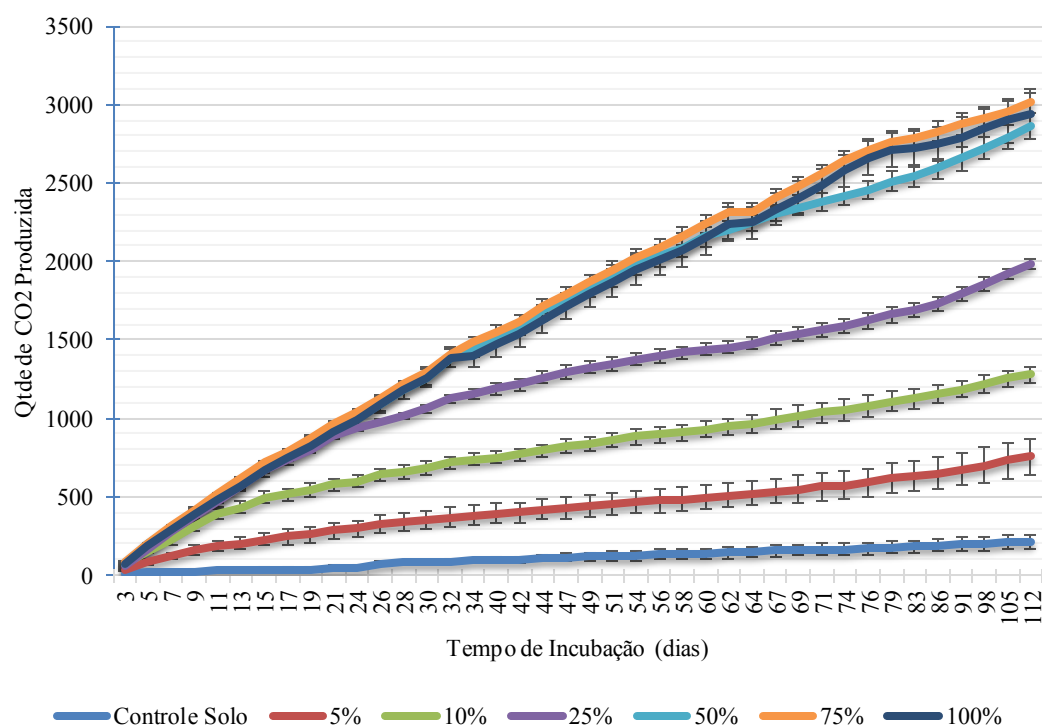


Figura3 - Produção de CO₂ acumulada durante os 112 dias de biodegradação das associações de TF, sem a adição de BCA

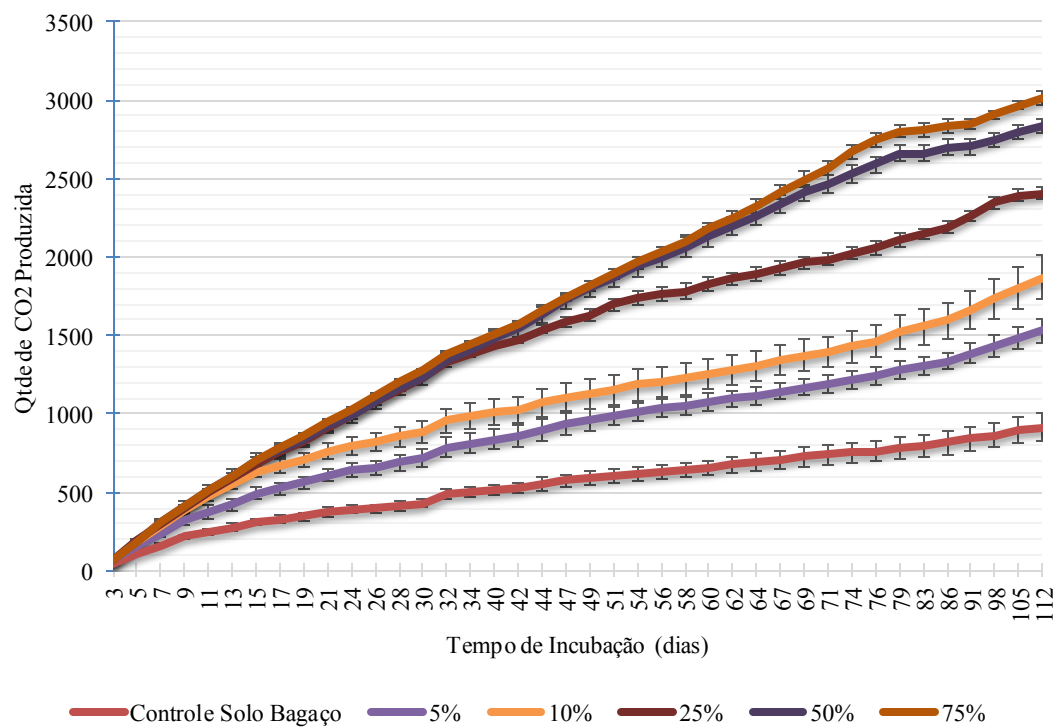


Figura4 - Produção de CO₂ acumulada durante os 112 dias de biodegradação das associações de TF, com a adição de BCA

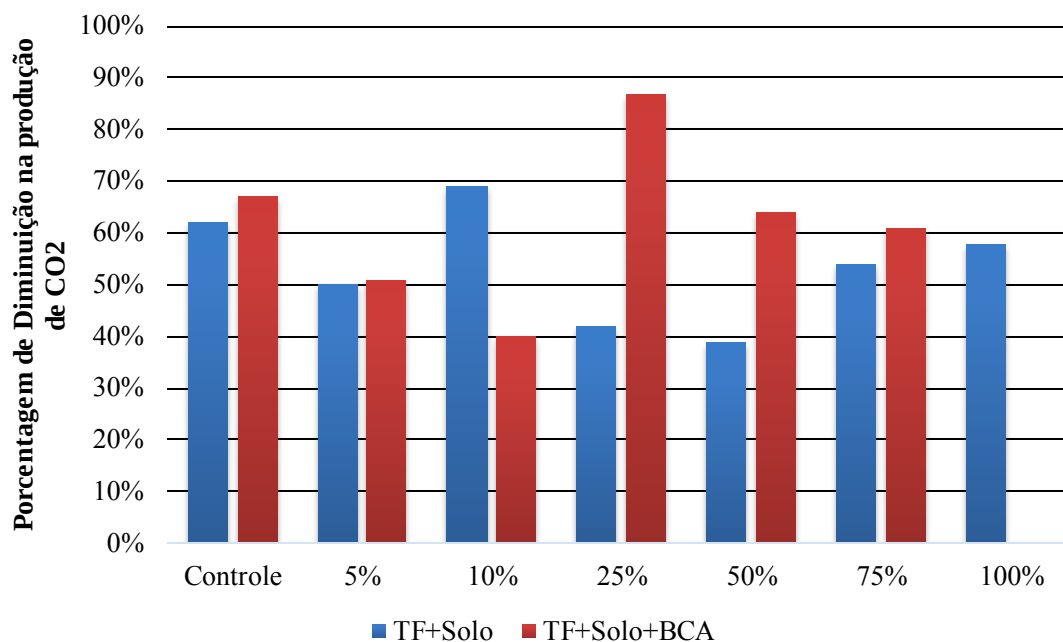


Figura 5 - Avaliação da diminuição na produção de CO₂ nos respirômetros

Nos gráficos de biodegradação (figuras 2 e 3) nos 30 primeiros dias apresentou uma biodegradação ascendente, já no 34º dia as associações apresentaram uma queda na produção de CO₂, isso deve-se a biodisponibilidade de matéria orgânica que pode ter diminuído, porém nos dias procedentes houve um aumento na produção de CO₂ novamente, a biodisponibilidade de nutrientes e a variação de micro-organismos presentes em todo processo de biodegradação.

A biodegradação do composto foi efetiva pois na figura 6 demonstra a eficiência da biodegradação de acordo com as associações testadas.

De acordo com Rasul et al. (2008), a TF é uma fonte potencial de matéria orgânica, pois contém grandes quantidades de carbono orgânico. Como há uma grande quantidade de matéria orgânica a ser degradada, a atividade microbiana é intensa, fato observado pela grande produção de CO₂. Uma vez que a matéria orgânica vai sendo degradada, a sua quantidade diminui e isso faz com que ocorra uma diminuição da atividade microbiana e a consequente diminuição de CO₂ produzido.

3.4 Teste de toxicidade aguda com o organismo teste *E. andrei*

Segundo Loureiro et al. (2005), os bioensaios podem ser ferramentas muito úteis para avaliar a qualidade de solos e medir o potencial tóxico de alguns contaminantes. Além disso, existem testes padronizados de toxicidade aguda e crônica, com organismos como por exemplo

a minhoca, para se avaliar a ecotoxicologia de solos. Testes de toxicidade com minhocas são, segundo Zhou et al. (2007) ferramentas úteis na avaliação de risco de ambientes terrestres. Esses mesmos autores afirmam, ainda, que testes com diferentes níveis hierárquicos devem ser feitos para poder se avaliar a letalidade, subletalidade e mudanças no comportamento. O teste para se avaliar a letalidade seria representado pelo teste de toxicidade aguda e o teste para avaliar alterações no comportamento seria o teste de fuga.

Pelo teste de toxicidade aguda, foi observado que a concentração que causa a morte ou imobilização de 50 % (CL_{50}) dos organismos expostos aos substratos, para as amostras no T0, calculado pelo método SPEARMAN-KARBER (HAMILTON, 1977), apresentaram valores similares entre si. Foram encontrados os valores, de CL_{50} , para 14 dias, de 17 % e de 18 % de TF, para as concentrações sem a adição de BCA e com a adição de BCA, respectivamente. Apesar do CL_{50} ser quase o mesmo, foram observadas algumas diferenças no comportamento dos organismos expostos às associações com e sem BCA. Nas concentrações de 5 % TF + solo e em todas as concentrações contendo TF + solo + BCA, os organismos-testes permaneceram no interior do solo. Nas amostras contendo somente TF + solo, os organismos-testes permaneceram nas paredes do recipiente teste, fato este que talvez possa ser explicado pela influência da torta de filtro na permeabilidade do solo e a consequente capacidade de penetração das minhocas neste solo, pois, segundo Korndörfer e Anderson (1997), a TF não apresenta efeitos danosos ao solo em que é aplicado. No entanto, estes mesmo autores afirmam que quando a TF é aplicada em altas concentrações, ela pode afetar as taxas de permeabilidade e infiltração do solo.

As concentrações de 50 e 75 %, tanto de TF + solo como TF + solo + BCA, apresentaram toxicidade elevada. Todos os organismos expostos à amostra bruta (100 % TF) para T0, morreram após 5 minutos de exposição. Também foi detectada toxicidade para a concentração de 50% TF + BCA obtida no T2, mostrando-se uma toxicidade dose independente, que pode ter sido causado pela biodegradação dos compostos da TF ou pela capacidade desta agregar compostos em sua estrutura. Em T1, as associações não apresentaram a mesma toxicidade de T0 e, por isso, consequentemente, não foi possível realizar o cálculo do CL_{50} . Nas Figuras 7 e 8, estão representadas as porcentagens dos indivíduos mortos ou imóveis, encontrados em T0. As figuras 9 e 10, e 11 e 12, trazem os resultados para T1 e T2, respectivamente. Foi avaliado o comportamento e o peso de todos os indivíduos submetidos aos testes, sendo observado, como citado anteriormente, somente alteração de comportamento para T0. Quanto ao peso dos indivíduos, não houve alteração significativa dos grupos testados para T0. Para T1, houve uma perda de peso de 20 %, em média, enquanto que para T2, houve um ganho de 32 % de peso.

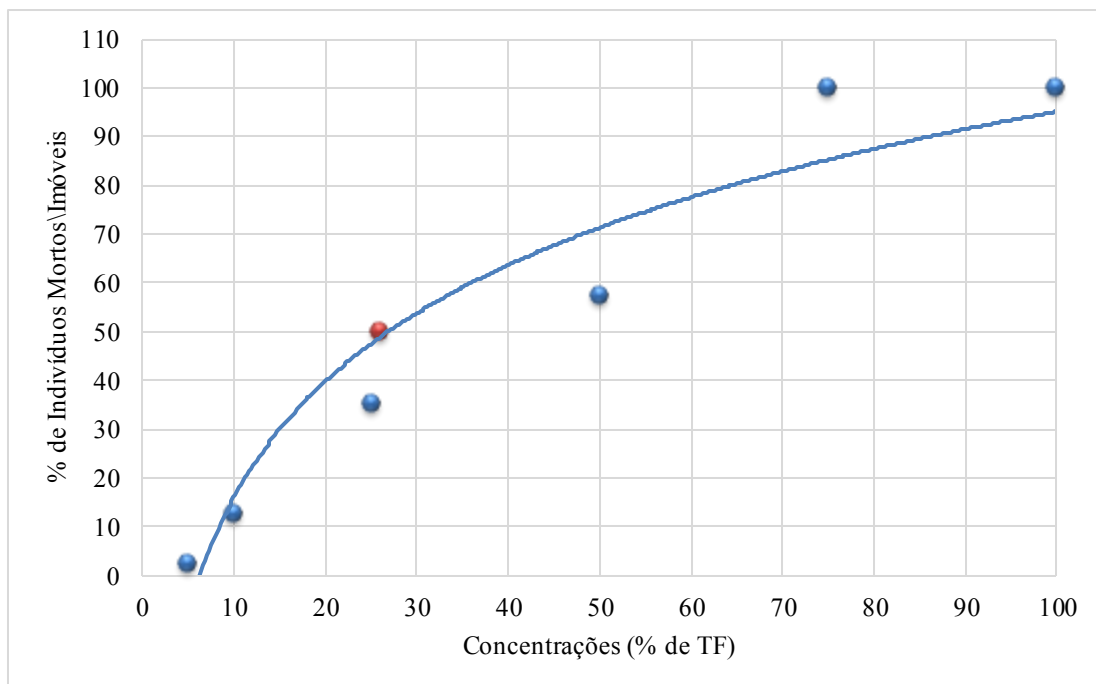


Figura 6 - Teste de Toxicidade Aguda da TF + Solo, para T0

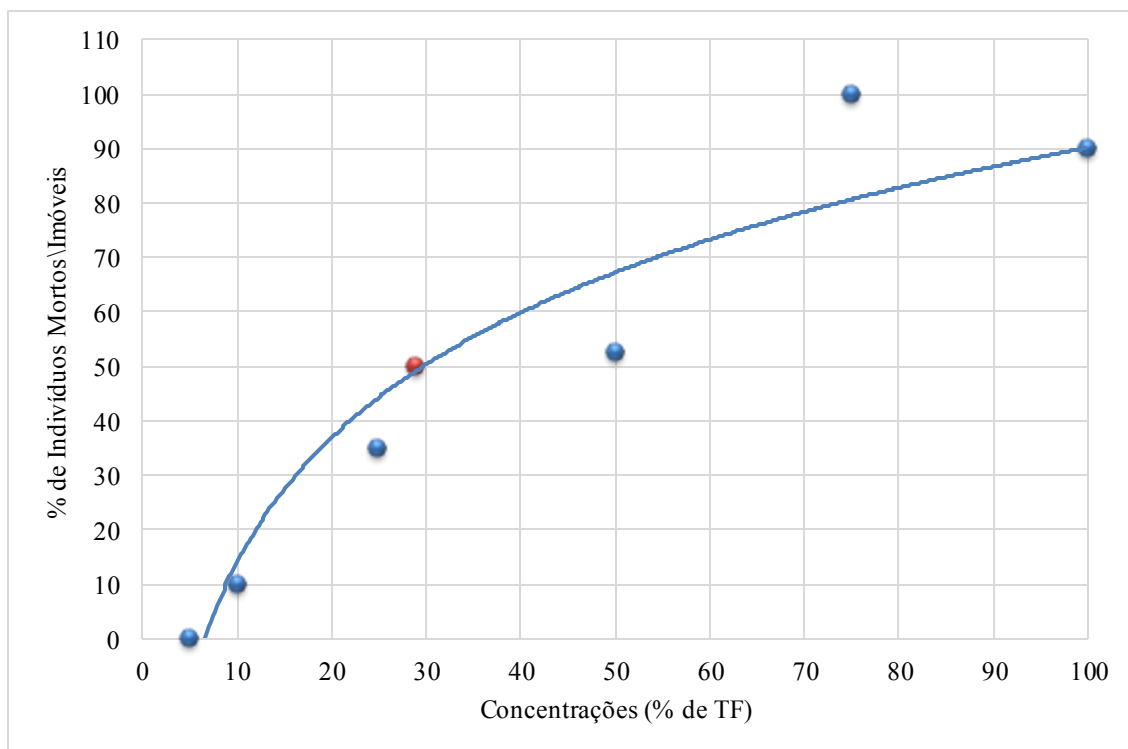


Figura 7 - Teste de Toxicidade Aguda da TF + Solo + BCA, para T0

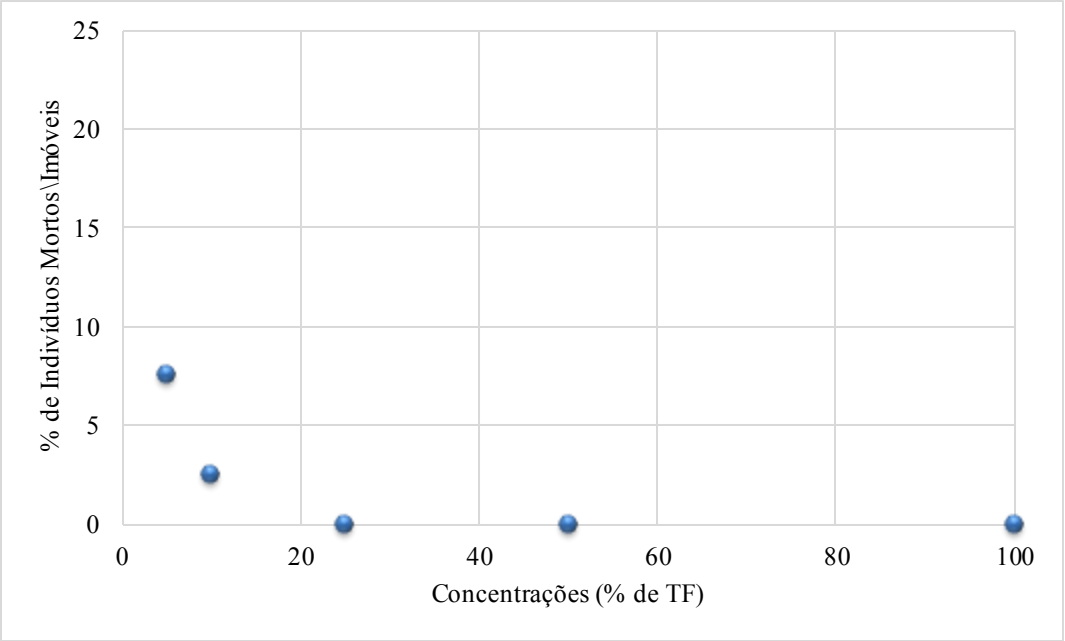


Figura 8 - Teste de Toxicidade Aguda da TF + Solo, para T1

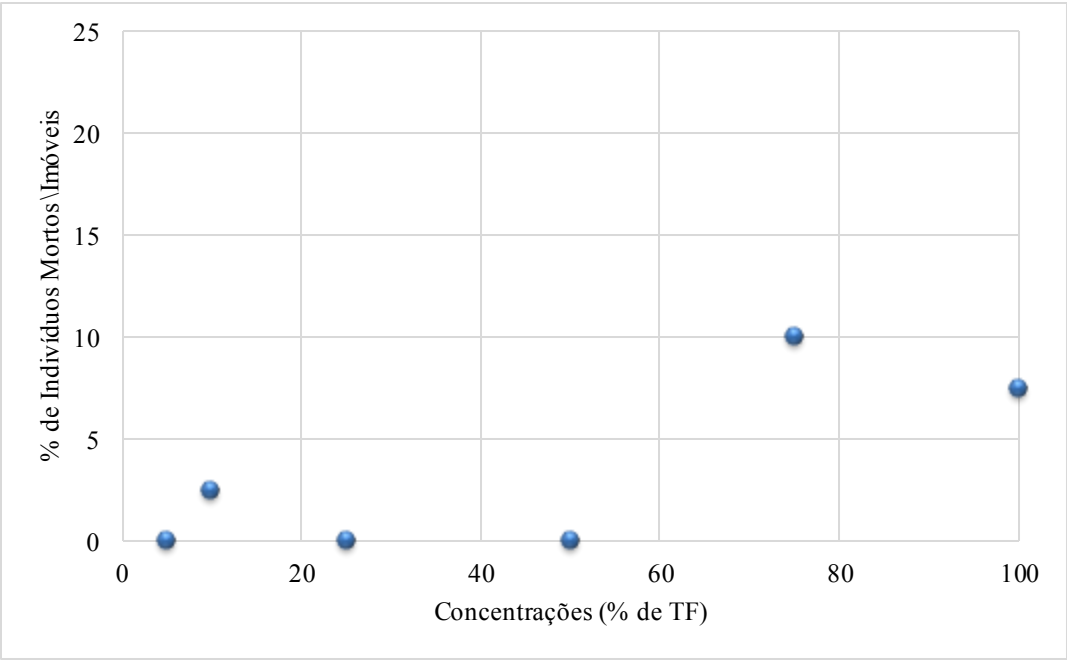


Figura 9 - Teste de Toxicidade Aguda da TF + Solo + BCA, para T1

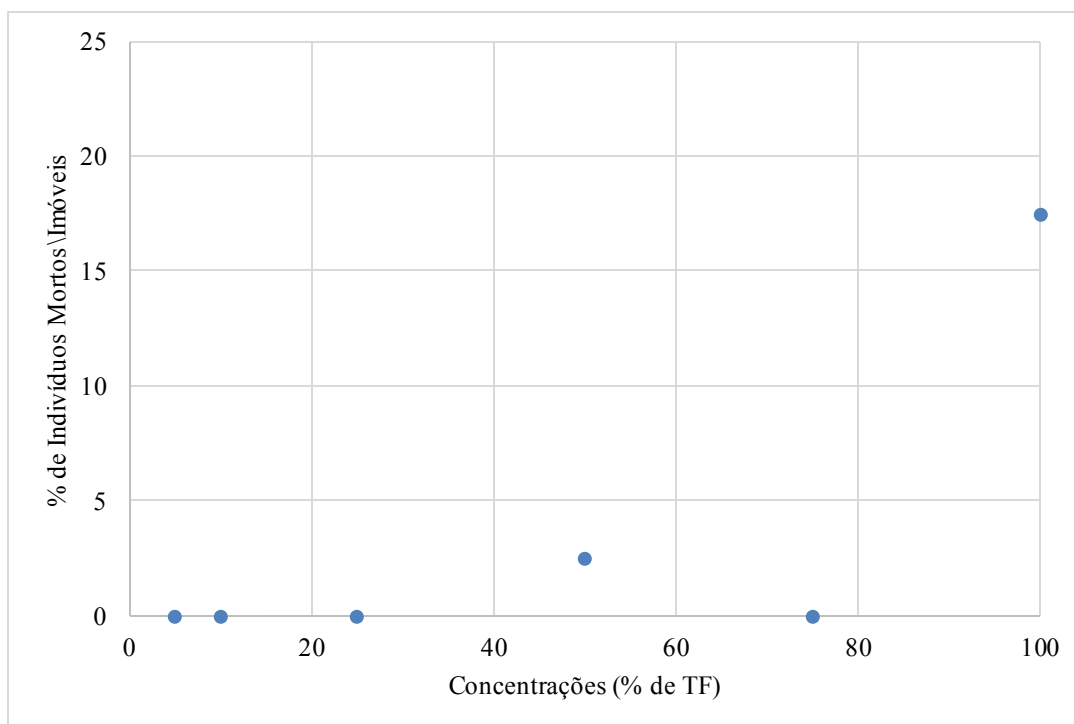


Figura 10 - Teste de Toxicidade Aguda da TF + Solo, para T2

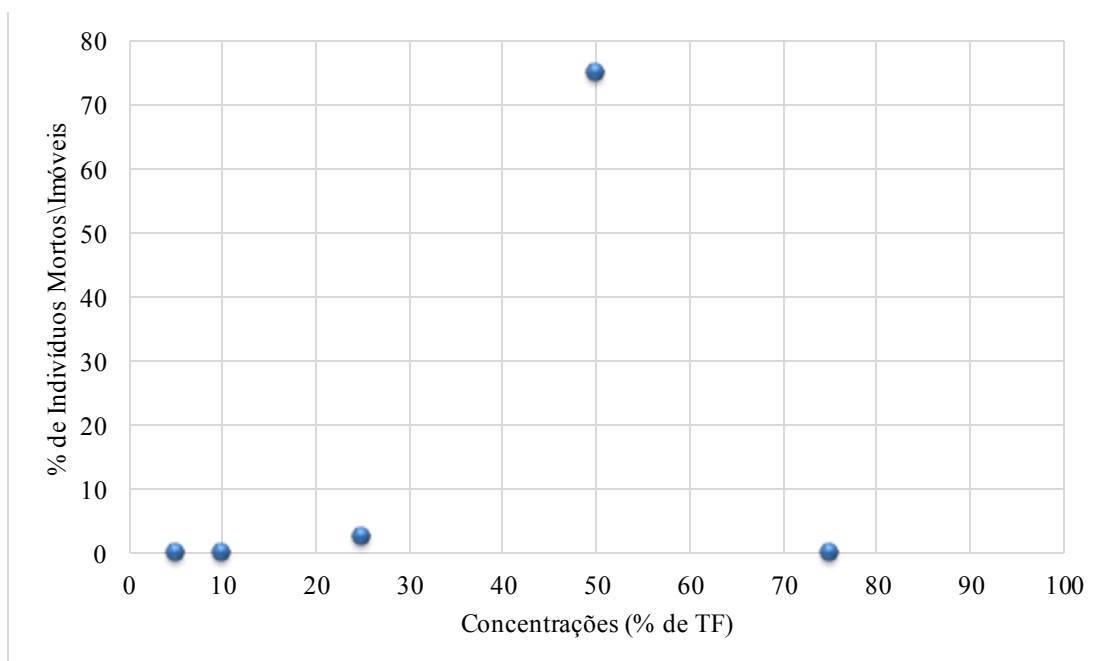


Figura 11 - Teste de Toxicidade Aguda da TF + Solo + BCA, para T2

Como houve uma diminuição da toxicidade da TF, ao longo do período de biodegradação, a toxicidade inicial da TF pode estar relacionada aos altos índices de matéria orgânica, uma vez que quando há uma quantidade excessiva deste composto a sobrevivência de alguns organismos, como *E. Andrei*, pode ser alterada. Além disso, segundo Peijnenburg et al.

(1999), efeitos tóxicos causados por qualquer característica do solo, incluindo a presença de metais e outros toxicantes e a fatores como pH, podem afetar o comportamento de minhocas.

Outro fator que pode influenciar na toxicidade da TF é o pH, pois, segundo Firme (2005), o aumento de pH do solo, causado pela adição de torta de filtro, possibilita uma mudança de comportamento de metais tóxicos como, por exemplo, o cádmio. Segundo Casarini et al. (2001), os valores de cádmio estabelecidos pela CETESB (Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo) para solo de referência é de <0,5mg/Kg; alerta 3mg/Kg e intervenção agrícola 10mg/Kg. Em nossas avaliações, foi observado um valor inicial de cádmio, na TF, de <2,55mg/Kg, posicionado entre os valores de referência e de alerta. O cádmio se acumula no tecido cloragógeno sob a forma de grânulos, que fica ao redor do trato digestivo de minhocas (MORGAN E MORRIS, 1982; LI et al., 2009), e acaba induzindo a formação de metalotioneínas (DABRIO et al., 2002). O cádmio pode interferir na distribuição geográfica e na reprodução das minhocas (REINECKE E REINECKE, 1996), nos processos neurosecretórios (SIEKIERSKA, 2003), na imunidade (HOMA et al., 2003) e na osmoregulação (REINECKE et al., 1999). Em um estudo realizado por Fourie et al. (2007), com 5 espécies diferentes de minhoca, expostas a diferentes concentrações de cádmio, foi observado que na concentração de 50mg/L, 50 % dos animais expostos morreram. Porém, neste trabalho, foi observado que a concentração de cádmio diminuiu ao longo do tempo e, deste modo, à sua ação tóxica também diminuiu.

Ainda pela CETESB, os valores orientadores para cromo são de 40 mg/kg de referência, 75 mg/kg para prevenção e de 150 mg/kg para intervenção agrícola. Já para as zinco, esse valor é de 60 mg/kg de referência, 300 mg/kg para prevenção e de 450 mg/kg. Na amostra inicial, esses valores estavam abaixo dos valores de referência. Estudos demonstram que o cromo pode afetar a reprodução dos organismos, onde as concentrações acima de 100 mg/kg podem levar a uma diminuição da reprodução. Para o zinco, a concentração de efeito reprodutivo é para níveis acima de 1000 mg/kg. (VAN; VAN GESTEL, VAN BREEMEN E BAERSELMAN, 1993; SPURGEON, HOPKIN E JONES, 1994; VLIET; ZEE e MA, 2005)

Para o cobre o valor de referência é de 35mg/kg, 60mg/kg para valor de prevenção e 200 mg/kg para intervenção agrícola. Na TF, os valores obtidos para este metal foi de 51,3 mg/kg, próximo ao valor de prevenção. Como o cobre promove a perda de peso, os dados de toxicidade, registrados, neste trabalho, para perda de peso, podem estar relacionada com a absorção de cobre, devido aos efeitos quelantes que este metal possui. Além da perda de peso, o cobre pode promover uma diminuição significativa na produção dos ovos, em concentrações acima de 50 mg/kg, como demonstrada por Zhou et al. (2013). Estudo realizado por Van Gestel

et al. (1989) mostraram este mesmo efeito, porém, após três dias de recuperação, as minhocas retornaram à produção normal de ovos.

Outro fator que pode ser responsável pela toxicidade da TF, seria o ferro. O ferro é um elemento essencial para o metabolismo dos seres vivos, mas, quando em quantidades excessivas, pode se tornar uma ameaça para as células e os tecidos biológicos (PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2005). Esse metal possui potencial redox e, sob condições aeróbicas, pode catalisar a formação de radicais nocivos (PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2005), que podem induzir estresse oxidativo nas células expostas e, consequentemente, levar os organismos à morte.

3.5 Testes de Fuga, segundo a Norma da ABNT NBR ISO 17512-1

Segundo Loureiro et al. (2005), o teste de fuga é um teste inicial ou de triagem que serve para uma avaliação rápida sobre a contaminação do solo, por conferir informações que podem determinar o real efeito dos contaminantes sobre os organismos expostos.

Pelo teste de fuga, realizados neste trabalho, foi observado, para todos os tratamentos (T0, T1 e T2), que os organismos demonstram preferência pelas associações contendo TF, porém, quando expostos às concentrações mais altas de TF, os organismos morreram.

3.5.1 Teste de Fuga para T0 (Início do experimento)

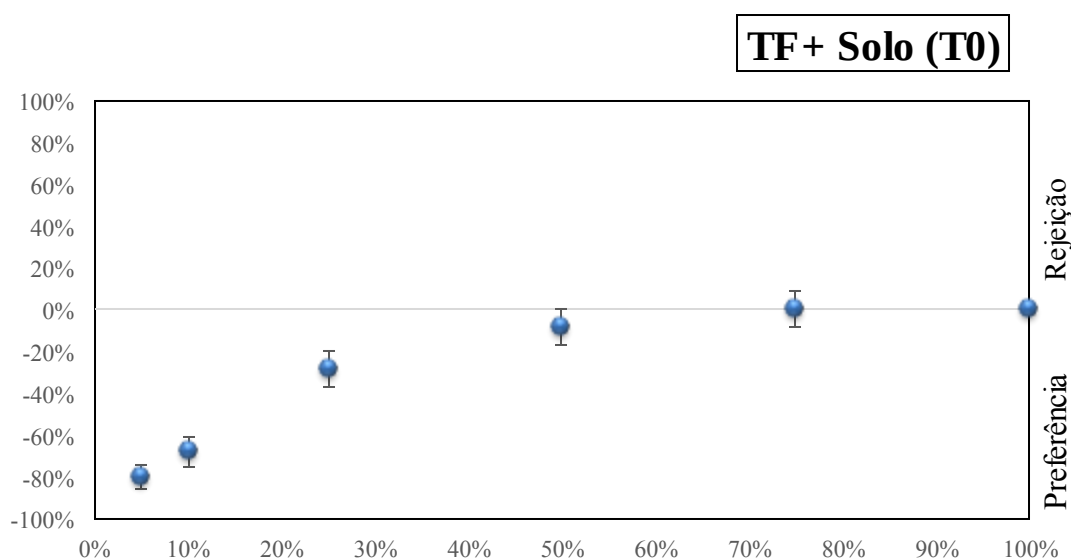


Figura 12 – Resposta do teste de fuga com *E. andrei*, nas associações contendo TF + solo, para o T0

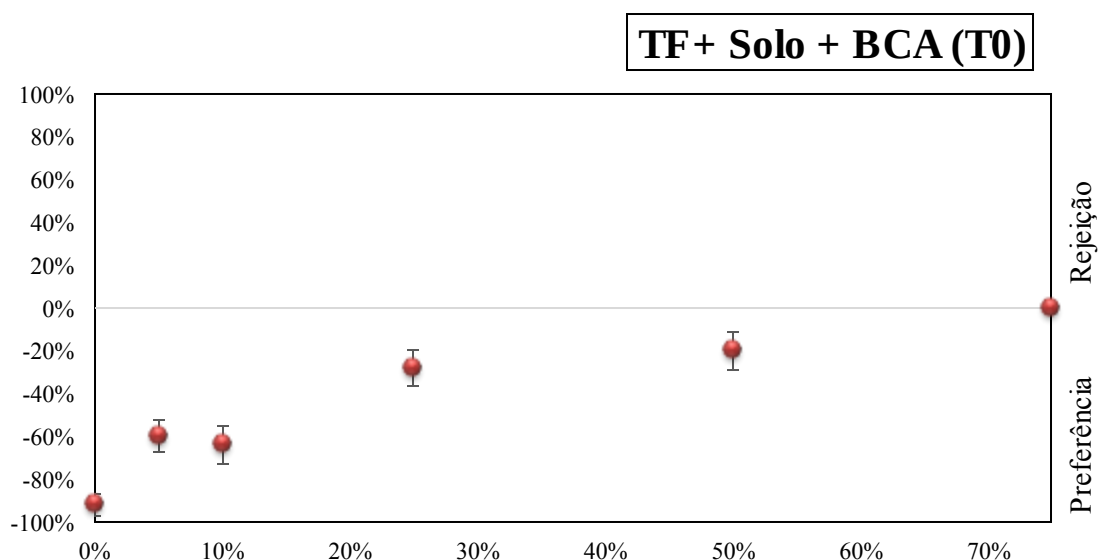


Figura 13 - Resposta do teste de fuga com *E. andrei*, nas associações contendo TF + solo + BCA, para o T0

Apesar das minhocas apresentarem preferência pelas associações de TF, foi observado que, conforme houve um aumento na concentração da TF nas associações, a preferência passou a não ser tão acentuada, quando comparadas com as registradas para as associações com concentração mais baixas. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que quanto maior a quantidade de TF, maior a quantidade de matéria orgânica e de metais presentes no meio.

3.5.2 Teste de Fuga para o T1 (3 meses de experimento)

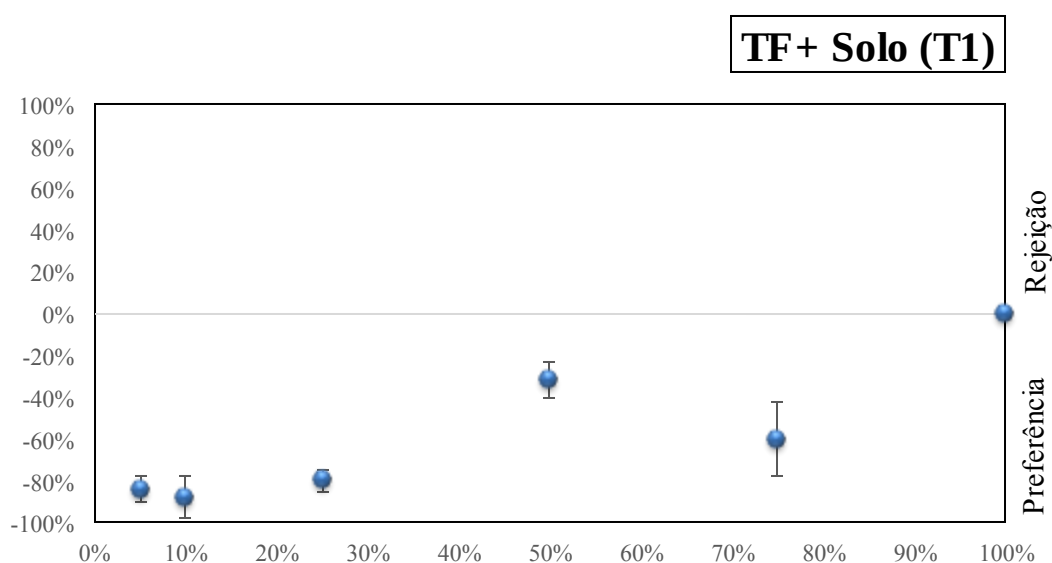


Figura 14 - Resposta do teste de fuga com *E. andrei*, nas associações contendo TF + solo, para o T1.

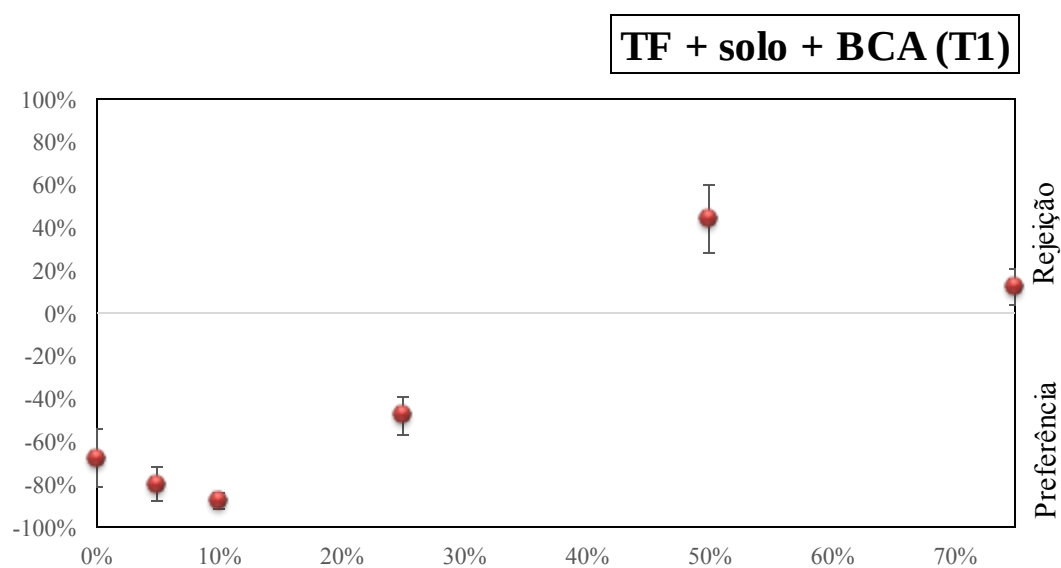


Figura 15 - Resposta do teste de fuga com *E. andrei*, nas associações contendo TF + solo + BCA, para o T1.

3.5.3 Teste de Fuga para o T2 (6 Meses de experimento)

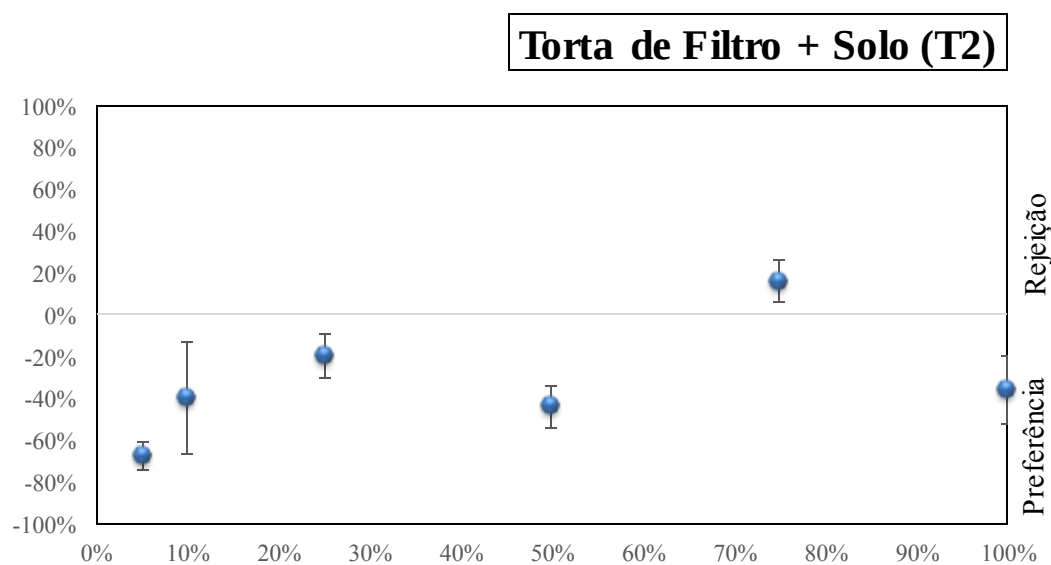


Figura 16 - Resposta do teste de fuga com *E. andrei*, nas associações contendo TF + solo, para o T2

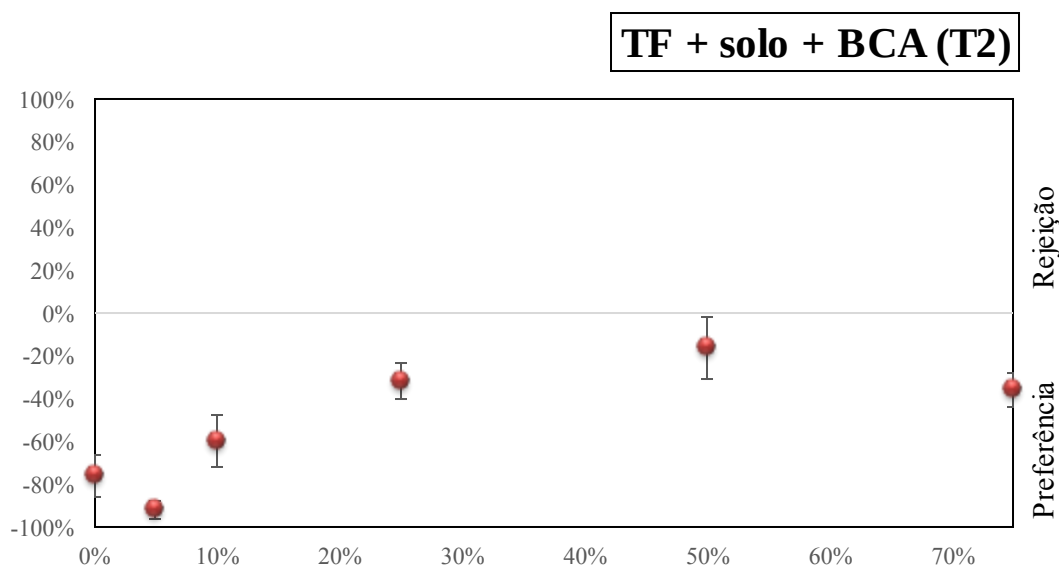


Figura 17 - Resposta do teste de fuga com *E. andrei*, nas associações contendo TF + solo + BCA, para o T2

Pelo teste de fuga, foi observado que, após o período de biodegradação, o organismo-teste *E. andrei* apresentou uma preferência pelas associações contendo TF, (figuras 13, 14, 15, 16, 17 e 18). Este aspecto é de suma importância na interpretação dos mecanismos de biodisponibilidade tanto de metais pesados quanto excesso de nutrientes para os oligoquetas, já que estes organismos absorvem o contaminante não somente via ingestão de solo, mas principalmente via cutânea (VIJVER et al., 2003).

Os resultados obtidos para os T1 e T2 indicaram que a concentração de 50 % de TF + solo + BCA induziu uma alta incidência de morte, para T1, e a concentração de 75 % de TF + solo levou, para T2, a uma rejeição do substrato com TF, por parte dos organismos, fato este que pode ter sido ocasionado pela liberação de compostos que ficaram biodisponíveis após a biodegradação.

O teste de fuga pode ser utilizado como complementar ao teste de toxicidade aguda, uma vez que se observa uma correlação entre diminuição da toxicidade e preferência dos organismos, que pode ser explicado pelo fato de que as minhocas possuem quimiorreceptores em seus protostômios e tubérculos sensoriais, que são capazes de detectar, com grande sensibilidade, a presença de substâncias químicas no solo (REINECKE et al., 2002).

Esta característica, também é explicada por Sousa et al. (2008), que utilizou de solos contaminados com vários metais, indica que a preferência dos organismos não se devem somente pela incapacidade de quimiorreceptores em detectar alguns contaminantes ambientais

a partir de misturas complexas, mas também pela grande afinidade da espécie por solos ricos em matéria orgânica ou por compostos normalmente presentes em solos naturais contaminados.

4 CONCLUSÃO

Muitos estudos vem sendo realizados no intuito de validar o uso da TF como fertilizante natural de solos. A maioria deles analisa a composição química das associações da TF e solo e avalia os efeitos dessas associações sobre a produtividade das culturas a elas expostas. No entanto, poucos estudos foram feitos para se avaliar os efeitos destas associações sobre os organismos expostos.

O organismo *E. andrei* se mostrou um excelente organismo teste para se investigar os efeitos da TF e suas associações.

Pelos resultados deste estudo, foi observado que, à medida que aumenta o tempo de biodegradação, há uma diminuição significativa da toxicidade da TF (associações de TF + solo e TF + solo + BCA) para o organismo-teste *E. Andrei*, indicando que a biodegradação é uma metodologia indicada para diminuir a toxicidade deste composto.

Foi observado que a quantidade de TF a ser associada ao solo também é um fator que deve ser considerado. Dentre os bioensaios realizados com a TF, os que se apresentaram mais adequados, entre todos os tempos testados, foram as concentração de 10 % e 25 % de TF + solo.

Pelos resultados obtidos para a alteração de massa corpórea dos grupos experimentados, para o T1 e T2, foi observado que houve uma resposta coincidente com o teste de toxicidade aguda, ou seja, uma melhor resposta para as associações de 15 e 25 % de TF + solo. Em ambos os bioensaios realizados (massa corpórea e teste de toxicidade) houve uma melhor resposta para essas duas concentrações de TF, após o período de biodegradação de 6 meses. Desta forma, sugere-se que, para que a TF possa ser utilizada como fertilizante, ela deve passar por um processo de biodegradação de, pelo menos, 6 meses, e que esta seja associada a solo, em concentrações de 15 a 25 %. Esses cuidados poderão evitar possíveis impactos à biota exposta a este composto e possíveis comprometimentos na produtividade da cultura onde for aplicada. No entanto, mais estudos devem ser realizados, tanto com outros organismos como para avaliação de outros *endpoints*, para se ter uma real compreensão dos efeitos da TF para os solos e para os organismos e, assim, poder tomar decisões adequadas sobre seu uso na agricultura.

5 BIBLIOGRAFIA

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14283:1999 - Resíduos em solos: Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Rio de Janeiro: ABNT, 1999. 8 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15537:2007 - Ecotoxicologia terrestre: Ecotoxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas. Rio de Janeiro: ABNT, 2007. 11 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NM ISO 3310-1:2010 - Peneiras de ensaio: Requisitos técnicos e verificação. Parte 1: Peneiras de ensaio com tela de tecido metálico. Rio de Janeiro: ABNT, 2010. 12 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS ABNT NBR ISO 17512-1:2011, Qualidade do Solo — Ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento - Parte 1: Ensaio com minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*). Rio de Janeiro: ABNT, 2011, p.26

ANDRÉA, M. M. Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos. São Paulo: Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental, 2008. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=83>. Acesso em: 20 nov. 2013.

ARNAUD, C., SAINT-DENIS, M., NARBONNE, J.F., SOLER, P., RIBERA, D. Influences of different standardised test methods on biochemical responses in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p. 67-73, 2000;

ALMEIDA JÚNIOR, A. B. Adubação orgânica em cana-de-açúcar: efeitos no solo e na planta. 2010. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

ALMEIDA JÚNIOR, A.B.; NASCIMENTO, C.W.A.; SOBRAL, M.F.; SILVA, F.B.V.; GOMES, W.A. Fertilidade do solo e absorção de nutrientes em cana-de-açúcar fertilizada com torta de filtro. **R. Bras. Eng. Agric. Ambiental**, v.5, p. 1004-1013, 2011.

AMORIM, M.J.B., RÖMBKE, J., SOARES, A.M.V.M. Avoidance behavior of *Enchytraeus albidus*: effects of Benomyl, Carbendazim, Phenmedipham and different soil types. **Chemosphere** 59, 501–510, 2005;

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a Flask and Method for Measuring the Persistence and Biological Effects of Pesticides in Soil. *Soil Science*, v. 100, n. 1, p. 68–70, 1965.

CAMARGO, J.A., PEREIRA, N., CABELLO, P.R., TERAN, F.J.C., Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para a análise da atividade microbiana de solos sob a aplicação de vinhaça. *Engenharia Ambiental* 6, 264–271, 2009

CASARINI, D.C.P; DIAS, C.L.; LEMOS, M.M.G. Relatório de estabelecimentos de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. São Paulo: CETESB, 2001. 71p. 2001.

CARDOZO, C. O. N.; BENEDINI, M. S.; PENNA, M. J. Viabilidade técnica do uso do composto no plantio comercial de cana-de-açúcar. São Paulo: Coopersucar, 1988, p. 13-17. (Boletim Técnico 41/88).

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. L6.401 - Solo – Teste de toxicidade com *Eisenia foetida* (minhoca). São Paulo. CETESB, 1990. 13p.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar: Safra 2013/2014, primeiro levantamento. Brasília: 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_12_10_34_43_boletim_cana_portugues_10_2013.pdf>. Acesso em: 20 nov. de 2013.

CONEGLIAN, C. M. R.; SIVIERO, A. R.; POLETTI E. C.C.; VENDEMIATI J. A. S.; DRAGONI, G. S.; RIBEIRO, M. S.; ANGELIS, D. F.; FURLAN, L.T.; GONÇALVES, R. A. Evaluation Of Biodegradation In The Soil Of Oil Residues From A Petroleum Refinery. *HOLOS Environment*, v.6 n.2 - p.106-117, 2006

CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. *Revista Brasileira de Energia*, v. 2, n. 2, p. 1-17, 1992.

DABRIO, M.; RODRIGUEZ, A.R.; BORDIN, G.; BEBIANNO, M.J.; DE LEYM M.; SESTAKOVA, I.; VASAK, M.; NORDBERG, M. Recent developments in quantification methods for metallothionein. *J. Inorg. Biochem.* V. 88, p. 123-134, 2002.

DE SILVA P.M.C.S., VAN GESTEL C.A.M. Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. **Chemosphere** 77 (2009) 1609–1613 (2009);

DELGADO, A. A.; FERREIRA, L. J.; BARBIN, D. Estudos sobre o comportamento do fósforo na clarificação do caldo de cana. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, v.82, n.1, p.55-75, jul. 1973.

DOMÍNGUEZ, J.; VELANDO, A.; FERREIRO, A. Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species? *Pedobiologia*, v. 49, n. 1, p. 81- 87, 2005

EGITO, L. C. M.; MEDEIROS, M. DAS G.; MEDEIROS, S. R. B. DE; AGNEZ-LIMA, L. F. Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, n. 2, p. 435– 441, 2007.

EMBRAPA. Impacto Ambiental da cana-de-açúcar. Campinas: 2013. Disponível em: < <http://www.cana.cnpm.embrapa.br/setor.html>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

FIRME, L. P. Cinética de degradação microbiológica de torta de filtro no solo na presença de cádmio e níquel. 2005. 72f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2005.

FOURIE, F.; REINECKE, S.A.; REINECKE, A.J. The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using comet assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 67, p. 361-368, 2007.

FRAVET, P. R. F.; SOARES, R. A. B.; LANA, R. M. Q.; LANA, Â. M. Q.; KORNDÖRFER, G. H. Efeito de doses de torta de filtro e modo de aplicação sobre a produtividade e qualidade tecnológica da soqueira de cana-de-açúcar. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 34, n. 3, p. 618–624, 2010.

GUARNIERI, L. C.; JANUZZI, G. M. Proálcool: Impactos ambientais. *Revista Brasileira de Energia*. v. 2, n. 2, p. 6-10, 1992.

GUPTA, N.; TRIPATHI, S.; BALOMAJUMDER, C. Characterization of pressmud: A sugar industry waste. *Fuel*, v. 90, n. 1, p. 389–394, 2011.

GURGEL, L.V.A., FREITAS, R.P., GIL, L.F., 2008. Adsorption of Cu (II), Cd (II), and Pb (II) from aqueous single metal solutions by sugarcane bagasse and mercerized sugarcane bagasse chemically modified with succinic anhydride. *Carbohydrate Polymers* 74, 922–929.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, v. 11, n. 7, p. 714–719, 1977

HOMA, J.; OLCZAK, E.; STURZENBAUM, S.R.; MORGAN, A.J.; PLYTYCZ, B. Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions. *Environ. Pollut.* 135, 275-280, 2005.

KAAKINEN J., VÄHÄÖJA P., KUOKKANEN T. E ROPPOLA K. Studies on the Effects of Certain Soil Properties on the Biodegradation of Oils Determined by the Manometric Respirometric Method. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, v. 2007, p.34601, 2007

KORNDORFER, G. H.; ANDERSON, D. L. Use and impact of sugar-alcohol residues vinasse and filter on sugarcane production in Brazil. *Sugar y Azucar*, v. 3, n. 92, p. 26-35, 1997;

KLOBUCAR, G. I. V; PAVLICA, M.; ERBEN, R.; PAPES, D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic toxicology*, v. 64, n. 1, p. 15–23, 2003.

LI, M., LIU, Z., XU, Y., CUI, Y., LI, D., KONG, Z., 2009. Comparative effects of Cd and Pb on biochemical response and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Chemosphere* 74, 621–625.

LOUREIRO, S.; SOARES, A.M.V.M.; NOGUEIRA, A. J.A. Terrestrial avoidance behavior tests as screening tool to assess soil contamination. *Environmental Pollution*, 138, 121-131, 2005.

MAZZEO D.E.C., Avaliação da viabilidade do lodo de esgoto como condicionante de solos agrícolas, após processo de atenuação natural, por meio de diferentes bioensaios - Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2013;

MEUNCHANG, S.; PANICHSAKPATANA, S.; WEAVER, R. W. Co-composting of filter cake and bagasse; by-products from a sugar mill. *Bioresource Technology*, v. 96, n. 4, p. 437–442, 2005;

MORGAN, A.J.; MORRIS, B. The accumulation and intracellular compartmentation of cadmium, lead, zinc and calcium in two earthworm species (*Dendrobaena rubida* and *Lumbricus rubellus*) living in highly contaminated soil. *Histochemistry*, v.75, p.269-285, 1982.

NARDIN, R. R. Torta-de-filtro aplicada em argissolo e seus efeitos agronômicos em duas variedades de cana-de-açúcar colhidas em duas épocas. 2007. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2007.

NUNES JÚNIOR, D. O insumo torta de filtro. Ribeirão Preto: IDEA News, 2005. PORTAL MATO GROSSO. Disponível em: <<http://www.mtseusmunicipios.com.br/NG/conteudo.php?sid=167&cid=841>>. Acesso em 25 fev. 2013.

OWOJORI, O.J., REINECKE, A.J. Avoidance behaviour of two eco-physiologically different earthworms (*Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*) in natural and artificial saline soils. *Chemosphere*, v.75, p.279-283, 2009

PAPANIKOLAOU, G.; PANTAPOULOS, K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 201, p.199-211, 2005.

PARTHA, N.; SIVASUBRAMANIAN, V. Recovery of chemicals from pressmud – A sugar industry waste. *Indian Chem Engr Section A*, v. 48, n. 3, p. 160 – 163, 2006.

SINGH, A., SHARMA, S. Composting of a crop residue through treatment with micro-organisms and subsequent vermicomposting. **Bioresour. Technol.** 85, 107–111, 2002;

SOUSA, A.; PEREIRA, R.; ANTUNES, S.C.; CACHADA, A.; PEREIRA, E.; DUARTE, A.C.; GONÇALVES, F. Validation of avoidance assays for the screening assessment of soils under different anthropogenic disturbances **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.71, i. 3, p.661-670, 2008

RASUL, M. G.; RUDOLPH, V.; CARSKY, M. Physical properties of bagasse. *Fuel*, v. 78, n. 8, p. 905–910, 1999.

RASUL, G.; KHAN, K.S.; MÜLLER, T.; JOERGENSEN, R.G. Soil-microbial response to sugarcane filter cake and biogenic waste compost. *J.Plant Nutr. Soil Sci.*, v.171, p.355-360, 2008

REINECKE, A.J.; REINECKE, S.A. The influence of heavy metals on the growth and reproduction of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaera). *Pedobiologia*, 40, p. 439-448, 1996.

REINECKE, S.A.; PRINSLOO, M.W.; REINECKE, A.J. Resistance of *Eisenia fetida* (Oligochaeta) to cadmium after long-term exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 42, 75-80, 1999.

REINECKE, A.J.; MABOERA, M.S.; VERMEULEN, L.A.; REINECKE, S.A. Assessment of lead nitrate and mancozeb toxicity in earthworms using the avoidance response. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 68, p.779-786, 2002

ROTH, B. G. The Effects Of Filter Cake On Soil Fertility And Yield Of Sugarcane. *Proceedings of The South African Sugar Technologists*. Junho, 1971.

RUPPERT, E. E.; BARNER, R. D. Zoologia dos Invertebrados. 6. ed. São Paulo: Roca. p. 1129, 1996

SIVIERO, A. R. Avaliação da biodegradação em solo de resíduos sólidos de fundição - areia fenólica - utilizando o método respirométrico. 1999. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1999.

SIEKIERSKA, E. Cadmium effect on the structure of supra-subpharyngeal ganglia and the neurosecretory processes in earthworm *Dendrobaena veneta* (Rosa). *Environ. Pollut.*, 126, 21-28, 2003;

SPURGEON, D.J., HOPKIN, S.P., JONES, D.T. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. **Environmental Pollution**, v.84, p.123-130, 1994;

VAN GESTEL CAM., W.A. VAN DIS, E.M. VAN BREERNEN AND P.M. SPARENBURG Development of a standardised reproduction toxicity test with the earthworm species *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* using copper, pentachlorophenol and 2,4 dichloroaniline. **Ecotox. Environ. Saf** 18, 305-312, 1989

UDOVIC D., LESTAN D. *Eisenia fetida* avoidance behavior as tool for assessing the efficiency of remediation of Pb, Zn and Cd polluted soil. **Environmental Pollution**, v.158, i.8, p. 2766-2772, 2010;

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 6010c - Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry. Alexandria: USEPA, 2007. 6000 Series Methods. 64 p;

VÄHÄOJA P, Roppola K., VÄLIMÄKI I e KUOKKANEN T., “Studies of biodegradability of certain oils in forest soil as determined by the respirometric BOD OxiTop method,” *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, vol. 85, no. 14, p. 1065–1073, 2004

VÄHÄOJA P, KUOKKANEN T., VÄLIMÄKI I., VUOTI S. E PERÄMÄKI P. “Biodegradabilities of some chain oils in groundwa-ter as determined by the respirometric BOD OxiTop method,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 381, no. 2, p. 445–450, 2005.

VIJVER, M.G., VINK, J.P.M., MIERMANS, C.J.H., VAN GESTEL, C.A.M. Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. *Soil Biol. Biochem.* 35, 125–132, 2003

Van GESTEL, C.A.M., DIRVEN-Van BREEMEN, E.M., BAERSELMAN, R., Emans, H.J.B., JANSSEN, J.A.M., POSTUMA, R., Van VLIET, P.J.M. Comparison of sublethal and lethal criteria for nine different chemicals in standardized toxicity tests using the earthworm *Eisenia andrei* **Ecotoxicology And Environmental Safety** v.23, p.206-220, 1992

Van VLIET P.C.J., van der ZEE S.E.A.T.M, MA W.C., Heavy metal concentrations in soil and earthworms in a flood plain grassland, **Environ. Pollut.** V.138, p.505-516, 2005;

ZHOU, S.P.; DUAN, C.Q.; FU, H.; CHEN, Y.H.; WANG, X.H.; YU, Z.F. Toxicity assessment for chlorpyrifos-contaminated soil with three different earthworm test methods. **Journal of Environmental Sciences**, v.19, p.854-858, 2007.

ZHOU, X., SUN, H., ELLEN, T.P., CHEN, H., COSTA, M., 2008. Arsenite alters global histone methylation. *Carcinogenesis*, 2008

ZHOU, CHUI-FAN, WANG, YU-JUN, LI, CHENG-CHENG, SUN, RUI-JUAN, YU, YUAN-CHUN, ZHOU, DONG-MEI Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*) **Environmental Pollution**, v.180, p.71-77, 2013

5.2 Artigo II

EFEITOS ECOTOXICOGENÉTICOS DE DOIS RESÍDUOS DA INDÚSTRIA SULCROALCOOLEIRA, USADOS COMO FERTILIZANTE AGRÍCOLA, SOBRE O ORGANISMO TESTE *Allium cepa*.

Leonardo Ramos Anacleto¹, Matheus Mantuanelli Roberto¹ e Maria A. Marin-Morales¹

¹ Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Avenida 24 A, 1515, CP 199, 13506-900 Rio Claro, SP, Brasil.

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas agrícolas do mundo, usada tanto para produção de açúcar como de etanol, que é cultivada, principalmente, nos países tropicais. No Brasil, esta cultura está entre as mais rentáveis, contribuindo com 3,4 % do produto interno bruto (PIB), com uma produção que ultrapassa os 659,850 milhões de toneladas processadas. Para toda essa produção, contudo, há a necessidade de uma grande área de cultivo, o que pode afetar, de várias formas, o meio ambiente. Entre os principais impactos desta produção está a alta geração de resíduos, dentre eles a Torta de Filtro (TF), a vinhaça e o Bagaço de Cana-de-Açúcar (BCA). A TF é um resíduo produzido em larga escala, que possui altas taxas de matéria orgânica e variados micronutrientes, usada, hoje, como substituto de adubos químicos. Existem vários estudos comprovando o potencial deste resíduo como adubo natural, mas não há estudos que avaliem a sua influência sobre a biota endêmica do local onde ele é aplicado. Dentre os componentes da TF, estão alguns metais que têm efeitos reconhecidamente biotóxicos. Devido a esta problemática, este estudo avaliou, por meio de ensaios com o organismo teste *Allium cepa*, os efeitos ecotoxicogenéticos da TF, pura e em associações com solo e com BCA. Para estes testes foram utilizadas 7 associações de TF + solo e 6 associações de TF + solo + BCA, testadas em 3 diferentes tempos: inicial (T0); 3 meses de biodegradação (T1); e 6 meses de biodegradação (T2). Os ensaios foram realizados diretamente em substratos sólidos dessas associações e nos extratos aquosos das mesmas. Foram avaliados os índices de citotoxicidade (pelos índices mitóticos-IM e de morte celular), de genotoxicidade (pelo teste de aberrações cromossômicas-AC) e de mutagenicidade (pelos teste do micronúcleo-MN, e de quebras cromossômicas). As associações com as concentrações mais elevadas de TF induziram AC e diminuição do IM, além de potencial mutagênico para a concentração de 75 % de TF+solo+BCA. As amostras do T1 apresentaram potencial citotóxico maior do que as do T0. Para as amostras de T2, as associações de TF + solo + BCA não mostraram nenhum efeito tóxico. Os resultados indicam que o tempo de biodegradação de 6 meses foi suficiente para atenuar os efeitos toxicogenéticos induzidos pelas maiores concentrações da TF.

Palavra-chave: citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, aberrações cromossômicas.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas do mundo, devido à produção de etanol e de açúcar. O Brasil, conhecido mundialmente pelo seu potencial agrícola, tem como um dos seus principais cultivos a cana-de-açúcar, cuja produção de etanol e açúcar compreende 3,5% do produto interno bruto (PIB) nacional (FRAVET, 2010). Para a safra de cana-de-açúcar de 2013/14, estima-se que sejam utilizados, aproximadamente, 8.810,79 mil hectares, que corresponderá a uma produção de 659,850 milhões de toneladas da cultura (CONAB, 2013).

A vinhaça, o BCA e a TF apresentam altos índices de matéria orgânica e vários tipos de nutrientes em sua composição, o que permitem que sejam reutilizados no campo como fertilizantes (subprodutos do álcool e do açúcar). Estes subprodutos conferem uma reposição dos nutrientes no solo, além de melhorar a aeração e fornecer as características necessárias para melhorar o crescimento da cultura (PAHTA et al. 2006).

A TF, resíduo gerado durante o processo de clarificação do caldo de cana, é um dos principais subprodutos utilizados na cultura da cana-de-açúcar. São gerados cerca de 30 a 40 kg de TF para cada tonelada de cana-de-açúcar processada, podendo chegar à 26 milhões de toneladas geradas na safra de 2013/2014 (CONAB, 2013). Além das suas qualidades nutricionais para o solo, a TF pode conter alguns metais com potencial tóxico, como zinco, cobre, cádmio, cromo, níquel e outros (GUPTA, TRIPATHI e BALOMAJUMDER, 2011).

Ensaio realizados com vegetais superiores são eficazes na avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de diversas substâncias químicas (RANK et al., 2002). Dentre estes vegetais, a espécie *Allium cepa* tem sido considerada um eficiente organismo-teste para estudos dos mecanismos básicos de ação de contaminantes ambientais (FISKEJÖ, 1985; BUSITRA ATEEQ et al., 2002; FERNANDES et al., 2007; 2009), bem como para a comprovação da efetividade do processo de biodegradação (MAILA; CLOETE, 2005; MAZZEO et al., 2011), sendo rotineiramente, utilizada para a avaliação da poluição ambiental (FERNANDES, 2007; HOSHINA e MARIN-MORALES, 2009; LEME, DE ANGELIS e MARIN-MORALES, 2008; LEME e MARIN-MORALES, 2009; SOUZA et al., 2009; SRIVASTAVA; MISHRA, 2009; MAZZEO, FERNANDES e MARIN-MORALES, 2011; VENTURA-CAMARGO et al., 2011; BIANCHI, ESPINDOLA e MARIN-MORALES, 2011; HERRERO et al., 2012).

Este organismo tem como características principais a sua cinética de proliferação, o crescimento rápido de suas raízes, o grande número de células em divisão, sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, sua disponibilidade durante o ano todo, seu fácil manuseio, cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho (QUINZANI-JORDÃO, 1987; RANK; NIELSEN, 1998; PATRA; SHARMA, 2002; MATSUMOTO et al., 2006), além de serem facilmente corados e observados em microscopia de luz (KURÁS et al., 2006), características essas essenciais para um bioindicar de toxicidade genética. Assim, essa espécie é considerada um importante organismo-teste para avaliações ambientais, por responder adequadamente a ação de muitos agentes genotóxicos/mutagênicos conhecidos (EVSEEVA et al., 2003).

A determinação da frequência de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos (MN), durante a mitose em células meristemáticas de *A. cepa*, consiste em um método fácil para se determinar os mecanismos de ação de diversos compostos genotóxicos e mutagênicos (LEME e MARIN-MORALES, 2009; MAZZEO, FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011), inclusive para se determinar o impacto sofridos pelos ambientes aquáticos (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; LEME, ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008) e terrestres (SOUZA et al., 2009; 2013).

Devido à indicação da presença de compostos tóxicos na TF e à falta de informações sobre os efeitos toxicológicos deste resíduo agroindustrial, há a necessidade de se entender, detalhadamente, a composição química e as propriedades físico-químicas da TF, além de avaliar o potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico deste composto, para se determinar o nível de influência que esse subproduto da cana-de-açúcar pode induzir em sistemas biológicos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Biológico

Neste estudo foram utilizadas sementes de *A. cepa* ($2n = 16$ cromossomos), de um mesmo lote e mesma variedade (baia periforme).

2.2 Compostos avaliados

Foram avaliados neste trabalho dois resíduos agroindustriais, a torta de filtro (TF) e o bagaço de cana-de-açúcar (BCA), ambos derivados do processamento da cana-de-açúcar, para produção de álcool e açúcar. Esses resíduos foram gentilmente fornecidos por uma empresa sucroalcooleira da cidade de General Salgado-SP, Brasil.

2.3 Preparação das amostras

A TF foi peneirada em uma mesa agitadora, com peneira de granulometria de 2 mm, conforme exige a Norma ABNT NBR NM ISO 3310-1:2010.

Para o preparo do solo, foi necessário estimar, primeiramente, o seu peso seco. Para isso, foram pesados 10 g do substrato, antes e após a secagem em estufa com temperatura aproximada de 105°C. O cálculo do peso seco do substrato foi realizado conforme ABNT (2007), sendo utilizada a fórmula:

Equação 1 - Cálculo da umidade inicial do solo controle e das associações de TF

$$Umidade\ Inicial\ (\%) = \frac{(Peso\ úmido - Peso\ seco)}{Peso\ Seco} \times 100$$

Para o cálculo da capacidade de retenção de água, foram pesados 250 g de TF, que foram dispostos em um funil coberto com papel de filtro. Em seguida, foram adicionados 500 mL de água destilada sobre este funil e sobre um outro funil recoberto somente com papel de filtro, isto é, sem amostra. Após 12 horas de drenagem da água pelos funis, foram avaliados os volumes finais de água drenada para ambos os funis. Pela diferença de volume entre eles, foi calculada a quantidade de água que ficou retida no substrato. O mesmo foi realizado para o solo controle.

Para que as amostras pudessem ser preparadas e avaliadas, quanto a sua biodegradação, houve a necessidade de ajustar a umidade da TF (que estava em torno de 27%) e do solo controle (que estava em torno de 18%). Para o cálculo da umidade final foi feita a média da umidade da TF e do solo, para que o valor da umidade final fosse corrigido para 65%, com a adição de água, conforme a norma NBR 15537 (2007), apresentada na tabela 1.

Tabela 1 -Ajuste do teor de umidade das várias concentrações utilizadas no teste

Método Baseado na NBR 15537 (2007)	
Massa úmida substrato1 (g)	750
Teor de umidade (%)	65
Volume água calculado (mL)	150
Massa seca do substrato (g)	600
Consistência final	Pastosa

Obs. 1 - Massa úmida recomenda pela ABNT (2007).

Fonte: Adaptado de ABNT NBR 15537 (2007).

Após o cálculo para correção da umidade, foi determinado o volume de 150 mL de água e 600 g de massa total do substrato seco, totalizando 750 g de massa úmida final.

O pH do substrato, que variou de 6,0 a 7,5, foi medido em uma mistura de substrato e água destilada (na proporção de 1:5, respectivamente), previamente homogeneizada por agitação de 12 horas, seguida de repouso de mais 12 horas.

O solo usado como controle foi coletado no jardim experimental do IB/Unesp – Campus de Rio Claro, por ser considerado isento de contaminantes (MAZZEO, 2013).

Foram preparadas 13 diferentes associações entre TF, solo e BCA, conforme descrito na tabela 2

Tabela 2 - *Proporção de TF/solo/BCA, para o preparo das diferentes concentrações*

Concentração em TF	TF (Kg)	Solo (Kg)	BCA (Kg)	Massa total (Kg)
0%	0	8	0	8
5%	0,4	7,6	0	8
10%	0,8	7,2	0	8
25%	2	6	0	8
50%	4	4	0	8
75%	6	2	0	8
100%	8	0	0	8
0%	0	7,6	0,4	8
5%	0,4	7,2	0,4	8
10%	0,8	6,8	0,4	8
25%	2	5,6	0,4	8
50%	4	3,6	0,4	8
75%	6	1,6	0,4	8

TF= Torta de Filtro; BCA=Bagaço de cana-de-açúcar

Para a realização dos testes, as associações foram preparadas de acordo com a Norma ABNT NBR NM ISO 3310-1:2010. O material foi processado e peneirado, e a capacidade de campo, umidade e retenção de água foram calculadas. O solo utilizado foi obtido no Jardim Experimental da UNESP – Campus Rio Claro/SP, onde o mesmo é conhecido por não apresentar contaminação antrópica (MAZZEO, 2013).

Ainda, para cada tempo de tratamento (T1, T2 e T3) foram preparados solubilizados a partir das associações, preparadas de acordo com a norma ABNT NBR 15628-2011. Para a preparação do material solubilizado, foram pesados 250 g (peso seco) de cada associação que, posteriormente, foram misturados a 1 L de água ultrapura, em um béquer com capacidade de 2 L. Estas misturas foram mantidas em estufa com temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, por 7 dias. Decorrido este período, as associações foram filtradas com membrana de $0,45 \mu\text{m}$ de porosidade, para obtenção do solubilizado isolado.

2.4 Ensaio de *Allium cepa*

Para a realização dos ensaios com o organismo teste *A. cepa*, foram utilizadas placas de Petri forradas com papel filtro, onde foram acondicionadas, individualmente, amostra de substratos sólidos das diferentes associações ou dos diferentes solubilizados, provenientes dos 3 tempos de biodegradação. Foram dispostas sobre este material sementes de cebola, que foram levadas para germinar em incubadora, sob temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Concomitantemente aos tratamentos, foi realizado o controle negativo (CN) com água ultrapura e o controle positivo (CP), com metilmetano sulfonato (MMS - Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3), na concentração de 10 mg/L (ensaio de clatogenicidade), e com o herbicida comercial Trifluralina, na concentração de 0,84 g/L (ensaio de aneugenicidade). Quando as raízes atingiram 1,5 cm de comprimento (cerca de 5 dias após o início do ensaio), metade delas foi coletada e fixada em Carnoy (3:1 – etanol/ácido acético), enquanto o restante foi transferido para outras placas de Petri, contendo apenas água ultrapura, para um período de recuperação de 48 horas.

Para a confecção das lâminas, as raízes fixadas passaram por hidrólise ácida com HCl a 1N, por 10 minutos a 60°C e, posteriormente, pela reação de Feulgen, com o reativo de Schiff, por 2 horas. Posteriormente, as regiões meristemáticas das raízes de *A. cepa* foram seccionadas em lâmina, recobertas com lamínulas e, cuidadosamente, esmagadas em uma gota de solução de carmim acético a 2%, para contracorar as células. As lamínulas foram removidas, posteriormente, em nitrogênio líquido e, as lâminas, depois de secas, foram montadas em resina sintética (Entellan®).

Para a análise das AC, foram considerados diferentes tipos de anormalidades (perdas, fragmentos, pontes, atrasos cromossômicos, entre outros) nas diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase, telófase). No entanto, para esta avaliação, as diferentes aberrações foram reunidas em um só grupo, considerado como endpoint de genotoxicidade. Para avaliar os efeitos mutagênicos, foram contabilizadas células portadoras de MN ou de quebras cromossômicas. O índice mitótico (IM), relacionado com o número de células em divisão e a frequências de células em processo de morte celular (citoplasma e/ou núcleo vacuolizado, núcleo heteropicnótico, entre outros), serviram como critério de avaliação de citotoxicidade, constituindo um terceiro parâmetro de avaliação. A análise foi realizada pela contagem de 5.000 células por tratamento, 500 células por lâmina, compreendendo um total de 10 lâminas analisadas. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, aceitando a probabilidade de 0,05 para mostrar um efeito significativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra de TF foi analisada quimicamente pela empresa Analytical Technologies/SP e os resultados estão expressos na tabela 3, tendo como base a norma de referência USEPA 6010C (2007).

Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos obtidos no tempo 0 (início da biodegradação e no tempo 2 (seis meses de biodegradação), em comparação com os valores orientadores da normativa da Decisão de Diretoria da CETESB, N° 195-2005-E

Parâmetros	TORTA DE FILTRO (mg/kg)		VALORES ORIENTADORES (CETESB) (mg/kg)		
	Análise Inicial (T0)	Análise final(T2)	Ref.	Prev.	Interv.
Cd	< 2,55	< 1,29	<0,5	1.3	3
Co	< 3,83	< 1,93	13	25	35
Cr	30,6	18,3	40	75	150
Ni	< 5,10	< 2,58	13	30	70
Pb	< 5,10	< 2,58	17	72	180
Zi	177,2	43,1	60	300	450
Cu	51,3	22,2	35	60	200
Fe	8910,7	11743,6	-	-	-
K	4517,9	1239,4	-	-	-
P	2107,4	686,0	-	-	-
Mg	1369,9	362,8	-	-	-
Na	62	47,8	-	-	-
COT	88,6*	3,62*	-	-	-
N	6122,4	330,35	-	-	-

T0: tempo inicial de biodegradação; T2: após seis meses de biodegradação;

O pH das amostras foi aferido de acordo com a norma 9040C da USEPA, sendo obtido valores de 5,55 e 4,74 para a amostras inicial e final, respectivamente. Como o pH do solo influencia na disponibilidade dos micronutrientes para as plantas, é importante manter o valor de pH dentro da faixa ideal para o solo correspondente. De acordo com Schimitz et al. (2002), o pH ideal varia de acordo com o tipo do solo: solo de base mineral deve ter pH entre 6 e 7 e solo de base orgânica deve ser entre 5.2 e 5.5. Sendo assim, a introdução de TF no solo levou a valores de pH considerados de normal a baixos, o que pode indicar que a introdução de TF em solos agricultáveis pode conferir acidez ao sistema edáfico, o que pode, inclusive, tornar necessária uma correção de pH pelo processo de calagem.

Após 6 meses de biodegradação, houve uma diminuição dos compostos químicos analisados, exceto para o Fe, que aumentou. Como padrão para comparação de valores, foram utilizadas as quantidades de metais presentes no solo, com os limites estabelecidos pela normativa da CETESB, N° 195-2005-E, que estabelece valores de referência de qualidade (VRQ), valores de prevenção (VP) e valores de intervenção (VI). VP serve como referência para disciplinar a introdução de substâncias no solo e, se ultrapassado,

deve ser realizado um monitoramento da qualidade deste solo. Sendo assim, observa-se que nenhum valor obtido na análise química, antes e depois da biodegradação, supera o VP pré-estabelecido pela CETESB. A partir dos dados obtidos nas análises química, acredita-se que a TF possa ser utilizada na agricultura, desde que os valores de micronutrientes sejam monitorados constantemente, conjuntamente com a própria constituição química do solo, a fim de se evitar efeitos tóxicos às plantas e aos outros organismos presentes.

Após a realização dos bioensaios, foram obtidos os resultados de aberrações cromossômicas (AC – critério de genotoxicidade), os de micronúcleos (MN) e quebras cromossômicas (critério de mutagenicidade), os de morte celular (critério de citotoxicidade), além de serem calculados os índices mitóticos (I.M. – critério de citotoxicidade). Os resultados obtidos com *A. cepa* nas diferentes associações de substratos sólido, antes da biodegradação, no tempo 0, estão apresentados na tabela 4. Nesta tabela 4 também é possível verificar os resultados do ensaio de recuperação e dos ensaios realizados com o material solubilizado.

Observa-se que, em relação à citotoxicidade, o controle do solo (CS) e o controle do bagaço de cana-de-açúcar (CBCA) interferiram significativamente na frequência de células em divisão celular, ambos inibindo o índice mitótico das células meristemáticas. Esse efeito foi verificado para as exposições realizadas nas associações das amostras em substratos sólidos, nos solubilizado e nos ensaio de recuperação, exceto para o CBCA. Apesar da inibição causada, nenhum destes controles (CS e CBCA) foi capaz de induzir morte celular em quantidades significativas. Também foi verificada diferença significativa de morte celular para a amostra de 75 % TF, em seu estado solubilizado. Provavelmente, nesta associação, houve uma maior extração dos compostos presentes na TF, cujos compostos induziram a atividade citotóxica.

Houve inibição do índice mitótico para a associação dos substratos sólidos de 5 % TF e de 75 % TF. Porém, não foi observada essa inibição para as associações de 100 % TF, 50 % TF + BCA e 75 % TF + BCA neste mesmo tipo de substrato. Os IM também diminuíram, após o ensaio de recuperação e após a exposição das sementes ao material solubilizado. Provavelmente, nestas associações, existam contaminantes hidrossolúveis com atividade citotóxica ou inibidora de divisão celular. Uma das possíveis causas da diminuição do IM pode estar relacionada à presença de cobre na amostra, como observado nas análises químicas, pois, segundo as observações de Terzi (2009), a presença de sulfato de cobre no meio inibe o processo de divisão celular de meristemas de *A. cepa*. Neste

estudo o autor testou várias concentrações de sulfato de cobre (1-2 ppm) e notou uma relação inversamente proporcional entre a concentração deste composto e o índice mitótico. A inibição do crescimento radicular e o aparecimento de raízes atrofiadas indicaram o atraso de crescimento e, conseqüentemente, um potencial citotóxico. Dimitrova e Ivanova (2003) relataram que alguns metais inibem o crescimento das raízes de algumas espécies de plantas. Wierzbicka (2004) expôs raízes de *A. cepa* a várias concentrações de chumbo, por 48 horas, seguido por 72 horas de recuperação. Após as 48 horas de exposição ao chumbo, as radículas apresentaram inibição de divisão celular, porém esta foi normalizado após 72 horas de recuperação.

Dovgaliuk, Kaliniak e Blium (2001) compararam os efeitos de seis sais, formados pelos diferentes íons metálicos (Cd, Pb, Ni, Al, Cu e Zn), com base nas análises de células meristemáticas de cebola. Dentre os compostos investigados, o níquel apresentou uma forte atividade antimitótica, além de promover um aumento no percentual de atrasos cromossômicos, anáfases multipolares e C-metáfase, quando comparado com o teste controle. Estes mesmos efeitos foram também observados por outros autores (FISKESJÖ, 1981; FISKESJÖ, 1988; BORBOA; DE LA TORRE, 1996; STEINKELLNER et al, 1998; YI, WU e JIANG, 2007; MIGID, AZAB e IBRAHIM, 2007). Além disso, esses autores também mostraram uma relação dose-dependente, tanto para a indução de micronúcleos (MN) quanto para redução no índice mitótico (IM), demonstrando que o teste com *A. cepa* é sensível para detectar a genotoxicidade de compostos metálicos.

O CS e o CBCA não induziram AC nas células meristemáticas de *A. cepa*, não apresentando, assim, potencial genotóxico comprovado. Para as associações em substratos sólidos, nenhuma das associações induziu aberrações cromossômicas. O mesmo ocorreu para as amostras dos solubilizados. No entanto, após o ensaio de recuperação, as maiores concentrações de TF (100 % TF, 50 % TF + BCA e 75 % TF + BCA) induziram quantidades significativas de aberrações cromossômicas, quando comparadas ao CN. Estes resultados indicam que as amostra do substrato sólido possuem composto/substância com potencial genotóxico que, quando em concentrações altas, causam danos às células. Porém, esses compostos não são liberado pelo processo de solubilização, mas persistem na célula, agindo tardiamente nas mesmas.

Em relação ao potencial mutagênico, foi observado que os controles CS e CBCA são isentos de agentes indutores de micronúcleos e/ou quebras cromossômicas. Dos tratamentos realizados, apenas a associação em substrato sólido e o ensaio de recuperação

de 75 % TF, bem como o material solubilizado do 75 % TF + BCA tiveram resultados estatisticamente significativos, em relação ao CN.

O BCA tem característica adsorvente (Souza, Moraes Santos e Moraes Silva, 2009), podendo adsorver metais, como o chumbo e o níquel (SANTOS, FERRAREZI, DRAGUNSKI, 2008). Costa Barbosa e Garcia (2010) utilizaram o BCA em pó para adsorver metais de efluentes industriais, com o objetivo de descontaminar esse efluente. Os autores comprovaram o ótimo poder adsorvente do BCA para metais, solúveis ou como íons metálicos.

Dentre as associações testadas neste trabalho, observa-se que aquelas que continham as menores concentrações de TF, na presença ou não de BCA, não induziram efeitos adversos ao organismo-teste *A. cepa*. Deste modo, estas concentrações de TF, parecem ser viáveis para seres usadas como fonte de nutrientes, mesmo sem passar por processo de biodegradação.

Depois de 3 meses de biodegradação (T1), foi realizada uma nova etapa de experimentos, cujos resultados obtidos estão apresentados na tabela 5. Na tabela 5 é possível observar que o CS e o CBCA não induziram morte celular, mas, de modo geral, foram capazes de inibir a divisão celular. O CS apresentou inibição de IM para os três tipos de exposição (substrato sólido, solubilizado e recuperação), enquanto o CBCA apresentou inibição apenas para a amostra em substrato sólido e para o solubilizado, ou seja, o I.M. do ensaio de recuperação não sofreu alteração significativa. Nota-se que as substâncias potencialmente citotóxicas presentes no T0, nas amostras de CS e CBCA, não sofreram biodegradação depois de 3 meses e continuaram afetando o desenvolvimento da região meristemática das raízes de *A. cepa*.

Ainda em relação a quantidade de células em processo de morte, foram verificados resultados significativos apenas para a amostra de substrato sólido do 100 % TF e para o solubilizado e o ensaio de recuperação do 75 % TF + BCA.

Em relação ao I.M., observam-se diversos resultados significativos dentre as diferentes associações e tratamentos, quando comparados com o CN. As associações dos substratos sólidos de 5 % TF, 75 % TF, 5 % TF + BCA, 10 % TF + BCA e 50 % TF + BCA, o ensaio de recuperação de 25 % TF, 75 % TF, 10 % TF + BCA, 25 % TF + BCA e 50 % TF + BCA, e o solubilizado de 50 % TF, 75 % TF, 100 % TF, 5 % TF + BCA e 25 % TF + BCA foram capazes de induzir inibição do IM. Quando estes resultados (T1) foram comparados com aqueles obtidos antes do início da biodegradação (T0 – tabela 5), foi observado um maior potencial citotóxico para T1. Isto pode ser devido à presença de

substâncias citotóxicas, talvez subprodutos provenientes do processo de biodegradação, com capacidade de induzir morte celular, ou ainda, inibir sua divisão.

Uma das possíveis explicações para inibição do desenvolvimento dos meristemas pode estar ligada a biodegradação do BCA, pois ele tem o potencial de adsorver metais e, conforme a biodegradação ocorre, ele pode disponibilizá-los no meio ambiente. Outro fator, pode ser devido a biodegradação da lignina presente em todas as células vegetais, que gera compostos fenólicos que podem gerar compostos tóxicos (BUDZIAK, MAIA e MANGRICH, 2004; DE ANGELIS et al., 2005; BOLBOACĂA e JÄNTSCHIB, 2013).

Em relação ao critério de genotoxicidade, os controles CS e CBCA não apresentaram valores significativos, quando comparados ao CN, ou seja, aparentam ser compostos isentos de agentes indutores de AC. Quanto à exposição às diferentes associações, foram observados valores significativos apenas para o ensaio de recuperação de 25 % TF, 50 % TF + BCA e 75 % TF + BCA. Por ser observada quantidade significativa de AC apenas para esses tratamentos, podemos sugerir que algumas substâncias possam ter ficado retidas nas sementes e/ou nas raízes de *A. cepa*, que acabaram causando estes danos, pela persistência de ação. Provavelmente, estas substâncias precisem de um tempo maior de ação para afetar o organismo-teste, como ocorrido nos ensaios de recuperação por 48 horas.

Quanto ao potencial mutagênico, apenas o solubilizado da associação 75 % TF + BCA apresentou quantidade significativa de MN e/ou quebras cromossômicas. Por este resultado, infere-se que algumas substâncias possam ser diluída durante a solubilização e penetrar no meristema, provocando estas alterações. Na figura 1 estão dispostas algumas das alterações encontradas nas análises.

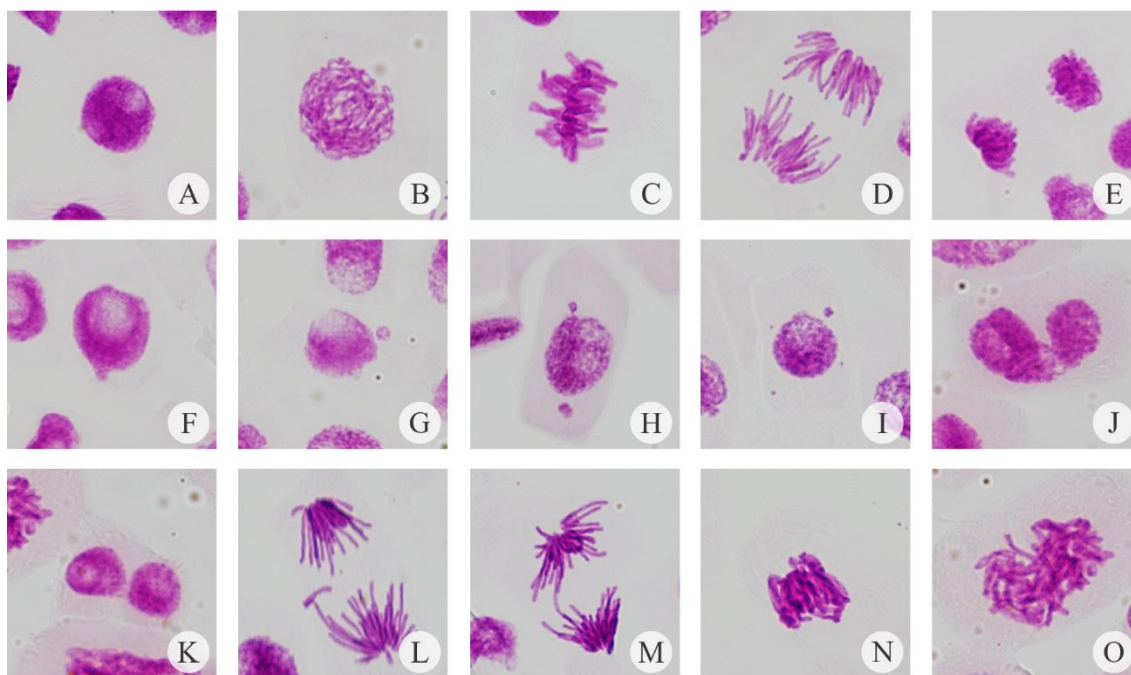


Figura 1 - Células meristemáticas de *Allium cepa*. A: Interfase normal; B: Prófase normal; C: Metáfase normal; D: Anáfase normal; E: Telófase normal; F: Interfase com broto; G: Interfase com MN; H: Prófase com broto e MN; I: Prófase com MN; J: Núcleo lobulado; K: Célula binucleada; L: Anáfase com quebra; M: Anáfase com ponte; N: Metáfase com aderência; O: Metáfase poliploide;

Além da possibilidade dos metais inibirem a divisão celular, eles também podem causar alterações cromossômicas específicas (FISKESJÖ, 1988). Majer et al. (2002) cita que a disponibilidade dos compostos presentes no solo depende do tipo de solo, referente à sua acidez, o que poderia levar a uma atividade genotóxica. Isso se deve ao fato de o pH influenciar a mobilidade dos íons metálicos, além de outros fatores como a distribuição do tamanho das partículas e o teor de carbono do solo. O zinco, por exemplo, é capaz de induzir alguns efeitos cito e genotóxicos, como demonstrado por Kumari et al. (2011), onde as nanopartículas de óxido de zinco induzem efeitos clastogênicos. Como as amostras estudadas apresentam um pH ácido e metais, a toxicidade encontrada pode estar relacionada com esses fatores.

Já o chumbo pode afetar o crescimento das radículas de diversas plantas consumidas pelo homem, inclusive a cebola, por se acumular nas células meristemáticas. Estudos realizados por Wierzbicka; Antosiewicz (1993) demonstraram que o chumbo inibiu o crescimento das raízes de 20 espécies vegetais diferentes, em uma taxa de 5 a 36 %. Pelo menos 96,6 % de chumbo assimilado pelas plantas estava preso nos meristemas radiculares, associado à parede celular ou armazenado em vacúolos, demonstrando que o

homem pode consumir chumbo que estava presente no solo e que fora acumulado nas plantas. No entanto, em um trabalho realizado por Wierzbicka (1999), o autor demonstrou que *A. cepa* é uma espécie com tolerância média a exposição chumbo, cujas células não morrem devido ao acúmulo deste metal.

Dentre os metais presentes na TF, o cádmio é o que mais apresenta características relacionadas ao aparecimento de AC e MN e inibição de crescimento radicular. O cádmio, por ter características químicas semelhantes ao Ca^{2+} e ao Zn^{2+} , entra em diversos processos químicos e biológicos, sendo capaz de alterar a homeostase de cálcio *in vivo*, mesmo em exposições ambientais pouco significativas (ŞAPLAĞOĞLU; İŞCAN, 1998). Liu et al. (2003) relataram diversos trabalhos que demonstram a variedade de alterações que o cádmio é capaz de provocar nos vegetais, devido à sua conhecida toxicidade e solubilidade em água. Esses autores ainda, demonstraram que a concentração e o tempo de exposição ao cádmio são fundamentais para alterar o crescimento e a integridade da raiz de *Allium sativum*. Enquanto as frequências de C-metáfases, pontes e quebras cromossômicas progrediram, conforme o aumento da concentração de cádmio, o IM decresceu na mesma proporção. O mesmo resultado foi obtido por Seth et al. (2008), ao avaliar a genotoxicidade do Cd sobre *A. cepa*. Estes autores relacionaram a instabilidade mitótica à ação do Cd sobre os fusos mitóticos, podendo inibir a divisão celular, além de induzir a formação de alguns tipos de AC. Ainda, estes mesmos autores sugerem que o Cd poderia danificar o DNA da célula, por via indireta, dada pela indução da formação de espécies reativas de oxigênio, causadores de estresse oxidativo. Ainda em seu estudo, Seth et al. (2008) demonstra que depois de 24 horas de recuperação, houve um declínio de todos os *endpoints*. Os autores relacionam essa redução a um processo de desintoxicação do vegetal, por meio da síntese vegetal de substâncias químicas capazes de quelar o metal tóxico presente nos vacúolos celulares.

O Cd, mesmo em baixas concentrações, pode levar a uma redução do crescimento da raiz, pela diminuição da atividade mitótica e da síntese de DNA, fatores estes diretamente relacionadas ao alongamento do ápice radicular. Unido a estas características, o Cd promove alterações nos microtúbulos ou nas proteínas associadas a ele, interferindo na integridade do citoesqueleto e, conseqüentemente, da célula (FUSCONI, GALLO, CAMUSSO, 2007).

Pela apresentação dos resultados obtidos, após um período de biodegradação (T1), observa-se que ainda as menores concentrações de TF seriam passíveis de serem aplicadas no campo, sem prejudicar a cultura e a biota local.

Após 6 meses de biodegradação das associações, foi realizada uma última etapa de exposições das sementes de *A. cepa* (T2) às amostras estudadas. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 6.

Quanto ao critério de citotoxicidade, foi possível observar, novamente, que o CS e o CBCA apresentaram indícios de morte celular e inibição de divisão celular. Apenas o CS, no ensaio de recuperação, foi capaz de induzir morte celular. Este efeito pode estar relacionado à persistência de alguma substância com característica citotóxica, que atuou somente após o período de recuperação.

Houve uma alteração significativa no I.M. após o ensaio de recuperação do CS e do CBCA, além de uma inibição também significativa provocada pelo solubilizado do CBCA. A partir destes resultados, e daqueles apresentados nas tabelas 4 e 5, evidencia-se que, tanto o CS quanto o CBCA possuem alguma propriedade ou algum componente que seja responsável por inibir a divisão celular no meristema radicular de *A. cepa*, reduzindo o I.M.

Pelos resultados obtidos, quanto à quantidade de AC, observa-se um potencial genotóxico para a associação bruta de 50 % TF e para o ensaio de recuperação da associação 100 % TF. Entretanto, os danos genotóxicos registrados não foram persistentes e fixados nas células, já que não foram observados valores significativos de MN para estas associações. A associação de 75 % TF, apesar de não ter apresentado nenhum resultado significativo de AC, foi o único tratamento que induziu a formação de MN e/ou quebras cromossômicas em quantidades significativas, tanto para a amostra em substrato sólido como para o solubilizado.

Estes resultados indicam que somente as menores concentrações de TF podem ser utilizadas na agricultura de maneira segura, pois mesmo com um período de biodegradação de 6 meses, semelhante ao que poderia ocorrer no campo, as associações de maiores concentrações de TF foram capazes de induzir AC e MN. Ainda, podemos sugerir que o BCA tenha tido uma participação importante no processo de redução dos compostos genotóxicos e mutagênicos da TF, por auxiliar na biodegradação deste resíduo. Nos tempos T0 e T1, as concentrações maiores de TF foram capazes de interagir com as células, danificando seu material genético, mesmo quando associadas ao BCA. Já no tempo T2, quando a TF foi associada ao solo e ao BCA, não foi observado esse prejuízo.

Visando avaliar a eficiência de biodegradação da TF pela biota do solo, foram comparados também os valores de AC, de MN, de morte celular e o I.M. das diferentes associações, em relação ao tempo de biodegradação.

A partir da tabela 4 é possível observar que as menores concentrações de TF (5 % TF, 10 % TF e 25 % TF) não induziram quaisquer efeitos prejudiciais ao organismo-teste *A. cepa*, tornando possível seu uso na agricultura.

O período de biodegradação de 6 meses (T2) demonstrou ser suficiente para atenuar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos induzidos pelas associações de substratos sólidos, preparados com as maiores concentrações da TF. Pode-se inferir também que o BCA auxiliou no processo de atenuação dos efeitos da TF, seja pela adsorção de possíveis substâncias tóxicas ou pela colaboração na biodegradação da TF, uma vez que nenhuma das associações formuladas com a TF e o BCA apresentou indução de danos genotóxicos e ou mutagênicos, em nenhum dos tempos testados.

Os resultados obtidos, após o ensaio de recuperação, em cada tempo avaliado, foram comparados e apresentados na tabela 9. Apesar das associações em substratos sólidos das maiores concentrações de TF não terem apresentado efeitos significativos de genotoxicidade e mutagenicidade (tabela 7), quando as raízes foram submetidas ao período de 48 horas de recuperação parece ter ocorrido um prejuízo na integridade das células meristemáticas. Provavelmente, existam substâncias na TF que necessitem de um maior tempo para induzir alterações nas células de *A. cepa*. Ainda, pode ter ocorrido que a água ultrapura, usada para a recuperação do sistema biológico, tenha provocado uma diluição das substâncias adsorvidas nas radículas, o que pode ter facilitado a penetração desta no meristema radicular. Tal efeito não foi observado para as menores concentrações de TF submetidas à biodegradação por 6 meses (T2), ou seja, o processo parece ter sido eficiente para a eliminação de substâncias que poderiam interagir com os organismos vivos.

Quanto aos experimentos realizados com o material solubilizado das amostras, observam-se efeitos danosos apenas para as maiores concentrações de TF, presentes principalmente em 75 % TF, 100 % TF e 75 % TF + BCA. Nas menores concentrações, não foram induzidos danos às células meristemáticas, independente do tempo de biodegradação das associações. Estes resultados indicam que as associações de menores concentrações de TF, na presença ou ausência de BCA, poderiam ser utilizadas em campo de maneira segura, pois seu material solubilizado ou lixiviado não prejudica o ecossistema. Sendo assim, imaginando uma situação de aplicação em campo, mesmo que

a amostra passe ou não por biodegradação e/ou sofra interferência de chuvas ou irrigações, não haveria comprometimento da biota local, pois seu lixiviado estaria isento de contaminantes.

Tabela 4: Média de alterações observadas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas aos diferentes tratamentos, no tempo 0.

	Ensaio	Controles			Associações					
		CN	CP-TRIF	CP-MMS	5%TF	10%TF	25%TF	50%TF	75%TF	100%TF
Gen,	AB	0,96 ± 0,79	13,20 ± 5,22*	6,89 ± 3,7*	2,39 ± 1,49	2,70 ± 1,73	3,63 ± 2,59	2,09 ± 1,21	3,3 ± 1,7	1,70 ± 0,88
	R	0,92 ± 0,76	9,45 ± 3,98*	5,22 ± 5,19*	2,08 ± 1,69	2,56 ± 1,41	1,67 ± 0,86	2,09 ± 1,18	2,56 ± 2,08	4,05 ± 1,91*
	S	0,96 ± 0,79	13,20 ± 5,22*	6,89 ± 3,70*	1,55 ± 1,26	2,07 ± 1,33	2,88 ± 1,61	2,02 ± 1,11	2,19 ± 1,57	3,30 ± 2,42
Mut,	AB	0,09 ± 0,27	5,78 ± 1,71*	15,36 ± 5,56*	0,40 ± 0,47	0,19 ± 0,41	2,13 ± 2,17	0,48 ± 1,2	2,33 ± 1,54*	0,09 ± 0,28
	R	0,00 ± 0,00	5,48 ± 1,58*	10,02 ± 3,91*	0,18 ± 0,37	0,35 ± 0,46	0,09 ± 0,30	0,50 ± 1,27	2,56 ± 1,81*	2,10 ± 2,07
	S	0,09 ± 0,27	5,78 ± 1,71*	15,36 ± 5,56*	0,47 ± 1,23	0,63 ± 0,73	0,56 ± 0,49	1,28 ± 0,64	0,93 ± 0,83	1,99 ± 1,92
Cit,	AB	0,00 ± 0,00	10,08 ± 6,51*	2,09 ± 4,05	1,29 ± 176	0,57 ± 1,81	1,42 ± 2,25	0,00 ± 0,00	1,10 ± 1,36	0,08 ± 0,26
	R	0,08 ± 0,26	7,35 ± 4,81*	3,35 ± 3,50	0,46 ± 0,67	1,65 ± 2,57	0,10 ± 0,32	0,00 ± 0,00	1,15 ± 1,41	0,00 ± 0,00
	S	0,00 ± 0,00	10,08 ± 6,51*	2,09 ± 4,05	0,00 ± 0,00	1,79 ± 3,59	1,15 ± 2,04	3,58 ± 5,26	6,02 ± 5,64*	1,41 ± 2,58
I,M,	AB	178,84 ± 48,31	135,46 ± 42,91	178,05 ± 70,38	109,05 ± 13,81*	114,95 ± 20,47	146,74 ± 57,08	151,88 ± 39,09	97,13 ± 13,39*	145,94 ± 29,33
	R	188,32 ± 32,19	26,26 ± 5,55	138,28 ± 35,23	120,46 ± 17,70	153,77 ± 49,01	147,07 ± 41,81	167,74 ± 37,10	176,73 ± 37,32	147,63 ± 53,63*
	S	178,84 ± 48,31	135,46 ± 42,91	178,05 ± 70,38	142,43 ± 24,48	137,88 ± 29,09	125,54 ± 39,03	126,24 ± 29,89	131,31 ± 18,69	97,88 ± 10,96*
	Ensaio	CS	CBCA							
				5%TF+BCA	10%TF+BCA	25%TF+BCA	50%TF+BCA	75%TF+BCA		
Gen,	AB	2,44 ± 2,21	3,54 ± 1,93		1,92 ± 2,87	1,69 ± 1,26	1,65 ± 1,69	2,5 ± 2,57	3,57 ± 2,61	
	R	2,67 ± 1,91	1,47 ± 1,62		1,10 ± 1,22	1,87 ± 1,27	1,33 ± 1,16	4,24 ± 1,79*	5,69 ± 4,32*	
	S	3,65 ± 1,91	1,44 ± 0,74		2,71 ± 2,78	2,10 ± 2,61	2,18 ± 1,26	2,94 ± 1,56	2,66 ± 1,06	
Mut,	AB	0,53 ± 0,74	0,69 ± 1,17		0,43 ± 0,72	0,48 ± 0,69	0,08 ± 0,24	0,5 ± 0,84	2,15 ± 2,12	
	R	0,18 ± 0,38	0,18 ± 0,58		0,29 ± 0,66	0,08 ± 0,26	0,08 ± 0,026	0,19 ± 0,41	0,17 ± 0,37	
	S	0,42 ± 0,71	0,18 ± 0,38		0,70 ± 0,38	1,09 ± 0,95	1,32 ± 1,30	1,76 ± 1,19	2,91 ± 1,61*	
Cit,	AB	2,01 ± 1,76	1,43 ± 2,57		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00	1,42 ± 2,56	
	R	3,27 ± 3,76	0,00 ± 0,00		0,10 ± 0,31	0,83 ± 0,99	1,07 ± 3,12	2,47 ± 5,26	1,38 ± 1,37	
	S	0,89 ± 1,29	0,18 ± 0,39		0,52 ± 0,75	0,85 ± 1,97	1,66 ± 1,39	0,00 ± 0,00	1,11 ± 1,38	
I,M,	AB	93,84 ± 8,07*	93,61 ± 34,55*		126,11 ± 40,48	147,63 ± 53,63	176,76 ± 37,10	167,74 ± 37,32	124,25 ± 21,74	
	R	98,82 ± 12,00*	129,54 ± 25,99		129,82 ± 36,58	118,46 ± 12,15	105,12 ± 16,67	107,45 ± 15,91*	103,12 ± 19,71*	
	S	178,84 ± 48,31*	100,30 ± 22,60*		147,91 ± 20,80	131,32 ± 17,44	123,08 ± 21,35	106,28 ± 15,43*	98,46 ± 14,65*	

CN: controle negativo; CS: controle do solo; CBCA: controle do bagaço de cana-de-açúcar; CP-TRIF: controle positivo Trifluralina; CP-MMS: controle positivo metilmetano sulfonato; TF: torta de filtro; BCA: bagaço de cana-de-açúcar; AB: associações brutas; R: ensaio de recuperação; S: solubilizado; Gen.: genotoxicidade; Mut.: mutagenicidade; Cit.: citotoxicidade; I.M.: índice mitótico; * significativo quando comparado com o CN – Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Tabela 5: Média de alterações observadas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas aos diferentes tratamentos, no tempo 1.

Ensaio		Controles			Associações					
		CN	CP-TRIF	CP-MMS	5%TF	10%TF	25%TF	50%TF	75%TF	100%TF
Gen,	AB	0,78 ± 0,76	13,31 ± 5,28*	9,42 ± 4,94*	2,12 ± 1,51	2,63 ± 2,18	2,90 ± 2,49	2,67 ± 2,39	1,79 ± 1,2	2,37 ± 1,72
	R	0,37 ± 0,40	12,35 ± 5,10*	7,90 ± 4,68*	2,48 ± 1,49	2,67 ± 2,05	3,34 ± 2,67*	2,09 ± 1,21	1,33 ± 1,19	0,92 ± 0,74
	S	0,82 ± 0,52	14,41 ± 7,41*	10,85 ± 4,04*	2,12 ± 1,37	1,81 ± 1,29	2,50 ± 2,05	2,22 ± 2,76	2,04 ± 1,34	1,62 ± 0,8
Mut,	AB	0,30 ± 0,48	5,89 ± 2,12*	12,71 ± 7,7*	0,76 ± 0,76	0,00 ± 0,00	0,74 ± 0,79	0,73 ± 0,74	0,39 ± 0,63	0,81 ± 0,79
	R	0,18 ± 0,38	3,40 ± 1,95*	11,58 ± 5,11*	0,45 ± 0,62	0,64 ± 0,75	0,75 ± 0,89	0,48 ± 1,20	0,09 ± 0,28	0,10 ± 0,30
	S	0,00 ± 0,00	6,91 ± 2,78*	15,20 ± 2,49*	0,46 ± 0,65	0,38 ± 0,64	0,73 ± 0,95	1,13 ± 0,97	0,71 ± 0,72	0,09 ± 0,29
Cit,	AB	0,00 ± 0,00	10,20 ± 6,60*	6,64 ± 5,35*	0,96 ± 1,29	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,46 ± 4,46	3,84 ± 2,68*
	R	0,00 ± 0,00	7,76 ± 6,99*	5,01 ± 9,65	1,06 ± 3,36	2,22 ± 4,83	1,81 ± 3,62	0,00 ± 0,00	2,85 ± 5,87	0,00 ± 0,00
	S	0,17 ± 0,53	9,90 ± 6,30*	6,98 ± 3,85*	0,68 ± 1,32	0,27 ± 0,87	0,64 ± 0,74	0,87 ± 1,97	2,61 ± 2,89	5,37 ± 5,40
I.M,	AB	178,84 ± 48,31	135,46 ± 42,91	178,05 ± 70,38	109,05 ± 13,81*	114,95 ± 20,47	146,74 ± 57,08	151,88 ± 39,09	97,13 ± 13,39*	145,94 ± 29,33
	R	2,30 ± 26,56	109,91 ± 19,63*	138,28 ± 35,23	151,04 ± 32,62	135,39 ± 19,29	127,86 ± 34,97*	151,88 ± 39,09	91,13 ± 13,39*	93,61 ± 14,45
	S	171,64 ± 25,06	180,23 ± 43,58	130,99 ± 20,37	148,84 ± 17,74	137,73 ± 26,50	142,84 ± 15,75	122,70 ± 27,06*	102 ± 6,85*	126,53 ± 34,21*
		CS	CBCA			5%TF+BCA	10%TF+BCA	25%TF+BCA	50%TF+BCA	75%TF+BCA
Gen,	AB	1,06 ± 1,01	1,96 ± 1,20			2,88 ± 1,74	2,40 ± 1,80	2,79 ± 1,87	3,52 ± 2,43	3,43 ± 1,78
	R	2,20 ± 1,48	2,78 ± 1,86			2,32 ± 2,02	2,72 ± 2,94	2,67 ± 1,53	3,11 ± 0,79*	4,36 ± 2,02*
	S	1,54 ± 1,20	1,09 ± 1,19			0,95 ± 0,79	1,85 ± 1,24	2,13 ± 1,24	2,21 ± 1,52	2,44 ± ,22
Mut,	AB	0,48 ± 0,68	2,17 ± 2,29			1,91 ± 2,51	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,40	1,85 ± 2,05	0,96 ± 1,03
	R	0,46 ± 0,67	0,19 ± 0,41			0,37 ± 0,48	0,46 ± 0,66	0,65 ± 0,99	0,38 ± 0,49	0,19 ± 0,41
	S	0,46 ± 1,17	0,26 ± 0,58			0,09 ± 0,29	0,67 ± 1,29	0,65 ± 0,76	1,24 ± 1,09	1,52 ± 0,53*
Cit,	AB	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00			0,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,55 ± 2,82	2,34 ± 2,43
	R	0,20 ± 0,63	0,64 ± 2,02			0,09 ± 0,29	2,44 ± 3,08	3,15 ± 3,03	3,55 ± 3,92	5,64 ± 4,09*
	S	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00			0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,25 ± 3,78	0,00 ± 0,00	6,73 ± 5,69*
I.M,	AB	180,23 ± 38,83*	97,97 ± 12,92*			109,87 ± 23,45*	123,53 ± 18,19*	126,15 ± 20,25	102,68 ± 28,59*	135,03 ± 53,32
	R	133,53 ± 18,69*	149,33 ± 37,98			142,44 ± 30,90	112,46 ± 16,46*	109,11 ± 28,04*	130,14 ± 49,16*	178,84 ± 48,31
	S	127,47 ± 30,61	110,99 ± 16,85*			112,09 ± 12,71*	141,17 ± 31,54	123,34 ± 22,12*	132,72 ± 21,36	136,25 ± 43,18

CN: controle negativo; CS: controle do solo; CBCA: controle do bagaço de cana-de-açúcar; CP-TRIF: controle positivo Trifluralina; CP-MMS: controle positivo metilmetano sulfonato; TF: torta de filtro; BCA: bagaço de cana-de-açúcar; AB: associações brutas; R: ensaio de recuperação; S: solubilizado; Gen.: genotoxicidade; Mut.: mutagenicidade; Cit.: citotoxicidade; I.M.: índice mitótico; * significativo quando comparado com o CN – Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Tabela 6: Média de alterações observadas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas aos diferentes tratamentos, no tempo 2.

Ensaio		Controles			Associações					
		CN	CP-TRIF	CP-MMS	5%TF	10%TF	25%TF	50%TF	75%TF	100%TF
Gen,	AB	1,94 ± 1,49	13,50 ± 5,85*	5,81 ± 5,67	1,67 ± 0,97	3,5 ± 2,24	4,18 ± 1,80	5,31 ± 1,44*	3,47 ± 2,07	2,96 ± 1,91
	R	0,84 ± 0,67	10,03 ± 7,17*	6,05 ± 3,81*	1,18 ± 0,84	2,48 ± 1,89	1,76 ± 0,93	2,00 ± 0,94	1,42 ± 0,97	3,29 ± 1,07*
	S	1,37 ± 0,89	12,87 ± 6,63*	3,42 ± 2,60*	3,42 ± 2,60	2,70 ± 1,73	3,63 ± 2,59	2,09 ± 1,21	3,30 ± 1,77	1,70 ± 0,88
Mut,	AB	0,08 ± 0,25	5,57 ± 1,28*	15,26 ± 6,49*	0,19 ± 0,40	0,81 ± 1,19	0,75 ± 0,96	0,37 ± 0,65	2,52 ± 1,73*	0,36 ± 0,46
	R	0,17 ± 0,37	6,32 ± 2,59*	13,10 ± 6,97*	0,53 ± 0,61	0,38 ± 0,49	0,09 ± 0,29	1,27 ± 0,98	0,66 ± 0,78	0,09 ± 0,29
	S	0,36 ± 0,47	6,16 ± 3,33*	9,64 ± 5,25*	0,71 ± 0,82	0,19 ± 0,41	2,13 ± 2,17	0,48 ± 1,20	2,33 ± 1,54*	0,09 ± 0,28
Cit,	AB	0,99 ± 1,41	5,05 ± 5,99	3,74 ± 5,01	0,00 ± 0,00	3,20 ± 1,99	1,56 ± 2,64	1,99 ± 2,18	1,09 ± 1,39	3,99 ± 7,03
	R	0,25 ± 0,81	1,93 ± 4,21	4,24 ± 5,93	0,64 ± 0,86	0,62 ± 0,74	0,09 ± 0,29	1,10 ± 0,98	1,58 ± 1,58	2,03 ± 1,02*
	S	0,19 ± 0,60	6,03 ± 7,53*	7,53 ± 6,94*	1,19 ± 2,21	0,57 ± 1,81	1,42 ± 2,25	0,00 ± 0,00	1,10 ± 1,36	0,08 ± 0,26
I,M,	AB	167,21 ± 34,62	142,63 ± 129,54	154,12 ± 67,86	168,97 ± 42,20	109,79 ± 15,94*	158,15 ± 38,7	148,70 ± 37,92	157,82 ± 61,10	125,96 ± 19,80
	R	219,61 ± 27,38	179,03 ± 69,64	165,57 ± 59,65	164,38 ± 24,38	161,17 ± 44,48	170,12 ± 30,96	149,71 ± 16,28	120,12 ± 26,08*	104,94 ± 7,86*
	S	143,00 ± 21,82	131,03 ± 11,79	147,60 ± 19,25	109,85 ± 13,91	114,95 ± 20,47	146,74 ± 57,08	151,88 ± 39,09	91,13 ± 13,39*	157,12 ± 51,68
		CS	CBCA							
Gen,	AB	2,71 ± 1,81	2,75 ± 1,95							
	R	2,46 ± 1,41	2,14 ± 1,27							
	S	2,74 ± 1,34	1,96 ± 1,45							
Mut,	AB	0,08 ± 0,26	0,35 ± 0,46							
	R	1,12 ± 0,76	0,38 ± 0,67							
	S	0,10 ± 0,30	2,17 ± 2,29							
Cit,	AB	4,43 ± 3,17	2,88 ± 2,83							
	R	4,47 ± 4,84*	0,95 ± 0,77							
	S	0,85 ± 1,24	0,00 ± 0,00							
I,M,	AB	170,84 ± 36,52	121,39 ± 31,6							
	R	103,74 ± 12,03*	137,49 ± 19,90*							
	S	127,91 ± 26,96	97,97 ± 12,92*							

CN: controle negativo; CS: controle do solo; CBCA: controle do bagaço de cana-de-açúcar; CP-TRIF: controle positivo Trifluralina; CP-MMS: controle positivo metilmetano sulfonato; TF: torta de filtro; BCA: bagaço de cana-de-açúcar; AB: associações brutas; R: ensaio de recuperação; S: solubilizado; Gen.: genotoxicidade; Mut.: mutagenicidade; Cit.: citotoxicidade; I.M.: índice mitótico; * significativo quando comparado com o CN – Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Tabela 7: Média de alterações observadas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas aos diferentes tempos de biodegradação das associações em substrato sólido.

Tempo		Controles			Associações					
		CN	CP-TRIF	CP-MMS	5%TF	10%TF	25%TF	50%TF	75%TF	100%TF
Gen,	T0	0,96 ± 0,79	13,20 ± 5,22*	6,89 ± 3,7*	2,39 ± 1,49	2,7 ± 1,73	3,63 ± 2,59	2,09 ± 1,21	3,3 ± 1,7	1,7 ± 0,88
	T1	0,78 ± 0,76	13,31 ± 5,28*	9,42 ± 4,94*	2,12 ± 1,51	2,63 ± 2,18	2,90 ± 2,49	2,67 ± 2,39	1,79 ± 1,2	2,37 ± 1,72
	T2	1,94 ± 1,49	13,50 ± 5,85*	5,81 ± 5,67	1,67 ± 0,97	3,5 ± 2,24	4,18 ± 1,80	5,31 ± 1,44*	3,47 ± 2,07	2,96 ± 1,91
Mut,	T0	0,09 ± 0,27	5,78 ± 1,71*	15,36 ± 5,56*	0,4 ± 0,47	0,19 ± 0,41	2,13 ± 2,17	0,48 ± 1,2	2,33 ± 1,54*	0,09 ± 0,28
	T1	0,30 ± 0,48	5,89 ± 2,12*	12,71 ± 7,7*	0,76 ± 0,76	0,00 ± 0,00	0,74 ± 0,79	0,73 ± 0,74	0,39 ± 0,63	0,81 ± 0,79
	T2	0,08 ± 0,25	5,57 ± 1,28*	15,26 ± 6,49*	0,19 ± 0,40	0,81 ± 1,19	0,75 ± 0,96	0,37 ± 0,65	2,52 ± 1,73*	0,36 ± 0,46
Cit,	T0	0,00 ± 0,00	10,08 ± 6,51*	2,09 ± 4,05	1,29 ± 176	0,57 ± 1,81	1,42 ± 2,25	0,00 ± 0,00	1,10 ± 1,36	0,08 ± 0,26
	T1	0,00 ± 0,00	10,20 ± 6,60*	6,64 ± 5,35*	0,96 ± 1,29	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,46 ± 4,46	3,84 ± 2,68*
	T2	0,99 ± 1,41	5,05 ± 5,99	3,74 ± 5,01	0,00 ± 0,00	3,20 ± 1,99	1,56 ± 2,64	1,99 ± 2,18	1,09 ± 1,39	3,99 ± 7,03
I.M,	T0	178,84 ± 48,31	135,46 ± 42,91	178,05 ± 70,38	109,05 ± 13,81*	114,95 ± 20,47	146,74 ± 57,08	151,88 ± 39,09	97,13 ± 13,39*	145,94 ± 29,33
	T1	178,84 ± 48,31	135,46 ± 42,91	178,05 ± 70,38	109,05 ± 13,81*	114,95 ± 20,47	146,74 ± 57,08	151,88 ± 39,09	97,13 ± 13,39*	145,94 ± 29,33
	T2	167,21 ± 34,62	142,63 ± 129,54	154,12 ± 67,86	168,97 ± 42,20	109,79 ± 15,94*	158,15 ± 38,70	148,70 ± 37,92	157,82 ± 61,10	125,96 ± 19,8
		CS	CBCA			5%TF+BCA	10%TF+BCA	25%TF+BCA	50%TF+BCA	75%TF+BCA
Gen,	T0	2,44 ± 2,21	3,54 ± 1,93			1,92 ± 2,87	1,69 ± 1,26	1,65 ± 1,69	2,5 ± 2,57	3,57 ± 2,61
	T1	1,06 ± 1,01	1,96 ± 1,20			2,88 ± 1,74	2,40 ± 1,80	2,79 ± 1,87	3,52 ± 2,43	3,43 ± 1,78
	T2	2,71 ± 1,81	2,75 ± 1,95			3,28 ± 1,21	3,53 ± 2,57	2,38 ± 2,10	2,91 ± 2,13	4,13 ± 3,14
Mut,	T0	0,53 ± 0,74	0,69 ± 1,17			0,43 ± 0,72	0,48 ± 0,69	0,08 ± 0,24	0,5 ± 0,84	2,15 ± 2,12
	T1	0,48 ± 0,68	2,17 ± 2,29			1,91 ± 2,51	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,40	1,85 ± 2,05	0,96 ± 1,03
	T2	0,08 ± 0,26	0,35 ± 0,46			0,20 ± 0,63	0,67 ± 0,93	1,11 ± 0,95	0,56 ± 1,01	0,62 ± 1,19
Cit,	T0	2,01 ± 1,76	1,43 ± 2,57			0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,0 ± 0,0	1,42 ± 2,56
	T1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00			0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,55 ± 2,82	2,34 ± 2,43
	T2	4,43 ± 3,17	2,88 ± 2,83			0,37 ± 0,65	1,11 ± 1,69	3,32 ± 3,10	0,81 ± 0,97	2,88 ± 2,83
I.M,	T0	93,84 ± 8,07*	93,61 ± 34,55*			126,11 ± 40,48	147,63 ± 53,63	176,76 ± 37,10	167,74 ± 37,32	124,25 ± 21,74
	T1	180,23 ± 38,83*	97,97 ± 12,92*			109,87 ± 23,45*	123,53 ± 18,19*	126,15 ± 20,25	102,68 ± 28,59*	135,03 ± 53,32
	T2	170,84 ± 36,52	121,39 ± 31,60			155,93 ± 29,12	130,20 ± 36,88	131,08 ± 31,60	131,96 ± 20,08	121,39 ± 20,53

CN: controle negativo; CS: controle do solo; CBCA: controle do bagaço de cana-de-açúcar; CP-TRIF: controle positivo Trifluralina; CP-MMS: controle positivo metilmetano sulfonato; TF: torta de filtro; BCA: bagaço de cana-de-açúcar; T0 tempo inicial de biodegradação; T1 tempo após 3 meses de biodegradação; T2 tempo de 6 meses de biodegradação; Gen.: genotoxicidade; Mut.: mutagenicidade; Cit.: citotoxicidade; I.M.: índice mitótico; * significativo quando comparado com o CN – Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Tabela 8: Média de alterações observadas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas aos diferentes tempos de biodegradação das associações, após recuperação de 48 horas.

Ensaio		Controles			Associações					
		CN	CP-TRIF	CP-MMS	5%TF	10%TF	25%TF	50%TF	75%TF	100%TF
Gen,	T0	0,92 ± 0,76	9,45 ± 3,98*	5,22 ± 5,19*	2,08 ± 1,69	2,56 ± 1,41	1,67 ± 0,86	2,09 ± 1,18	2,56 ± 2,08	4,05 ± 1,91*
	T1	0,37 ± 0,40	12,35 ± 5,10*	7,90 ± 4,68*	2,48 ± 1,49	2,67 ± 2,05	3,34 ± 2,67*	2,09 ± 1,21	1,33 ± 1,19	0,92 ± 0,74
	T2	0,84 ± 0,67	10,03 ± 7,17*	6,05 ± 3,81*	1,18 ± 0,84	2,48 ± 1,89	1,76 ± 0,93	2,00 ± 0,94	1,42 ± 0,97	3,29 ± 1,07*
Mut,	T0	0,00 ± 0,00	5,48 ± 1,58*	10,02 ± 3,91*	0,18 ± 0,37	0,35 ± 0,46	0,09 ± 0,30	0,50 ± 1,27	2,56 ± 1,81*	2,10 ± 2,07
	T1	0,18 ± 0,38	3,40 ± 1,95*	11,58 ± 5,11*	0,45 ± 0,62	0,64 ± 0,75	0,75 ± 0,89	0,48 ± 1,20	0,09 ± 0,28	0,10 ± 0,30
	T2	0,17 ± 0,37	6,32 ± 2,59*	13,10 ± 6,97*	0,53 ± 0,61	0,38 ± 0,49	0,09 ± 0,29	1,27 ± 0,98	0,66 ± 0,78	0,09 ± 0,29
Cit,	T0	0,08 ± 0,26	7,35 ± 4,81*	3,35 ± 3,50	0,46 ± 0,67	1,65 ± 2,57	0,10 ± 0,32	0,00 ± 0,00	1,15 ± 1,41	0,00 ± 0,00
	T1	0,00 ± 0,00	7,76 ± 6,99*	5,01 ± 9,65	1,06 ± 3,36	2,22 ± 4,83	1,81 ± 3,62	0,00 ± 0,00	2,85 ± 5,87	0,00 ± 0,00
	T2	0,25 ± 0,81	1,93 ± 4,21	4,24 ± 5,93	0,64 ± 0,86	0,62 ± 0,74	0,09 ± 0,29	1,10 ± 0,98	1,58 ± 1,58	2,03 ± 1,02*
I,M,	T0	188,32 ± 32,19	26,26 ± 5,55	138,28 ± 35,23	120,46 ± 17,70	153,77 ± 49,01	147,07 ± 41,81	167,74 ± 37,10	176,73 ± 37,32	147,63 ± 53,63*
	T1	2,30 ± 26,56	109,91 ± 19,63*	138,28 ± 35,23	151,04 ± 32,62	135,39 ± 19,29	127,86 ± 34,97*	151,88 ± 39,09	91,13 ± 13,39*	93,61 ± 14,45
	T2	219,61 ± 27,38	179,03 ± 69,64	165,57 ± 59,65	164,38 ± 24,38	161,17 ± 44,48	170,12 ± 30,96	149,71 ± 16,28	120,12 ± 26,08*	104,94 ± 7,86*
		CS	CBCA							
Gen,	T0	2,67 ± 1,91	1,47 ± 1,62							
	T1	2,20 ± 1,48	2,78 ± 1,86							
	T2	2,46 ± 1,41	2,14 ± 1,27							
Mut,	T0	0,18 ± 0,38	0,18 ± 0,58							
	T1	0,46 ± 0,67	0,19 ± 0,41							
	T2	1,12 ± 0,76	0,38 ± 0,67							
Cit,	T0	3,27 ± 3,76	0,00 ± 0,00							
	T1	0,20 ± 0,63	0,64 ± 2,02							
	T2	4,47 ± 4,84*	0,95 ± 0,77							
I,M,	T0	98,82 ± 12,00*	129,54 ± 25,99							
	T1	133,53 ± 18,69*	149,33 ± 37,98							
	T2	103,74 ± 12,03*	137,49 ± 19,90*							
						5%TF+BCA	10%TF+BCA	25%TF+BCA	50%TF+BCA	75%TF+BCA
Gen,	T0					1,10 ± 1,22	1,87 ± 1,27	1,33 ± 1,16	4,24 ± 1,79*	5,69 ± 4,32*
	T1					2,32 ± 2,02	2,72 ± 2,94	2,67 ± 1,53	3,11 ± 0,79*	4,36 ± 2,02*
	T2					2,17 ± 1,27	2,33 ± 1,84	1,81 ± 1,85	2,97 ± 1,82	3,18 ± 2,18
Mut,	T0					0,29 ± 0,66	0,08 ± 0,26	0,08 ± 0,026	0,19 ± 0,41	0,17 ± 0,37
	T1					0,37 ± 0,48	0,46 ± 0,66	0,65 ± 0,99	0,38 ± 0,49	0,19 ± 0,41
	T2					0,57 ± 0,93	1,58 ± 0,76	0,17 ± 0,35	0,27 ± 0,44	0,55 ± 0,48
Cit,	T0					0,10 ± 0,31	0,83 ± 0,99	1,07 ± 3,12	2,47 ± 5,26	1,38 ± 1,37
	T1					0,09 ± 0,29	2,44 ± 3,08	3,15 ± 3,03	3,55 ± 3,92	5,64 ± 4,09*
	T2					1,90 ± 1,18	0,00 ± 0,00	1,27 ± 1,60	1,39 ± 1,95	0,84 ± 1,22
I,M,	T0	98,82 ± 12,00*	129,54 ± 25,99							
	T1	133,53 ± 18,69*	149,33 ± 37,98							
	T2	103,74 ± 12,03*	137,49 ± 19,90*							

CN: controle negativo; CS: controle do solo; CBCA: controle do bagaço de cana-de-açúcar; CP-TRIF: controle positivo Trifluralina; CP-MMS: controle positivo metilmetano sulfonato; TF: torta de filtro; BCA: bagaço de cana-de-açúcar; T0 tempo inicial de biodegradação; T1 tempo após 3 meses de biodegradação; T2 tempo de 6 meses de biodegradação; Gen.: genotoxicidade; Mut.: mutagenicidade; Cit.: citotoxicidade; I,M,: índice mitótico; * significativo quando comparado com o CN – Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Tabela 9: Média de alterações observadas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas aos diferentes tempos de biodegradação das associações solubilizadas.

Ensaio		Controles			Associações					
		CN	CP-TRIF	CP-MMS	5%TF	10%TF	25%TF	50%TF	75%TF	100%TF
Gen,	T0	0,96 ± 0,79	13,20 ± 5,22*	6,89 ± 3,70*	1,55 ± 1,26	2,07 ± 1,33	2,88 ± 1,61	2,02 ± 1,11	2,19 ± 1,57	3,30 ± 2,42
	T1	0,82 ± 0,52	14,41 ± 7,41*	10,85 ± 4,04*	2,12 ± 1,37	1,81 ± 1,29	2,50 ± 2,05	2,22 ± 2,76	2,04 ± 1,34	1,62 ± 0,8
	T2	1,37 ± 0,89	12,87 ± 6,63*	3,42 ± 2,60*	3,42 ± 2,60	2,70 ± 1,73	3,63 ± 2,59	2,09 ± 1,21	3,30 ± 1,77	1,70 ± 0,88
Mut,	T0	0,09 ± 0,27	5,78 ± 1,71*	15,36 ± 5,56*	0,47 ± 1,23	0,63 ± 0,73	0,56 ± 0,49	1,28 ± 0,64	0,93 ± 0,83	1,99 ± 1,92
	T1	0,00 ± 0,00	6,91 ± 2,78*	15,20 ± 2,49*	0,46 ± 0,65	0,38 ± 0,64	0,73 ± 0,95	1,13 ± 0,97	0,71 ± 0,72	0,09 ± 0,29
	T2	0,36 ± 0,47	6,16 ± 3,33*	9,64 ± 5,25*	0,71 ± 0,82	0,19 ± 0,41	2,13 ± 2,17	0,48 ± 1,20	2,33 ± 1,54*	0,09 ± 0,28
Cit,	T0	0,00 ± 0,00	10,08 ± 6,51*	2,09 ± 4,05	0,00 ± 0,00	1,79 ± 3,59	1,15 ± 2,04	3,58 ± 5,26	6,02 ± 5,64*	1,41 ± 2,58
	T1	0,17 ± 0,53	9,90 ± 6,30*	6,98 ± 3,85*	0,68 ± 1,32	0,27 ± 0,87	0,64 ± 0,74	0,87 ± 1,97	2,61 ± 2,89	5,37 ± 5,40
	T2	0,19 ± 0,60	5,05 ± 5,99	3,74 ± 5,01	0,00 ± 0,00	3,20 ± 1,99	1,56 ± 2,64	1,99 ± 2,18	1,09 ± 1,39	3,99 ± 7,03
I,M,	T0	178,84 ± 48,31	135,46 ± 42,91	178,05 ± 70,38	142,43 ± 24,48	137,88 ± 29,09	125,54 ± 39,03	126,24 ± 29,89	131,31 ± 18,69	97,88 ± 10,96*
	T1	171,64 ± 25,06	180,23 ± 43,58	130,99 ± 20,37	148,84 ± 17,74	137,73 ± 26,50	142,84 ± 15,75	122,70 ± 27,06*	102 ± 6,85*	126,53 ± 34,21*
	T2	143,00 ± 21,82	131,03 ± 11,79	147,60 ± 19,25	109,85 ± 13,91	114,95 ± 20,47	146,74 ± 57,08	151,88 ± 39,09	91,13 ± 13,39*	157,12 ± 51,68
		CS	CBCA							
Gen,	T0	3,65 ± 1,91	1,44 ± 0,74							
	T1	1,54 ± 1,20	1,09 ± 1,19							
	T2	2,74 ± 1,34	1,96 ± 1,45							
Mut,	T0	0,42 ± 0,71	0,18 ± 0,38							
	T1	0,46 ± 1,17	0,26 ± 0,58							
	T2	0,10 ± 0,30	2,17 ± 2,29							
Cit,	T0	0,89 ± 1,29	0,18 ± 0,39							
	T1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00							
	T2	0,85 ± 1,24	0,00 ± 0,00							
I,M,	T0	178,84 ± 48,31*	100,30 ± 22,60*							
	T1	127,47 ± 30,61	110,99 ± 16,85*							
	T2	127,91 ± 26,96	97,97 ± 12,92*							

CN: controle negativo; CS: controle do solo; CBCA: controle do bagaço de cana-de-açúcar; CP-TRIF: controle positivo Trifluralina; CP-MMS: controle positivo metilmetano sulfonato; TF: torta de filtro; BCA: bagaço de cana-de-açúcar; T0 tempo inicial de biodegradação; T1 tempo após 3 meses de biodegradação; T2 tempo de 6 meses de biodegradação; Gen.: genotoxicidade; Mut.: mutagenicidade; Cit.: citotoxicidade; I.M.: índice mitótico; * significativo quando comparado com o CN – Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

4 CONCLUSÃO

Muitos estudos vem sendo realizados no intuito de validar o uso da TF como fertilizante natural de solos. A maioria deles analisa a composição química das associações da TF e solo e avalia os efeitos dessas associações sobre a produtividade das culturas a elas expostas. No entanto, poucos estudos foram feitos para se avaliar os efeitos destas associações sobre a biota do local em que ela é aplicada.

Pelos resultados obtidos neste estudo, pode-se inferir que a TF poderia ser utilizada em pequenas concentrações, associada ao solo com ou sem BCA, como fertilizante.

Apesar de seu conteúdo rico em metais, as baixas concentrações de TF não foram capazes de induzir danos genotóxicos e mutagênicos significativos nas células meristemáticas de *A. cepa*.

O processo de biodegradação parece ser eficiente, pois os potenciais genotóxico e mutagênico das associações com as maiores concentrações de TF diminuíram, depois de 6 meses de biodegradação. Quando comparadas com as associações em substratos sólidos, sem biodegradação (T0), as amostras do T1 parecem ter induzido uma quantidade maior de danos, talvez pela formação de metabólitos, cuja atividade induz a formação de AC e MN nas células. Porém, o processo de biodegradação foi mantido por um total de 6 meses (T2), o que possibilitou a redução desta atividade, ou seja, a isenção de metabólitos tóxicos, pela possível degradação dos mesmos pelos microorganismos presentes nas associações.

Pela análise dos resultados, também foi possível determinar que a presença do BCA influenciou positivamente no processo de biodegradação, já que as associações com BCA, mesmo nas maiores concentrações de TF, apresentaram maior redução do potencial genotóxico e mutagênico.

Os testes com *A. cepa* se mostraram eficientes para avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos da TF, antes e após biodegradação. Além disso, a biodegradação por 6 meses mostrou ser eficiente para a diminuição da toxicidade da TF, mesmo nas suas associações com concentrações mais altas, tornando o seu uso na agricultura mais seguro. Deve-se enfatizar que as associações com concentrações mais baixas de TF não apresentaram efeitos danosos ao organismo-teste utilizado, porém mais estudos são necessários para estabelecer a quantidade ideal de aplicação na cultura de cana-de-açúcar, pois o uso em concentrações mais baixas faz com que maiores quantidade de TF sejam necessárias a suplementação do solo com nutrientes.

5 BIBLIOGRAFIA

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 10006, *Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos* (2007);

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR ISO 15537, *Ecotoxicologia terrestre - Ecotoxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas* (2007);

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas (2010), *NM-ISO 3310-1* Peneiras de ensaio - Requisitos técnicos e verificação Parte 1: Peneiras de ensaio com tela de tecido metálico (ISO 3310-1, IDT);

ARAMBAŠIĆ, M. B.; BJELIĆ, S.; SUBAKOV, G. Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa*, *Lepidium sativum*, and *Daphnia magna* St.: Comparative investigations and the practical applications. **Water Research**, v. 29, n. 2, p. 497–503, 1995;

BEHBOODI, B. S.; SAMADI, L. Detection of apoptotic bodies and oligonucleosomal DNA fragments in cadmium-treated root apical cells of *Allium cepa* Linnaeus. **Plant Science**, v. 167, n. 3, p. 411–416, 2004;

BIANCHI J., ESPINDOLA E. L. G. e MARIN-MORALES M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74(4), p.826-33, 2011;

BOLBOACĂ, S. D. e JÄNTSCHI, L. Sensitivity, specificity, and accuracy of predictive models on phenols Toxicity **Journal of Computational Science**. in press, 2013;

BUDZIAK, C. R.; MAIA, C. M. B. F.; MANGRICH, A.S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Química Nova**, v.27, i. 3, p. 339-403, 2004;

BUSHRA ATEEQ, M.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, W. A. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2, 4-D and butachlor evaluated by Allium root tip test. **Mutation Research**, v. 514, p. 105-113, 2002;

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

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar: Safra 2013/2014, primeiro levantamento**, Brasília: 2013, Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_12_10_34_43_boletim_cana_portugues_10_2013.pdf.br>, Acesso em: 20 nov. de 2013;

CONCEIÇÃO D.M.; DE ANGELIS D.A.; BIDOIA E.D.; DE ANGELIS D. DE F. Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia/SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos **Arq. Inst. Biol.**, v.72, n.1, p. 99-106, 2005

COSTA E.C.; BARBOSA, C. D. E.S.; GARCIA, C. A. B. Estudos do processo de adsorção de metais pesados utilizando o pó do bagaço da Cana-de-açúcar para viabilização do seu uso em efluentes industriais. **62ª Reunião Anual da SBPC**, Natal, 2009;

DIMITROVA, I., IVANOVA, E. Effect of heavy metal soil pollution on some morphological and cytogenetical characteristics of flax (*Linum usitatissimum* L.), **J. Balkan Ecol.** v.4, p.212–218, 2003;

DOVGALIUK, A. I.; KALINIAK, T.B.; BLIUM, I. B. Cytogenetic effects of toxic metal salts on apical meristem cells of *Allium cepa* L. seed roots **Tsitol Genet.** v.35, i.2, p.3-10, 2001;

DOS SANTOS V.C.G.; FERRAREZI, J.G.; DRAGUNSKI D.C. Modificação química do bagaço de cana-de-açúcar para adsorção de chumbo e cromo. **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, São Paulo, 2008;

EMBRAPA, **Impacto Ambiental da cana-de-açúcar**. Campinas: 2013, Disponível em: <<http://www.cana.cnpm.embrapa.br/setor.html>>, Acesso em: 20 nov. 2013;

EVSEEVA, T. I.; GERA'KIN, S. A.; SHUKTOMOVA, I. I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. **Journal of Environmental Radioactivity**, Oxford, v. 68, p. 235-248, 2003;

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

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent-Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, 2009;

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

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

FUSCONI, A.; GALLO, C.; CAMUSSO, W. Effects of cadmium on root apical meristems of *Pisum sativum* L.; Cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable markers for assessment of stress pollution, **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v, 632, n, 1, p, 9–19, 2007;

FRAVET, P. R. F.; SOARES, R. A. B.; LANA, R. M. Q.; LANA, Â. M. Q.; KORNDÖRFER, G. H. Efeito de doses de torta de filtro e modo de aplicação sobre a produtividade e qualidade tecnológica da soqueira de cana-de-açúcar. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 618–624, 2010;

GRANT, W.F. Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. **Environmental Health Perspectives**, v.27, p.37-43, 1978;

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. **Mutation Research**, v.99, p.273-291, 1982;

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

GUARNIERI, L. C.; JANUZZI, G. M. Proálcool: Impactos ambientais. **Revista Brasileira de Energia**, v. 2 , n. 2, p. 6-10, 1992;

GUPTA, N.; TRIPATHI, S.; BALOMAJUMDER, C. Characterization of pressmud: A sugar industry waste. **Fuel**, v. 90, n. 1, p. 389–394, 2011;

HERRERO O.; PÉREZ MARTÍN J.M.; FERNÁNDEZ FREIRE P., CARVAJAL LÓPEZ L.; PEROPADRE A., HAZEN M.J. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research**, v.743, p.20– 24 2012;

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

KNASMÜLLER, S.; GOTTMANN, E.; STEINKELLNER, H.; FOMIN, A.; PICKL, C.; PASCHKE, A.; GÖD, R.; KUNDI, M. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. **Mutation Research**, v.420, p.37-48, 1998;

KUMARI, M. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, n. 1, p. 613–621, 2011;

KURÁS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* Test induced by barck water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. **Chemosphere**, v. 107, p. 211-221, 2006;

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

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

LERDA, D. The effect of lead on *Allium cepa*. **Mutation Research Letters**, v. 281, n. 2, p. 89–92, 1992,

LIU, D. Effects of lead on root growth, cell division, and nucleolus of *Allium cepa*. **Environmental Pollution**, v. 86, n. 1, p. 1–4, 1994;

MAILA, M. P.; CLOETE, T. E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants—perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, n. 1, p. 1–8, 2005;

MAJER, B. J. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 515, n. 1, p. 111–124, 2002;

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

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v. 15, n. 408, p. 4334-4340, 2011;

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M. A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v.85, p.13-18, 2011;

MAZZEO D.E.C. Avaliação da viabilidade do lodo de esgoto como recondicionante de solos agrícolas, após processo de atenuação natural, por meio de diferentes bioensaios - **Tese** apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2013;

MIGID, A.H.M.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.66, p.57–64, 2007;

NUNES JÚNIOR, D. **O insumo torta de filtro**. Ribeirão Preto: IDEA News, 2005, PORTAL MATO GROSSO, Disponível em: <<http://www.mtseusmunicipios.com.br/NG/conteudo.php?sid=167&cid=841>>, Acesso em 25 fev. 2013;

NUNES JUNIOR, D. Torta de Filtro: de resíduo a produto nobre. **Revista Idea News**, ano 8, n. 92, p. 22-30, Junho, 2008;

PARTHA, N.; SIVASUBRAMANIAN, V. Recovery of chemicals from pressmud – A sugar industry waste. **Indian Chem Engr Section A**, v. 48, n. 3, p. 160 – 163, 2006;

PATRA, M.; SHARMA, A. Relative efficacy of *Allium cepa* and *Allium sativum* in anaphase-telophase test screening metal genotoxicity. **Biologia**, v. 57, p. 409-414, 2002;

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercâmbios entre cromátidas hermanas**. 1987, 276 f. Tese (Doutorado), Universidade de Complutense, Madrid, 1987;

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphasetelophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v. 418, p.113-119, 1998;

RANK J., LOPEZ L.C., NIELSEN M.H. MORETTON J., Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, v.136, p.13–18, 2002;

RASUL, M. G.; RUDOLPH, V.; CARSKY, M. Physical properties of bagasse. **Fuel**, v. 78, n. 8, p. 905–910, 1999;

SETH, C. S. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 3, p. 711–716, 2008;

SOUZA R. S; MORAES SANTOS D. V.; MORAIS SILVA V. L. M. Estudo da cinética de Adsorção do bagaço da cana-de-açúcar na remoção de chumbo (Pb) **2º Congresso Químico do Brasil**, Associação Norte-Nordeste de Química, 2009;

SCHIMITZ, J.A.K.; SOUZA, P.V.D.; KÄMPF, A.N. Physical And Chemical Properties Of Substrats With Mineral And Organic Origin For Growth Of Potted Plants. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 937-944, 2002;

SRIVASTAVA K., MISHRA K.K. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Pest. Biochem. Physiol.**, v.93, p.8–12, 2009;

STEINKELLNER, H. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 31, n. 2, p. 183–91, jan. 1998;

SOUZA, T.S.; HEINCKLEIN, F.A.; ANGELIS, D.F.; FONTANETTI, C.S. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 1627-1636, 2013;

SOUZA, T.S.; HEINCKLEIN, F.A.; ANGELIS, D.F.; GONÇALVES, R.A.; FONTANETTI, C.S. The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1363-1368, 2009;

SAPLAKOGLU, U., ISCAN, M. Sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated in vitro with cadmium in G₀ and S phase of their cell cycles. **Mutat. Res.** 412, 109–114, 1998;

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, **Method 6010c** - Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry, Alexandria: **USEPA**, 2007, 6000 Series Methods, 64 p;

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

VENTURA-CAMARGO B.C., MALTEMPI P.P.P., MARIN-MORALES M.A. The use of the Cytogenetic to Identify Mechanisms of Action of an Azo Dye in *Allium Cepa* Meristematic Cells. **J Environment Analytic Toxicol** vol.1, p.109, 2011;

WIERZBICKA, M.; ANTOSIEWICZ, D. How lead can easily enter the food chain — a study of plant roots. **Science of The Total Environment**, v. 134, p. 423–429, 1993;

WIERZBICKA, M. Comparison of lead tolerance in *Allium cepa* with other plant species. **Environmental Pollution**, v. 104, n. 1, p. 41–52, 1999;

YI, H.; WU, L.; JIANG, L. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay. **Science of the Total Environment**, v.383, p.232–236, 2007;

YILDIZ, M.; CİĞERCI, İ.H.; KONUK, M.; FATİH FIDAN, A.; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v.75, p.934–938, 2009;

6 CONCLUSÕES GERAIS

- A caracterização química inicial das associações da TF apresentou níveis significativos de alguns metais;
- A TF (T0) apresentou potencial tóxico elevado para *E. andrei*, porém este efeito foi atenuado durante o processo de biodegradação;
- A TF (T0) também apresentou potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico para *A. cepa*, que também foram atenuados com o processo de biodegradação;
- A adição do BCA foi eficiente para melhorar o processo de biodegradação, melhorando a aeração das amostras e diminuindo os efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, após seis meses de biodegradação;
- O período de seis meses de biodegradação foi adequado para a atenuação dos efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos da TF;
- As associações com as menores concentração de TF não apresentaram efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, demonstrando que a sua utilização, em baixas concentração, é viável para ser aplicada ao solo;
- Após o período de seis meses de biodegradação a TF pura teve uma perda muito elevada de nutrientes, o que, talvez, possa tornar inviável o uso deste resíduo como adubo agrícola;
- A espécie *E. andrei* se mostrou um excelente organismo teste para ser usado em avaliações dos efeitos tóxicos da TF e suas associações;
- O organismo *A. cepa* se mostrou um excelente organismo teste para se investigar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos da TF e de suas associações com solo e BCA;
- Pelos resultados obtidos, concluímos que mais estudos devam ser realizados, tanto com outros organismos como com outros endpoints, para se ter uma real compreensão dos efeitos da TF para a biota do solo, bem como para direcionar tomadas de decisão sobre a aplicação deste resíduo na agricultura.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas (1999). *NBR ISO 14283. Resíduos em solos - Determinação da biodegradação pelo método respirométrico*;

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 10006. *Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos* (2007);

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR ISO 15537. *Ecotoxicologia terrestre - Ecotoxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas* (2007);

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas (2010). *NM-ISO 3310-1 Peneiras de ensaio - Requisitos técnicos e verificação Parte 1: Peneiras de ensaio com tela de tecido metálico (ISO 3310-1, IDT)*;

AMORIM, M.J.B., RÖMBKE, J., SOARES, A.M.V.M. Avoidance behavior of *Enchytraeus albidus*: effects of Benomyl, Carbendazim, Phenmedipham and different soil types. **Chemosphere** 59, 501–510, 2005;

ARNAUD, C., SAINT-DENIS, M., NARBONNE, J.F., SOLER, P., RIBERA, D. Influences of different standardised test methods on biochemical responses in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p. 67-73, 2000;

ANDRÉA, M. M. **Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos**. São Paulo: Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental, 2008. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=83>. Acesso em: 20 nov. 2013;

BALBA, M.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 2, p. 155–164, 1998;

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a Flask and Method for Measuring the Persistence and Biological Effects of Pesticides in Soil. **Soil Science**, v. 100, n. 1, p. 68–70, 1965;

BELMESKINE, H.; HADDAD, S.; VANDELAC, L.; SAUVÉ, S.; FOURNIER, M. Toxic effects of PCDD/Fs mixtures on *Eisenia andrei* earthworms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.80, p.54–59, 2012;

BIANCHI J., ESPINDOLA E. L. G. e MARIN-MORALES M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74(4), p.826-33, 2011;

BISPO, A., CLUZEAU D., CREAMER R., DOMBOS M., GRAEFE I. U., KROGH P.H, SOUSA J.P., PERES G., RUTGERS M., WINDING A. E ROMBKE J. Indicators for monitoring soil biodiversity. **Integrated environmental assessment and management**, v. 5, n. 4, p. 717–9, 2009;

CAMARGO, J.A., PEREIRA, N., CABELLO, P.R., TERAN, F.J.C., Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para a análise da atividade microbiana de solos sob a aplicação de vinhaça. **Engenharia Ambiental** 6, 264–271, 2009;

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

CARDOZO, C. O. N.; BENEDINI, M. S.; PENNA, M. J. **Viabilidade técnica do uso do composto no plantio comercial de cana-de-açúcar**. São Paulo: Coopersucar, 1988, p. 13-17. (Boletim Técnico 41/88);

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **L6.401** - Solo – Teste de toxicidade com *Eisenia foetida* (minhoca). São Paulo. CETESB, 1990. 13p;

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar**: Safra 2013/2014, primeiro levantamento. Brasília: 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_12_10_34_43_boletim_cana_portugues_10_2013.pdf>. Acesso em: 20 nov. de 2013;

CONEGLIAN, C. M. R.; SIVIERO, A. R.; POLETTI E. C.C.; VENDEMIATI J. A. S.; DRAGONI, G. S.; RIBEIRO, M. S.; ANGELIS, D. F.; FURLAN, L.T.; GONÇALVES, R. A. Evaluation Of Biodegradation In The Soil Of Oil Residues From A Petroleum Refinery. **HOLOS Environment**, v.6 n.2 - p.106-117, 2006;

COTELLE, S.; MASFARAUD, J.F.; FÉRARD, J.F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and *Tradescantia*-micronucleus assays, **Mutation Research**, v.426, p.167–171, 1999;

CHELINHO, S.; MOREIRA-SANTOS, M.; LIMA, D.; SILVA, C.; VIANA, P.; ANDRÉ, S.; LOPES, I.; RIBEIRO, R.; FIALHO, A.M.; VIEGAS, C.A.; SOUSA, J.P. Cleanup of atrazinecontaminated soils: ecotoxicological study on the efficacy of a bioremediation tool with *Pseudomonas* sp. ADP. **J. Soils Sediments**, v.10, p.568–578, 2010;

CHEN, C.; ZHOU, Q.; LIU, S.; XIU, Z. Acute toxicity, biochemical and gene expression. responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. **Chemosphere**, v.83, p.1147–1154, 2011;

DASGUPTA R., CHAKRAVORTY P.P., KAVIRAJ A., Effects of carbaryl, chlorpyrifos and endosulfan on growth, reproduction and respiration of tropical epigeic earthworm, *Perionyx excavatus* (Perrier). **J Environ Sci Health B.**, v. 47(2), p.99-103, 2012.

DE SILVA P.M.C.S., VAN GESTEL C.A.M. Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. **Chemosphere** 77 (2009) 1609–1613 (2009);

DOMÍNGUEZ, J.; VELANDO, A.; FERREIRO, A. Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species? **Pedobiologia**, v. 49, n. 1, p. 81- 87, 2005;

EMBRAPA. **Impacto Ambiental da cana-de-açúcar**. Campinas: 2013. Disponível em: < <http://www.cana.cnpm.embrapa.br/setor.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2013;

EGITO, L. C. M.; MEDEIROS, M.G.; MEDEIROS, S. R. B.; AGNEZ-LIMA, L. F.; Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.435-441 2007;

EVSEEVA, T. I.; GERA'KIN, S. A.; SHUKTOMOVA, I. I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of Allium-test. **Journal of Environmental Radioactivity**, Oxford, v. 68, p. 235-248, 2003;

FRAVET, P. R. F.; SOARES, R. A. B.; LANA, R. M. Q.; LANA, Â. M. Q.; KORNDÖRFER, G. H. Efeito de doses de torta de filtro e modo de aplicação sobre a produtividade e qualidade tecnológica da soqueira de cana-de-açúcar. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 618–624, 2010.

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

GRANT, W.F. Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. *Environmental Health Perspectives*, v.27, p.37-43, 1978;

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. **Mutation Research**, v.99, p.273-291, 1982;

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

GROVER, I.S.; DHINGRA, A.K.; ADHIKARI, N.; LADHAR, S.S. Genotoxicity of pesticides, in: M.L. Mendelsohn, R.J. Albertini (Eds.), *Mutation and the Environment: Part E*, Wiley Liss, New York, p.91–106, 1990;

GRUMIAUX, F.; DEMUYNCK, S.; SCHIKORSKI, D.; LEMIÈRE, S.; LEPRÊTE, A. Assessing the effects of FBC ash treatments of metal-contaminated soils using life history traits and metal bioaccumulation analysis of the earthworm *Eisenia Andrei*. **Chemosphere**, v.79, p.156-161, 2010;

GUARNIERI, L. C.; JANUZZI, G. M. Proálcool: Impactos ambientais. **Revista Brasileira de Energia**. v. 2 , n. 2, p. 6-10, 1992CORTEZ et al., 1992;

GUPTA, N.; TRIPATHI, S.; BALOMAJUMDER, C. Characterization of pressmud: A sugar industry waste. **Fuel**, v. 90, n. 1, p. 389–394, 2011

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 714–719, 1977;

HAMELINK J. L., LANDRUM, P. F., BERGMAN, H. L. e BENSON, W. H. (1994). Bioavailability: Physical, Chemical and Biological Interactions. CRC Press, Boca Raton, FL. Hare;

HANSON, K.G.; DESAI J.D.; DESAI A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, n. 10, p. 745-748, 1993;

HERRERO O., PÉREZ MARTÍN J.M., FERNÁNDEZ FREIRE P., CARVAJAL LÓPEZ L., PEROPADRE A., HAZEN M.J. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research**, v.743, p.20– 24 2012;

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

KAAKINEN J., VÄHÄOJA P., KUOKKANEN T. E ROPPOLA K. Studies on the Effects of Certain Soil Properties on the Biodegradation of Oils Determined by the Manometric Respirometric Method. **Journal of Automated Methods and Management in Chemistry**, v. 2007, p.34601, 2007

KARHU M., KAAKINEN J., KUOKKANEN T., RÄMÖ J. Biodegradation of Light Fuel Oils in Water and Soil as Determined by the Manometric Respirometric Method, **Water, Air, and Soil Pollution** v. 197, i. 1-4, p. 3-14, 2009;

KORNDORFER, G. H.; ANDERSON, D. L. Use and impact of sugar-alcohol residues vinasse and filter cake on sugarcane production in Brazil. **Sugar y Azucar**, Englewood Cliffs, NJ., n. 92, v. 3, p. 26-35, 1997;

KORNDÖRFER, A. P. A importância do silício nas relações entre herbívoros e *Davilla elliptica* (Dilleniaceae) St. Hill no cerrado. 2006. 31f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais– universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2006;

LACHANCE, B.; RENOUX, A.Y.; SARRAZIN, M.; HAWARI, J.; SUNAHARA, G.I. Toxicity and bioaccumulation of reduced TNT metabolites in the earthworm *Eisenia andrei* exposed to amended forest soil. **Chemosphere**, v.55, p.1339–1348, 2004;

LANGDON, C.J.; PIEARCE, T.G.; MEHARG, A.A.; SEMPLE, K.T. Interactions between earthworms and arsenic in the soil environment: a review. **Environmental Pollution**, v.124, p.361–373, 2003;

LANNO, R.; WELLS, J.; CONDER, J.; BRADHAM, K.; BASTA, N. Bioavailability of chemicals in soil for earthworms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 39-47, 2004.

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. **Aquat. Toxicol.**, v.88, p.214–219, 2008;

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

LIU, D., JIANG, W., WANG, W., ZHAO, F., LU, CH. Effects of lead on root growth, cell division and nucleus of *Allium cepa*. **Environmental Pollution**, v. 86, p.1-4, 1994;

LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Evaluation of the biodegradation of different types of lubricant oils in liquid medium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1285–1290, 2009

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

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

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M. A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v.85, p.13-18, 2011.

MAZZEO D.E.C., Avaliação da viabilidade do lodo de esgoto como condicionante de solos agrícolas, após processo de atenuação natural, por meio de diferentes bioensaios - Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2013;

MIGID, A.H.M.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent, **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.66, p.57–64, 2007;

MOREIRA, R.; SOUSA, J.P.; CANHOTO, C. Biological testing of a digested sewage sludge and derived composts. **Bioresource Technology**, v.99, n.17, p.8382–8389, 2008;

MDIC, 2013. Conhecendo o Brasil em Números – Knowing Brazil in Numbers, Outubro, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, Brasília, 2013

NARDIN, R. R. Torta-de-filtro aplicada em argissolo e seus efeitos agronômicos em duas variedades de cana-de-açúcar colhidas em duas épocas. 2007. 51 f. **Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas**, Campinas, 2007;

NATAL-DA-LUZ, T.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J.P. Avoidance tests with collembolan and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.23, p.2188–2193, 2004;

NATAL-DA-LUZ, T.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J.P. Avoidance tests in site-specific risk assessment - influence of soil properties on the avoidance response of Collembola and earthworms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.27, p.1112-1117, 2008;

NUNES JÚNIOR, D.; PINTO, R.S.A.; KIL, R.A. Indicadores de desempenho da agroindústria canavieira. Ribeirão Preto: Instituto de desenvolvimento agroindustrial, 1998, 119p;

NUNES JUNIOR, D. Torta de Filtro: de resíduo a produto nobre. Revista Idea News, ano 8, n. 92, p. 22-30, Junho, 2008;

PIACENTE, F. J. Agroindústria canavieira e o sistema de gestão ambiental: o caso das usinas localizadas nas bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí. 181 p. Dissertação de Mestrado. Campinas: UNICAMP, 2005;

PINTO, L. F. G. Avaliação do cultivo da cana-de-açúcar em sistemas agroflorestais em Piracicaba, f. 116 - Tese (Doutorado em Agronomia - Fitotecnia), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba-SP 2002;

PIOLA, L.; FUCHS, J.; ONETO, M.L.; BASACK, S.; KESTEN, E.; CASABÉ, N. Comparative toxicity of two glyphosate-based formulations to *Eisenia andrei* under laboratory conditions. **Chemosphere**, v.91, p.545–551, 2013;

RAMALHO, J.; SOBRINHO, N. A. Metais pesados em solos cultivados com cana-de-açúcar pelo uso de resíduos agroindustriais. **Floresta e ambiente**, p. 120-129, 2001

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutation Research*, v.418, p.113-119, 1998;

RANK J., LOPEZ L.C., NIELSEN M.H, MORETTON J., Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories, **Hereditas**, v.136, p.13–18, 2002;

RODELLA, A.A.; SILVA, L.C.F. DA; FILHO, J.O. Effects of filter cake application on sugarcane yields. **Turrialba**, v. 40, n.3, p. 323 – 326, 1990;

RUPPERT, E. E.; BARNER, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca. p. 1129, 1996

SIVIERO, A. R.; CORAUCCI, B. F.; ALBUQUERQUE, A. F.; PONEZZI, A. N.; CAMPOS, C.A. O solo como agente na biodegradação de óleo essencial cítrico. In: SIMPOSIO LATINO-AMERICANO DE TRATAMIENTO Y REUSO DEL AGUA Y RESIDUOS INDUSTRIALES. 1, 1998, México. Anais...México, 1998;

SIVIERO, A. R. **Avaliação da biodegradação em solo de resíduos sólidos de fundição - areia fenólica - utilizando o método respirométrico.** 1999. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1999;

SOUZA, T.S.; HEINCKLEIN, F.A.; ANGELIS, D.F.; FONTANETTI, C.S. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 1627-1636, 2013;

SOUZA T.S., HENCKLEIN F.A., ANGELIS D.F., GONCALVES R.A., FONTANETTI C.S., The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation, **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 72, p. 1363 – 1368, 2009;

SRIVASTAVA K., MISHRA K.K, Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*, **Pest. Biochem. Physiol.**, v.93,p.8–12, 2009;

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO – ÚNICA. **Dados de Produção de Etanol no Brasil 2010**, Levantamento 2010, São Paulo, 2010. Disponível em <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso 18 de Agosto de 2011;

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 6010c** - Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry. Alexandria: USEPA, 2007. 6000 Series Methods. 64 p.

Van STEMPVOORT D. E BIGGAR K., Potential for bioremediation of petroleum hydrocarbons in groundwater under cold climate conditions: A review, **Cold Regions Science and Technology**, p.53, p.16-41,2007;

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

VENTURA-CAMARGO B.C., MALTEMPI P.P.P., MARIN-MORALES M.A. The use of the Cytogenetic to Identify Mechanisms of Action of an Azo Dye in *Allium Cepa* Meristematic Cells. **J Environment Analytic Toxicol** vol.1, p.109, 2011;

WHITE, P.A., CLAXTON, L.D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutat. Res.**,v.567, p.227-345, 2004;

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

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G.; Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **analytica chimica acta**, v.606, p.135–150, 2008KLOBUCAR et al., 2003;