

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

**GLAUCIA DE MELLO CUNHA GOUVEA**

**CRESCIMENTO DE MUDAS DE *Coffea arabica* L. EM SUBSTRATO  
COM LODO DE ESGOTO E AVALIAÇÃO DE SUA TOXICIDADE**

ALEGRE-ES

2016

GLAUCIA DE MELLO CUNHA GOUVEA

**CRESCIMENTO DE MUDAS DE *Coffea arabica* L. EM SUBSTRATO  
COM LODO DE ESGOTO E AVALIAÇÃO DE SUA TOXICIDADE**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiana da Silva Souza

Coorientador: Prof.<sup>o</sup> Dr. Glaucio de Mello Cunha

ALEGRE-ES

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Gouvêa, Glaucia de Mello Cunha, 1975-

G719c      Crescimento de mudas de Coffea arabica L. em substrato com lodo de esgoto e avaliação de sua toxicidade / Glaucia de Mello Cunha Gouvêa. – 2016.

54 f. : il.

Orientadora: Tatiana da Silva Souza.

Coorientador: Glaucio de Mello Cunha.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Crescimento (Plantas). 2. Biossólidos. 3. Citotoxicidades. 4. Genotoxicidade. 5. Mutagenicidade. 5. Águas residuais – Purificação. I. Souza, Tatiana da Silva. II. Cunha, Glaucio de Mello. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 575:631

---

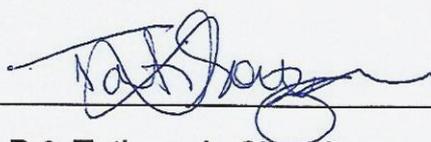
**GLAUCIA DE MELLO CUNHA GOUVEA**

**CRESCIMENTO DE MUDAS DE *Coffea arabica* L. EM SUBSTRATO COM  
LODO DE ESGOTO E AVALIAÇÃO DE SUA TOXICIDADE**

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção de título de Mestre em Genética e Melhoramento.

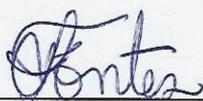
Aprovada em 30 de agosto de 2016.

**COMISSÃO EXAMINADORA**



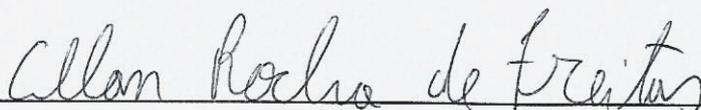
---

Prof.ª Dr.ª Tatiana da Silva Sousa  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora



---

Prof.ª Dr.ª Milene Miranda Praça Fontes  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Examinador Interno



---

Dr. Allan Rocha de Freitas  
Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo  
Examinador Externo

É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.  
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver”.

*Martin Luther King*

Aos meus filhos, Daniel e Melissa, dedico.

A Deus por permitir mais uma conquista na minha vida... Ofereço!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por abrir e iluminar meu caminho e permitir mais uma vez que eu alcançasse mais um sonho. Sonho em que perdi pelo tempo ao priorizado outros caminhos, mas Ele sabe de tudo e que para tudo há um tempo bom. Oportunidades? Muitas. Graças a Ele!

Aos meus filhos, peço perdão pela ausência e por, em alguns momentos, minha impaciência durante esses dois anos. Tudo que faço é pensando no bem de vocês.

À minha mãe, que me apoiou principalmente nesses dois anos. Mesmo diante de problemas pessoais e inúmeros compromissos para concluir o tão sonhado mestrado, sempre esteve presente ao meu lado.

Ao Glauco, meu irmão mais velho, meu padrinho, meu professor, meu orientador durante a graduação e agora meu co-orientador. Obrigado pelos conselhos e pela sua proteção sempre!

A minha família!

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiana da Silva Souza, por me auxiliar a adquirir conhecimentos científicos, pela paciência, pela disposição e por aceitar ser minha orientadora.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Milene Miranda Praça Fontes e ao Prof<sup>o</sup> Dr. Allan Rocha de Freitas, por terem aceitado o convite para fazerem parte da comissão examinadora. Quero deixar claro também Allan que, além de fazer parte da comissão avaliadores, você me ajudou muito no início do projeto de pesquisa. Agradeço muito!

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de desenvolver mais uma pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento.

Aos meus amigos que ganhei durante esses dois anos, muito obrigada por tudo!!  
Ao Victor Ventura, a simpatia em pessoa, sou grata por seu apoio.

Aos meus amados Ludimila e Leandro.

Aos laboratoristas Viviane Tavares, Marcelo Sousa, Diego. Ao Oswaldo e Roberto Mauri e à Sabrina Lino Furtado, meu sincero agradecimento.

## RESUMO

O tratamento do esgoto doméstico tem ocasionado a produção de grande quantidade de resíduo sólido, o lodo de esgoto, sendo uma problemática ambiental. Por ser fonte de nutrientes essenciais para o desenvolvimento de plantas de interesse agrônômico é, sem dúvida uma das melhores alternativas para sua disposição final. Todavia, a reciclagem do lodo de esgoto deve ocorrer de forma segura à população e ao ambiente, uma vez que o resíduo pode conter compostos orgânicos e inorgânicos, como os metais pesados tóxicos, além de patógenos. Objetivou-se com este estudo analisar o crescimento de mudas de *Coffea arabica* L. no substrato composto com lodo de esgoto higienizado bem como o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do lodo por meio do bioensaio de toxicidade genética em *Allium cepa*. O experimento foi conduzido em condições de viveiro. Os substratos utilizados foram: solo (Horizonte B argissolo) nas proporções de 85% para o tratamento T1 acrescido de 15% de esterco bovino, 85% para o tratamento T2 com adição de 15% de lodo de esgoto higienizado, 70% para o tratamento T3 acrescido de 30% de lodo esgoto higienizado, 55% para o tratamento T4 acrescido de 45% de lodo de esgoto higienizado e 40% para o tratamento T5 acrescido de 60% de lodo de esgoto higienizado, perfazendo cinco tratamentos com seis repetições. Foram avaliadas variáveis de crescimento após o período de formação das mudas e, posteriormente, foi realizada a análise de toxicidade dos substratos em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa*, sendo que 5.000 células foram analisadas por tratamento de contato direto e solubilizados das amostras e controles. Todas as variáveis foram afetadas negativamente a partir do incremento de lodo de esgoto higienizado. Os tratamentos com lodo de esgoto por contato direto apresentaram efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico. Os tratamentos com lodo de esgoto solubilizado apresentaram efeito genotóxico. O uso de lodo de esgoto higienizado em substratos para formação das mudas de café não foi eficiente por motivos de toxicidade, não favorecendo o seu crescimento.

Palavra-chave: crescimento inicial, biossólido, genotoxicidade, mutagenicidade

## ABSTRACT

The treatment of domestic sewage has caused the production of large quantities of solid waste, sewage sludge, being an environmental problem. Being source of essential nutrients for the development of agronomic interest plants is undoubtedly one of the best alternatives for final disposal. However, recycling of sewage sludge is safely occur to people and the environment since the waste can contain organic and inorganic compounds, such as toxic heavy metals, and pathogens. The objective of this study to analyze the growth of *Coffea arabica* L. seedlings in the substrate compound sewage sludge sanitized and the potential cytotoxic, genotoxic and mutagenic sludge through genetic toxicity bioassay *Allium cepa*. The experiment was conducted in greenhouse conditions. The substrates used were: soil (Horizon B ultisol) in 85% proportions for the treatment T1 plus 15% of cattle manure, 85% for T2 treatment with addition of 15% sanitized sewage sludge, 70% for treatment T3 plus 30% of sanitized sewage sludge, 55% for T4 treatment plus 45% of sanitized sewage sludge and 40% for T5 treatment plus 60% of sanitized sewage sludge, comprising five treatments with six replications. Growth variables were measured after the period of seedlings formation and subsequently the substrates. Toxicity analyzes were performed in root meristem cells of *Allium cepa*, with 5.000 cells were analyzed by direct contact treatment and solubilized samples and controls. All variables were negatively affected from the sewage sludge increment sanitized. The treatments with sewage sludge by direct contact showed cytotoxic, genotoxic and mutagenic effect. Treatments with solubilized sewage sludge showed genotoxic effect. The use of sewage sludge sanitized substrates for the formation of coffee seedlings was not efficient for reasons of toxicity, not favoring their growth.

Keyword: initial growth, biosolids, genotoxicity, mutagenicity

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Germinação de sementes de *A. cepa* após exposição aos substratos de diferentes concentrações de lodo de esgoto higienizado da Estação de Tratamento de Esgoto Mulembá por contato direto. T1: 0% de lodo de esgoto higienizado, T2: 15% de lodo de esgoto higienizado, T3: 30% de lodo de esgoto higienizado, T4: 45% de lodo de esgoto higienizado, T5: 60% de lodo de esgoto higienizado, controle negativo: água destilada; controle positivo: colchicina 0,025%  
..... 29
- Figura 2. Valor estimado da altura (cm) em função das doses de lodo de esgoto higienizado (%).....32
- Figura 3. Valor estimado do diâmetro do caule (cm) em função das doses de lodo de esgoto higienizado (%).....32
- Figura 4. Valor estimado da área foliar (cm<sup>2</sup>) em função das doses de lodo de esgoto higienizado (%).....33
- Figura 5. Valor estimado da matéria seca da parte aérea (g) em função das doses de lodo de esgoto higienizado (%).....33
- Figura 6. Valor estimado da matéria seca da raiz (g) em função das doses de lodo de esgoto higienizado (%).....34
- Figura 7. Principais alterações mitóticas e cromossômicas observadas em *A. cepa* após exposição a diferentes concentrações de lodo de esgoto higienizado ou lodo bruto. (A) Aderência cromossômica (seta); (B) Broto nuclear (seta); (C) Perda cromossômica (seta); (D) Núcleos poliploides (seta); (E) Micronúcleo (seta); (F) Núcleo lobulado (seta); (G) Células binucleadas (seta); (H) Núcleo periférico (seta); (I) Atraso cromossômico (seta); (H) Ponte cromossômica (seta)  
..... 38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise de metais pesados e parâmetros microbiológicos (coliformes termotolerantes, ovos de helmintos e *Salmonella*) do lodo bruto da Estação de Tratamento de Esgoto Mulembá ..... 23

Tabela 2. Constituição dos substratos preparados a partir do lodo de esgoto higienizado da Estação de Tratamento de Esgoto Mulembá para a produção de mudas de *C. arabica* ..... 24

Tabela 3. Análise química dos substratos constituídos por esterco bovino (testemunha) e por lodo de esgoto higienizado da Estação de Tratamento de Esgoto Mulembá  
..... 31

Tabela 4. Média  $\pm$  desvio padrão do índice mitótico (IM), aberrações mitóticas e cromossômicas (AMC) e de micronúcleos (MN) + quebras cromossômicas (QC) em células meristemáticas radiculares de *A. cepa*, após exposição aos substratos de diferentes concentrações de lodo de esgoto higienizado por contato direto e controles  
..... 37

Tabela 5. Média  $\pm$  desvio padrão do índice mitótico (IM), aberrações mitóticas e cromossômicas (AMC) e de micronúcleos (MN) + quebras cromossômicas (QC) em células meristemáticas radiculares de *A. cepa*, após exposição aos substratos de diferentes concentrações de lodo de esgoto higienizado solubilizados e controles  
..... 37

Tabela 6. Média  $\pm$  desvio padrão das alterações mitóticas e cromossômicas observadas em células meristemáticas radiculares de *A. cepa*, após exposição aos substratos de diferentes concentrações de lodo de esgoto higienizado contato direto e controles..... 39

Tabela 7. Média  $\pm$  desvio padrão das alterações mitóticas e cromossômicas observadas em células meristemáticas radiculares de *A. cepa*, após exposição aos substratos de diferentes concentrações de lodo de esgoto higienizado solubilizados e controles  
..... 40

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1 Composição do lodo de esgoto .....	14
2.2 Uso agrícola do lodo de esgoto .....	15
2.2.1 Produção de mudas de qualidade: premissa para a sustentabilidade da lavoura cafeeira .....	17
2.3 Genética toxicológica .....	18
2.4 Toxicidade do lodo de esgoto .....	19
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	21
3.1 Objetivo geral .....	21
3.2 Objetivos específicos .....	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1 Material biológico .....	22
4.2 Lodo de esgoto .....	22
4.2.1 Coleta e características do lodo de esgoto quanto à concentração de metais e parâmetros microbiológicos .....	22
4.2.2 Higienização do lodo de esgoto .....	23
4.2.3 Preparo dos substratos contendo lodo de esgoto higienizado .....	24
4.2.4 Análise química dos substratos .....	24
4.2.5 Solubilização dos substratos e do lodo bruto .....	25
4.3 Semeadura, desenvolvimento das mudas e avaliação das variáveis altura, diâmetro do colo, matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz e área foliar ..	25
4.3.1 Análise estatística para o desenvolvimento das mudas .....	26
4.4 Bioensaio com <i>A. cepa</i> .....	26
4.4.1 Análise estatística para o bioensaio com <i>A. cepa</i> .....	28
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
5.1 Análise química dos substratos .....	30

5.2 Crescimento das mudas e análise das variáveis altura, diâmetro do colo, matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz e área foliar.....	31
5.3 Bioensaio com <i>A. cepa</i> .....	36
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As estações de tratamento de esgoto (ETEs) geram um resíduo sólido denominado de lodo de esgoto. Durante os processos biológicos desse tratamento, parte do material orgânico é absorvido e convertido pela biomassa microbiana, onde passa a ser denominado de lodo biológico ou secundário, constituído de sólidos biológicos, o que passa a ser chamado também de biossólido. Ainda assim, para que esse termo possa ser empregado, é imprescindível que suas características químicas e biológicas sejam compatíveis com alguma utilização produtiva (ANDREOLI et al., 2014).

Como citado por Bettioli e Camargo (2006) há alternativas para o aproveitamento ou disposição final do lodo de esgoto como a disposição em aterro sanitário, reuso industrial (produção de agregado leve, fabricação de tijolos e cerâmica e produção de cimento), incineração, descarga oceânica, “landfarming” (disposição superficial no solo), conversão em óleo combustível, recuperação de áreas degradadas e uso agrícola.

O uso agrícola do lodo de esgoto deve-se as suas características químicas, físicas e biológicas. Neste contexto, pesquisadores do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) e da Companhia Espírito Santense de Saneamento (CESAN) desenvolveram estudos possibilitando a aplicação do lodo de esgoto em solos agrícolas do estado do Espírito Santo, utilizando como referência a Resolução nº 375 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) de 2006. A partir desse estudo foram levantadas áreas com alto potencial para aplicação do biossólido, representando cerca de 42% de todo o Espírito Santo (COSTA et al., 2011).

A área explorada com a cafeicultura (espécies arábica e conilon) no país totaliza 2.311.599 hectares. Desse total, 295.173,9 hectares (12,77%) estão em formação e 2.016.425,2 hectares (87,23%) estão em produção. Em Minas Gerais está concentrada a maior área com 1.231.778 mil hectares, predominando a espécie arábica com 98,85% no Estado. No Espírito Santo está a segunda maior área plantada com a cultura cafeeira, totalizando 499.082 hectares, sendo 311.197 hectares com a espécie conilon e 187.885 hectares com a arábica (CONAB, 2013). A cafeicultura é uma das atividades de maior importância no Espírito Santo em função do grande valor social e econômico, sendo considerado um

sustentáculo econômico de 80% dos municípios e responde por 43% do PIB agrícola capixaba (INCAPER, 2010).

De acordo com Martins (2003), as plantas de café são bastante exigentes em nutrientes, extraindo e exportando quantidades variáveis de nutrientes do solo de um ano para outro, em decorrência da sua bienalidade de produção. A adubação orgânica no cafeeiro tem grande importância por subsidiar o fornecimento de nutrientes e melhorias nas propriedades físicas do solo. Dessa forma, a cultura do café possui característica promissora quanto a reciclagem do lodo de esgoto, podendo ser uma alternativa viável para uso.

A presença de contaminantes no esgoto está diretamente ligada ao recebimento de efluentes industriais na rede coletora. No entanto, o esgoto exclusivamente residencial também apresenta teores de metais pesados, embora relativamente baixos (ANDREOLI et al. 2014). Ensaio de toxicidade genética utilizando vegetais superiores se mostram capazes de apontar os efeitos biológicos desses contaminantes (MAZIVIERO, 2011).

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho: a) avaliar o crescimento de mudas de *Coffea arabica* em substrato contendo diferentes doses de lodo de esgoto higienizado e b) avaliar a toxicidade do resíduo por meio de testes biológicos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Composição do lodo de esgoto

A ETE opera pelo processo de lodo ativado, onde o esgoto é submetido à aeração, sendo que à medida que a quantidade de oxigênio é introduzida na mistura por meio dos aeradores favorece o desenvolvimento de bactérias aeróbias que digerem a matéria orgânica. Esses microrganismos crescem e se aglomeram na forma de flocos, passando a ser denominado de lodo ativado ou lodo biológico. Esse tratamento é considerado como um dos mais eficientes, modernos e difundidos pelo mundo, por ser totalmente biológico excluindo adição de produtos químicos (CESAN, 2013).

O enriquecimento e a disponibilidade nutricional para absorção das plantas com a aplicação do lodo de esgoto nos solos apresentam evidentes reflexos na produtividade, podendo ser igual e superior à adubação química (RIBEIRINHO et al., 2012; FREITAS et al., 2015).

O lodo de esgoto apresenta elevada concentração de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo. Por esse motivo tem sido indicado para a aplicação na agricultura trazendo como benefícios o aporte de nutrientes no solo, contribuindo para melhorar suas propriedades físicas, químicas e biológicas, conseqüentemente aumentando a produtividade agrícola. Entretanto, seu uso pode resultar em adição direta de patógenos e substâncias químicas não desejáveis ao solo agrícola e, por conseguinte, a cadeia alimentar (SAITO, 2007).

Os principais riscos associados com a reutilização do lodo de esgoto referem-se a questão dos metais pesados, compostos orgânicos, nitrogênio e também com relação aos aspectos sanitários. Tanto os metais quanto os agentes patogênicos como ovos de helmintos, esporos de fungos e colônias de bactérias tendem a co-precipitar com o esgoto e se concentrar no lodo. Porém, o risco de contaminação por patógenos é eliminado com a adoção de tecnologias como o uso da calagem ou a compostagem, que levam a redução destes organismos a níveis compatíveis com a reciclagem (ANDREOLI et al., 1999).

Segundo Malavolta (1994), os metais pesados são elementos que possuem peso específico maior do que  $5 \text{ g. cm}^{-3}$  ou número atômico maior do que 20. Bard e Zoski (2000) afirmam que os metais pesados diferenciam-se dos compostos

orgânicos tóxicos, por acumularem-se nos componentes do ambiente onde manifestam sua toxicidade e por serem absolutamente não-degradáveis.

O metal pesado, no contexto da perspectiva ambiental, é aquele que em determinadas concentrações e tempo de exposição, oferece risco à saúde humana e ao ambiente, prejudicando a atividade dos organismos vivos. Metais como zinco, magnésio, cobalto e ferro, em doses muito pequenas são essenciais à maioria dos organismos vivos, porém se tornam tóxicos para a saúde humana quando ultrapassam determinadas concentrações-limite. O chumbo, mercúrio e o cádmio são metais que não existem em nenhum organismo vivo, portanto a presença destes metais é prejudicial em qualquer concentração. A problemática quanto os metais pesados está na condição de não serem destruídos e apresentarem a característica de altamente reativos do ponto de vista químico (ANDREOLI et al., 2014). Segundo Migid et al. (2007), metais pesados são extremamente tóxicos em pequenas concentrações e não são biodegradáveis. De acordo com Andreoli et al. (2014), compostos orgânicos são biodegradados lentamente e persistem por longo período de tempo no meio ambiente, tem efeito bioacumulativo, podendo estar presente em quantidades elevadas nos níveis tróficos mais altos da cadeia alimentar.

Os contaminantes nos resíduos estão relacionados com os destinos diversos que podem ter quando aplicados no solo, dependendo das características físico-químicas podem sofrer volatilização para a atmosfera, lixiviação para águas subterrâneas, degradação química e biológica, absorção pelas plantas e bioacumulação em organismos que se alimentam de materiais ou de outros organismos contaminados (SAITO, 2007).

## **2.2 Uso agrícola do lodo de esgoto**

A Resolução nº 375 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (BRASIL, 2006) estabelece critérios e procedimentos para o uso agrícola do lodo de esgoto gerado em estação de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, levando em consideração a proteção do meio ambiente e a saúde da população. Delimitando as quantidades máximas de substâncias inorgânicas e orgânicas presentes no lodo de esgoto, na qual estão indicados os critérios e os

procedimentos para seu uso adequado tomando como base a elevação de pH, acúmulo de metais pesados no solo e quantidade de nitrogênio disponível.

Esta resolução também define quais culturas são capazes de receberem esse resíduo, sendo proibida sua utilização em pastagens ou poderão ser implantadas após um período de 24 meses da última aplicação, e em cultivo de olerícolas, tubérculos, raízes e culturas inundadas, bem como as demais culturas cuja parte comestível entre em contato direto com o solo.

Algumas pesquisas sugerem o uso do lodo de esgoto em relação ao crescimento das plantas e benefícios nutricionais. Guedes et al. (2006) constataram que o uso do lodo de esgoto na forma de biossólido tem um efeito condicionador de solos e também como fertilizante em mudas de *Eucalyptus grandis*, permitindo o crescimento de plantas e, conseqüentemente, aumento da produtividade. Na cultura de girassol, Ribeirinho et al. (2012) observaram que a utilização de lodo de esgoto é viável quanto o crescimento das plantas, demonstrando que a produtividade é equivalente à obtida pela adubação mineral, com teores adequados de macro e micronutrientes na planta, desde que realizada a complementação potássica no lodo. Desta forma, o efeito residual da aplicação sucessiva de lodo de esgoto mostrou ser importante fonte de fósforo para a cultura, somado ao efeito benéfico da matéria orgânica que, provavelmente, favoreceu a disponibilidade de fósforo. Bezerra et al. (2005) ao aplicarem lodo de esgoto no algodoeiro, observaram que a altura da planta, o diâmetro do caule e a área foliar aumentaram, obtendo-se máximos valores quando as plantas foram irrigadas com água residuária, evidenciando a importância da sua utilização no crescimento e desenvolvimento dessa cultura.

Garcia et al. (2009) ao aplicarem doses de lodo de esgoto doméstico em mudas de eucalipto, verificaram o aumento dos teores foliares de nitrogênio, fósforo, potássio, zinco e cobre, diminuição dos teores de magnésio, boro e ferro, permanecendo o teor foliar de manganês constante. Bonomo (2014) avaliando os parâmetros de crescimento (diâmetro e altura do caule, número de folhas, área foliar, área foliar específica, incremento de raiz e parte aérea e razão raiz/parte aérea) em indivíduos de *Carica papaya*, observou resposta positiva quanto ao acréscimo de lodo de esgoto higienizado, apresentando comportamento de dose dependência.

Scheer et al. (2010), estudaram a utilização de compostos a base de lodo compostado para a produção de mudas de *Parapiptadenia rigida* (gurucaia). Nesse estudo, realizado por estes autores, verificaram que os resultados foram bastante

promissores indicando que o crescimento da altura, diâmetro do colo, biomassa de ramos e folhas foram maiores que os tratamentos com substrato comercial a base de casca de *Pinus* compostada e vermiculita.

Cunha et al. (2006) avaliando o desenvolvimento de mudas de *Acacia mangium* e *Acacia auriculiformis* em diferentes substratos contendo lodo de esgoto e esterco bovino como fontes de materiais orgânicos, observaram que o substrato composto de lodo de esgoto 100% com sementes inoculadas proporcionou maior desenvolvimento às mudas.

### **2.2.1 Produção de mudas: premissa para a sustentabilidade da lavoura cafeeira**

A produção de mudas de café apresenta um papel de extrema relevância para o sucesso do agronegócio. Quando esta etapa é bem direcionada, a produção de café se torna uma atividade sustentável com a obtenção de maior produtividade e menor custo de produção. Visto que essa etapa da cadeia produtiva é considerada importante, vários trabalhos foram realizados buscando a recomendação de um substrato ideal, de forma a assegurar uma nutrição adequada para o bom desenvolvimento da planta. É importante ressaltar que essa etapa deve ser planejada e executada de maneira sistemática, pois qualquer problema com a qualidade das mudas trará resultados negativos durante todo o ciclo de desenvolvimento da cultura cafeeira (TOMAZ et al., 2012).

Estudos utilizando lodo de esgoto na constituição do substrato para mudas de café são escassos. Chaves et al. (2001) avaliaram o efeito do lodo urbano higienizado com cal virgem em associação a outras fontes orgânicas no crescimento de mudas de cafeeiro, constataram que os parâmetros matéria seca total, volume radicular e área foliar em mudas de cafeeiro, obtiveram ótimo crescimento do cafeeiro com a dose de lodo para neutralizar 0,5 (50%) da acidez total do solo, sendo o efeito potencializado na presença do resíduo vegetal palha de café e houve diminuição desses parâmetros morfológicos à medida que houve aumento das doses de lodo, tanto em aplicações isoladas como em associação com resíduos vegetais.

Para Fassarella e Simão (2011), os valores da altura de café arábica tenderam a aumentar até a dose de 30% de lodo de esgoto e após essa dose ocorreu um leve declínio da altura das plantas podendo ser explicado pelo aumento de concentração de nutrientes no solo pela adição de lodo.

Martins et al. (2003) avaliando o efeito do lodo de esgoto na nutrição mineral de cafeeiros em produção, constataram que os teores de nutrientes nas folhas e frutos e de metais pesados nos frutos, estiveram dentro de níveis normalmente encontrados para o café, independente da dose de lodo utilizada, confirmando a possibilidade desse produto para a cafeicultura.

### 2.3 Genética toxicológica

A genética toxicológica estuda os processos que alteram a base genética; quer seja em sua estrutura físico-química, DNA (ácido desoxirribonucleico), processo esse classificado de mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético ao nível celular ou orgânico. A genotoxicidade estuda, sob o aspecto genético, o que altera a vida ou induz a morte tanto a nível de célula como de organismo. A genotoxicidade é uma especialidade que se situa na interface entre toxicologia e genética (SILVA et al., 2003).

Existem compostos químicos com elevada citotoxicidade, capazes de inibir totalmente as divisões celulares. Esse efeito citotóxico é caracterizado por alterações celulares causadas por injúria, que levam a célula a iniciar seu processo de morte. Uma das formas de averiguar a citotoxicidade de diferentes agentes é a verificação da frequência do índice mitótico e a observação de alterações celulares morfológicas que indicam a morte celular (SILVA et al. 2003; RIBEIRO et al. 2003). O termo genotoxicidade se adequa a agentes capazes de induzir danos no material genético. Neste caso, essas alterações, seja nos cromossomos ou no DNA, são suscetíveis a reparo, não resultando em uma célula com mutação (SILVA et al. 2003; RIBEIRO et al. 2003). A mutagenicidade é caracterizada por ação de agentes aptos a causarem danos nos cromossomos ou no DNA. No entanto, essas alterações não são passíveis de serem reparadas pela célula e são herdadas pelas novas gerações celulares, resultando numa mutação (SILVA et al. 2003; RIBEIRO et al. 2003).

O potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de químicos encontrados no ambiente pode ser analisado por meio do teste de *Allium cepa*, devido sua sensibilidade e boa correlação com sistemas-testes de mamíferos (GRANT, 1982). Segundo Caritá (2010) espécies vegetais têm sido usadas como biomonitores de toxicidade de poluentes, dentre eles, o *A. cepa* é o mais utilizado devido às características como rápido crescimento de raízes, grande número de células em divisão, alta tolerância a diferentes condições de cultivo, disponibilidade durante o

ano todo, fácil manuseio, apresenta número de cromossomos reduzido ( $2n = 16$ ) e de grande tamanho, são facilmente corados e observados. Além dessas vantagens, permite a avaliação dos mecanismos de ação dos agentes químicos testados (MARIN-MORALES e CARITÁ, 2008).

## 2.4 Toxicidade do lodo de esgoto

Efluentes industriais e domésticos contêm compostos químicos com alto risco de danos genotóxicos que pode sofrer ou não degradação durante o tratamento do efluente. Alguns desses compostos apresentam natureza lipofílica e acabam ficando retidos no lodo de esgoto. Os estudos mostram que apesar desse resíduo ser indicado como fertilizante para a agricultura, há uma série de problemas inerentes a sua aplicação, afetando os organismos no ecossistema bem como os seres humanos devido a sua acumulação na cadeia alimentar (RANK e NIELSEN, 1998). De acordo com Mielli et al. (2009), é importante caracterizar o potencial toxicológico do lodo de esgoto, mesmo que esse resíduo tenha propriedades valiosas. Solano et al. (2009) ao realizarem testes de toxicidade *in vivo* com roedores, verificaram que não houve aumento significativo na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados na medula óssea do fêmur ou nos níveis de danos do DNA de leucócitos do sangue periférico a partir do uso do lodo de esgoto. Corroborando com esses resultados, Mielli et al. (2009) ao avaliarem amostras coletadas em quatro estações de tratamento de esgoto diferentes localizadas no estado de São Paulo, observaram que no clone # 4430 duas amostras de lodo induziram toxicidade enquanto em *Tradescantia pallida* três amostras testadas mostraram resultados positivos quanto a frequência de micronúcleos, porém sem nenhuma resposta clara de dose-efeito para ambas as plantas.

A mutagenicidade de amostras de lodo gerado de cinco estações de tratamento de esgoto localizadas no estado de São Paulo foi avaliada por meio do teste de Ames. Extratos orgânicos (diclorometano/metanol) e aquosos das amostras de lodo foram testados, sendo que os extratos aquosos apresentaram resultados negativos para o teste e para os extratos orgânicos pelo menos uma amostra de cada ETE apresentou atividade mutagênica (KUMMROW et al., 2010).

O potencial genotóxico e mutagênico do lodo de esgoto foi avaliado em ratos, utilizando o teste do cometa e o teste de micronúcleos. Neste estudo, não observaram

aumento na frequência de danos no DNA nos leucócitos do sangue periférico ou em eritrócitos policromáticos micronucleados na medula óssea (SILVA et al., 2012).

Segundo Martins et al. (2016a), o lodo de esgoto pode provocar diversos danos genéticos em plantas de interesse agrônômico. Compostos tóxicos presentes no lodo de esgoto tendem a bioacumular em tecidos vegetais e podem ser transferidos para consumidores em potencial. Martins et al. (2016b) avaliaram amostras de lodo de esgoto de duas ETE's localizadas no estado do Espírito Santo, ambas recebem efluentes domésticos, e verificaram que as amostras mostraram-se citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas para *A. cepa*. Bonomo (2014) ao analisar a toxidez de lodo de esgoto, observou efeitos genotóxicos e mutagênicos para *A. cepa*, sendo necessária a ponderação quanto ao uso desse resíduo na agricultura.

De acordo com Hopke et al. (1984), amostras de lodo de esgoto induziram significativamente o aumento na frequência de aberrações cromossômicas e micronúcleos sugerindo a necessidade de um estudo mais aprofundado dos possíveis efeitos adversos da aplicação de lodo de esgoto visto que agentes mutagênicos presentes nesse resíduo podem induzir alterações genéticas em células germinativas

Amin (2011) ao investigar as propriedades mutagênicas de um solo tratado com lodo de esgoto, observou que a percentagem total de células mãe de pólen aberrante em *Zea mays* aumentou significativamente com o aumento da concentração de lodo de esgoto.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar o uso do lodo de esgoto higienizado para a produção de mudas de *C. arabica*, bem como estudar a toxicidade genética do mesmo em *A. cepa*.

#### 3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar o crescimento de mudas de *C. arabica* em substratos contendo diferentes doses de lodo de esgoto higienizado.

b) Examinar o potencial citotóxico dos substratos (contato direto), dos substratos solubilizados, do lodo bruto e do lodo bruto solubilizado, por meio do índice mitótico do meristema radicular de *A. cepa*;

c) Analisar o potencial genotóxico dos substratos (contato direto), dos substratos solubilizados, do lodo bruto e do lodo bruto solubilizado, por meio do teste de aberrações mitóticas e cromossômicas em *A. cepa*;

d) Mensurar o potencial mutagênico dos substratos (contato direto), dos substratos solubilizados, do lodo bruto e do lodo bruto solubilizado, por meio da contagem de células micronucleadas e de quebras cromossômicas em *A. cepa*.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material biológico**

#### **Sementes de café arábica**

As sementes de café arábica cultivar IAC 44 foram provenientes de um viveiro localizado no município de Alegre-ES.

#### **Cebola (*A. cepa*)**

Foram utilizadas sementes de cebola (*A. cepa*), cv Baia Periforme, marca Isla<sup>®</sup>, adquiridas comercialmente.

### **4.2 Lodo de esgoto**

#### **4.2.1 Coleta e características do lodo de esgoto quanto a concentração de metais pesados e parâmetros microbiológicos**

Amostras de lodo de esgoto bruto foram coletadas na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Mulembá em maio de 2015. Situada no município de Vitória, no bairro Joana D'Arc, a ETE está localizada nas coordenadas UTM 362074.9 E / 7756362.37 N e atende cerca de 37 bairros (GOMES e BERNADINO, 2013).

Os resultados das análises de metais pesados e microbiológicas do lodo bruto (Tabela 1) foram cedidos pela CESAN. Essas análises foram realizadas pelo Centro Tecnológico de Análises (CETAN). Todos os parâmetros atenderam os limites estabelecidos pela resolução do CONAMA 375/2006.

Tabela 1. Análise de metais pesados e parâmetros microbiológicos (coliformes termotolerantes, ovos de helmintos e *Salmonella*) do lodo bruto da Estação de Tratamento de Esgoto Mulembá

Parâmetro	Resultado	LQ	Resolução CONAMA 375/ (2006)
Arsênio (mg/Kg)	0,63 ± 0,023	0,5	41
Bário (mg/Kg)	16,7 ± 0,66	0,5	1300
Cádmio (mg/Kg)	< 0,5	0,5	39
Chumbo (mg/Kg)	0,58 ± 0,021	0,5	300
Cobre (mg/Kg)	10,4 ± 0,41	0,5	1500
Cromo (mg/Kg)	0,88 ± 0,033	0,5	1000
Mercúrio (mg/Kg)	<0,5	0,5	17
Molibdênio (mg/Kg)	0,61 ± 0,022	0,5	50
Níquel (mg/Kg)	1,24 ± 0,046	0,5	420
Selênio (mg/Kg)	0,95 ± 0,035	0,5	100
Zinco (mg/Kg)	20,3 ± 0,80	0,5	2800
Coliformes Termotolerantes (NMP/g)	1,8 X 10 <sup>6</sup>	1,8	<10 <sup>3</sup> NMP/g de ST
Ovos viáveis de Helmintos (/g Sólidos Totais)	12	0,25	< 0,25 ovo/g de ST
<i>Salmonella</i> spp. (/10g)	2	1	Ausência em 10g de ST

LQ: Limite de Quantificação

#### 4.2.2 Higienização do lodo de esgoto

A higienização do lodo de esgoto foi executada no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. Utilizou-se cal virgem (CaO), que é um produto alcalinizante que eleva o pH do lodo e conseqüentemente promove alteração da natureza coloidal do protoplasma celular dos microrganismos patogênicos de forma letal, e produz um ambiente inóspito para sua sobrevivência (ANDREOLLI et al, 1999).

O processo de caleação consistiu na mistura de cal virgem na proporção de 30% em função do peso seco do lodo. O lodo foi exposto ao sol durante 30 dias, sendo que diariamente esse material foi misturado por meio da utilização de uma enxada com a função de homogeneizar o material para melhorar a exposição ao sol. O lodo foi mantido em cima de lona plástica, tomando os cuidados necessários para evitar qualquer risco de contaminação com o ambiente de acordo com o anexo I da resolução do CONAMA (ANDREOLI et al., 2014).

### 4.2.3 Preparo dos substratos contendo lodo de esgoto higienizado

Segundo a Embrapa (2002), para a produção de mudas preconiza-se a seguinte formulação nas seguintes proporções: 0,7-0,8 m<sup>3</sup> de solo; 0,3 m<sup>3</sup> de esterco bovino; 1,0-2,0 Kg de calcário; 1,0 Kg de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e 0,5 Kg de potássio (K<sub>2</sub>O).

No presente trabalho, os substratos utilizados foram: solo (Horizonte B argissolo) nas proporções de 85% para o tratamento T1 acrescido de 15% de esterco bovino, 85% para o tratamento T2 acrescido de 15% de lodo de esgoto higienizado, 70% para o tratamento T3 acrescido de 30% de lodo esgoto higienizado, 55% para o tratamento T4 acrescido de 45% de lodo de esgoto higienizado, 40% para o tratamento T5 acrescido de 60% de lodo de esgoto higienizado. Perfazendo cinco tratamentos com seis repetições, sendo que para cada tratamento foram preparados 100 litros de substrato (Tabela 2).

Tabela 2. Constituição dos substratos preparados a partir do lodo de esgoto higienizado da Estação de Tratamento de Esgoto Mulembá para a produção de mudas de *C. arabica*

Substratos	T1	T2	T3	T4	T5
Solo (l)	85	85	70	55	40
Esterco bovino (l)	15	-	-	-	-
Lodo de esgoto higienizado(l)	-	15	30	45	60
Calcário (g)	150	150	150	150	150
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (g)	100	100	100	100	100
K <sub>2</sub> O (g)	50	50	50	50	50

T1: 0% de lodo de esgoto higienizado; T2: 15% de lodo de esgoto higienizado; T3: 30% de lodo de esgoto higienizado; T4: 45% de lodo de esgoto higienizado; T5: 60% de lodo de esgoto higienizado

### 4.2.4 Análise química dos substratos

Após o preparo dos substratos, amostras destes foram encaminhadas para análise química, realizada no Laboratório de Análise Química de Solo Raphael M. Bloise, Universidade Federal do Espírito Santo. A análise química, para determinação dos teores disponíveis nos substratos, foi realizada de acordo com metodologia proposta por EMBRAPA (1997), o pH em relação solo-água 1:2,5; P: extrator Mehlich-1 e determinação por colorimetria; K e Na: extrator Mehlich-1 e determinação por espectrometria de chama; Ca e Mg: extrator KCl 1 mol/L e determinação por

espectrometria de absorção atômica; Al: extrator KCl 1 mol/L e determinação por titulometria; H + Al: extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L pH 7,0; MO: oxidação de carbono via úmida com dicromato de potássio em meio ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

#### **4.2.5 Solubilização dos substratos e lodo de esgoto bruto**

A solubilização dos substratos e do lodo bruto foi realizada no Laboratório de Morfologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. Esse procedimento seguiu a norma ABNT-NBR 1006 (2004). Foram pesados 250 g de cada substrato por tratamento e 250 g do lodo bruto e foram adicionados 1000 ml de água destilada, colocados posteriormente em balões volumétricos e depois, essas amostras foram levadas ao agitador numa rotação de 174 rpm por 10 minutos e deixadas em processo de decantação por sete dias em temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado por meio de pipetas, para obtenção do solubilizado.

#### **4.3 Semeadura, crescimento das mudas e análise das variáveis altura, diâmetro do colo, matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz e área foliar**

A semeadura foi realizada em 10 de agosto de 2015, nos substratos contidos em sacos de polietileno. Em cada substrato foram distribuídas três sementes de café arábica a uma profundidade de 2 cm. Posteriormente foram cobertas com uma fina camada de substrato e mantidas sob saco de estopa até o início da emergência.

O substratos foram colocadas sobre condições de 50% de sombreamento e regadas duas vezes ao dia durante toda fase de campo. Após a emergência, foi feito um desbaste, selecionando a planta mais vigorosa no estágio de “orelha de onça”, aproximadamente.

Durante o crescimento das mudas foram realizadas três pulverizações via foliar contendo macronutrientes (N, Mg e S) e micronutrientes (Fe, Cu, Mn, B, Zn e Mo). Sendo a primeira aplicação realizada aproximadamente 150 dias após a semeadura e as duas aplicações subsequentes foram realizadas com um intervalo de 15 dias, isto é, aos 165 dias e 180 dias.

Após oito meses da semeadura foram realizadas as medições de altura das plantas e diâmetro do colo. A altura (cm) foi mensurada com régua graduada e o diâmetro médio (cm) com paquímetro.

Para a determinação da área foliar foi utilizado um perfurador de folhas com área circular conhecida (0,91 cm<sup>2</sup>). Os discos foram retirados, evitando-se amostrar a nervura central. Posteriormente esses discos foram dispostos juntamente com as folhas em embalagens de papel para serem levadas a estufa de ventilação forçada a 60° durante 72 horas. E por meio do peso seco (g) desses discos e da matéria seca total (g) das folhas, foi calculada a área foliar (LOPES e MAESTRI, 1973).

Posteriormente, as plantas foram cortadas à base do colo para separar parte aérea e raiz. As raízes foram destacadas das sacolas com os respectivos substratos e em seguida, o sistema radicular foi lavado cuidadosamente sobre peneira. Em seguida, as raízes e parte aérea foram dispostas em embalagens de papel e submetidas a estufa de ventilação forçada a 60°C durante 72 horas.

Para determinação da matéria seca (g), a parte aérea e raiz foram pesadas em balança analítica.

#### **4.3.1 Análise estatística para o crescimento das mudas**

O experimento foi implantado no delineamento inteiramente casualizado com seis repetições e cinco tratamentos, sendo cada repetição constituída por quatro mudas contendo os substratos, totalizando 120 mudas. As análises estatísticas foram executadas utilizando o software computacional Genes (CRUZ, 2006).

Para cada variável de crescimento das mudas de cafeeiro foi realizada análise de variância para o estudo da regressão por polinômios ortogonais (BANZATTO e KRONKA, 2006). O modelo da equação para cada variável dependente foi determinado a partir da equação de regressão de mais alto grau que houve significância ( $p < 0.05$ ), onde foi possível estabelecer uma relação entre a dose de lodo de esgoto higienizado com as variáveis em questão.

#### **4.4 Bionsaio com *A. cepa***

Os ensaios com *A. cepa*, foram realizados no Laboratório de Citogenética do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo.

Cerca de 100 sementes de *A. cepa* foram germinadas em placas de Petri com papel filtro embebido nos tratamentos solubilizados. Ainda, água destilada foi utilizada

como controle negativo e como controle positivo foi utilizado a colchicina a 0,025%. Mais cerca de 100 sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri (Figura 1), diretamente sobre os substratos (contato direto). A germinação das sementes foi realizada em câmara BOD a 24°C. Quando as raízes atingiram aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram fixadas em Carnoy I (álcool etílico + ácido acético na proporção 3:1). Posteriormente, as raízes passaram por 3 banhos, de 5 minutos cada, em água destilada, foram hidrolisadas em HCl 1N a 60°C por 8 minutos. Após a hidrólise, as raízes passaram novamente por três banhos de água destilada e foram imediatamente colocadas em frascos de vidro âmbar contendo o Reativo de Schiff, onde permanecem por duas horas em local escuro. Após esse tempo, as raízes foram lavadas em água destilada. Para a confecção das lâminas, as pontas das raízes foram seccionadas em lâmina, coradas com carmim acético 2%, maceradas e recobertas por lamínula. O material foi analisado em microscópio de luz com aumento de 400 x. Por tratamento, 5000 células foram contadas (500 células em 10 lâminas).

Após a análise da região meristemática da raiz foram calculados o índice mitótico, o índice de aberrações cromossômicas e mitóticas e o índice de micronúcleos e quebras cromossômicas.

Para o potencial citotóxico, a avaliação foi feita por meio do cálculo do índice mitótico (IM), utilizando a seguinte fórmula:

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

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

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

O índice de mutagenicidade foi obtido por meio da frequência de células portadoras de quebras cromossômicas e micronúcleos, por meio da seguinte fórmula.

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

#### **4.4.1 Análise estatística para o bioensaio com *A. cepa***

A análise estatística foi realizada por meio do software Bioestat 5.3. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade das amostras. Como os critérios de normalidade não foram atendidos, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com posterior teste de Dunn ( $p < 0,05$ ) foi utilizado.

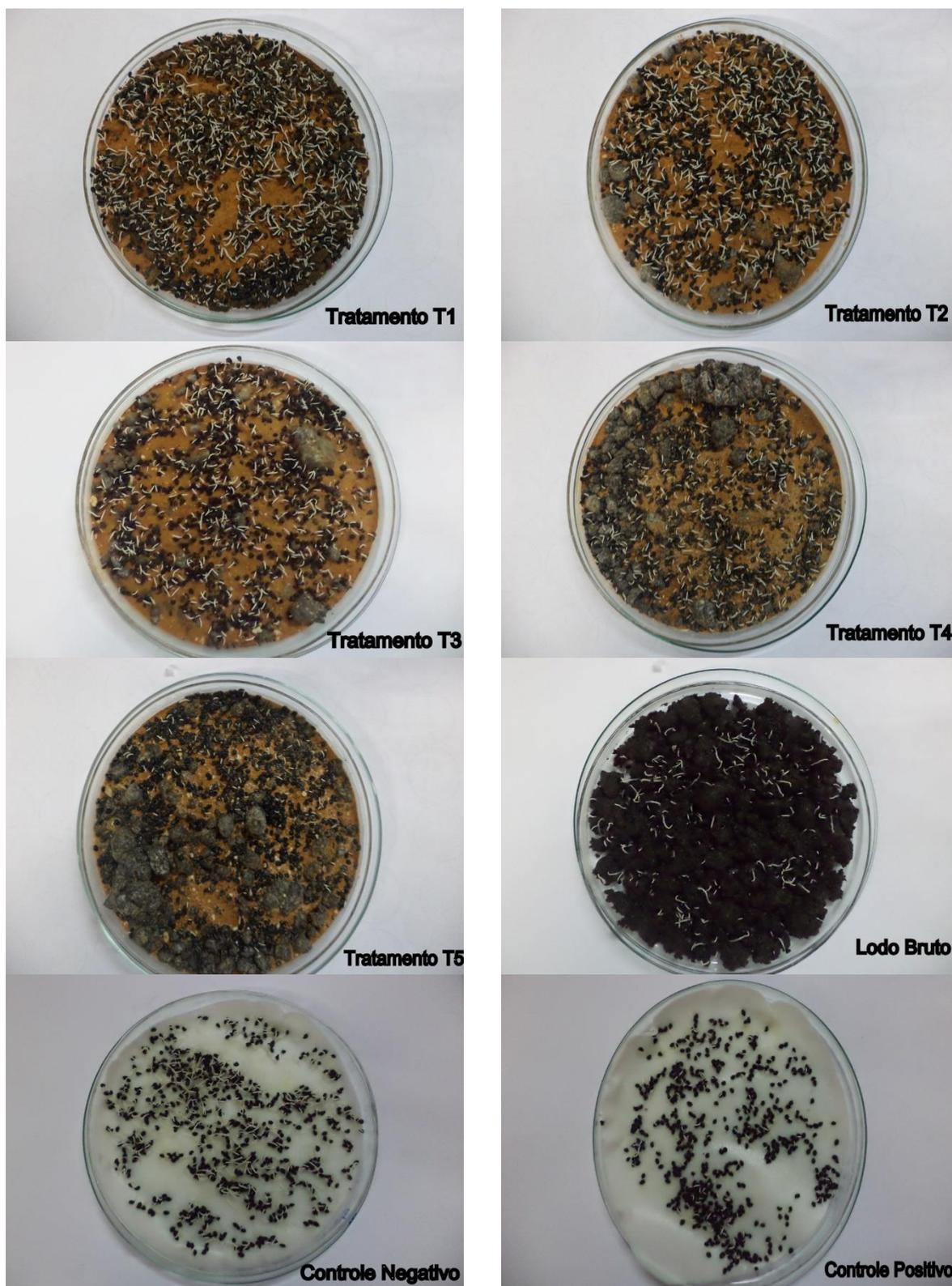


Figura 1. Germinação de sementes de *A. cepa* após exposição aos substratos de diferentes concentrações de lodo de esgoto higienizado da Estação de Tratamento de Esgoto Mulembá por contato direto. T1: 0% de lodo de esgoto higienizado, T2: 15% de lodo de esgoto higienizado, T3: 30% de lodo de esgoto higienizado, T4: 45% de lodo de esgoto higienizado, T5: 60% de lodo de esgoto higienizado, controle negativo: água destilada; controle positivo: colchicina 0,025%

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise química dos substratos

Na Tabela 3, verifica-se que o substrato contendo esterco bovino apresentou pH de 6,9. Todos os substratos contendo lodo de esgoto higienizado apresentaram pH entre 7,71 a 8,11. De acordo com a Embrapa (2004), o cafeeiro desenvolve-se melhor num pH entre 6,0 e 6,5, onde ocorre a maior disponibilidade de nutrientes do solo para as mudas. Embora necessário, provavelmente o processo de higienização altera quimicamente o substrato a ponto de elevar o pH em nível acima do ótimo para a cultura do café.

Observou-se uma redução acentuada do teor de fósforo no substrato contendo 30% de lodo de esgoto higienizado. Este fato sugere que o mesmo não tenha uma garantia de homogeneidade como, por exemplo, encontrada em fórmulas comerciais de fertilizantes que são regulamentados pelo Ministério da Agricultura quanto a padronização da concentração de nutrientes. Portanto o uso desse resíduo requer um cuidado adicional quanto à aplicação de doses seguras quanto a concentração de nutrientes. Da mesma forma ocorre para os teores de potássio, onde não se observa uma homogeneidade nos substratos analisados. Houve aumento de cálcio e um decréscimo de magnésio a partir do incremento de lodo de esgoto higienizado. Os teores de cálcio e magnésio estão relacionados com a aplicação de cal e calcário, respectivamente. Verificou-se também uma precipitação do alumínio e hidrogênio + alumínio, relacionado com o pH alcalino. Para os teores de matéria orgânica, notou-se um aumento a medida que ocorreu o acréscimo da dose de lodo de esgoto higienizado.

Tabela 3. Análise química dos substratos constituídos por esterco bovino (testemunha) e por lodo de esgoto higienizado da Estação de Tratamento de Esgoto Mulembá

Tratamento	pH (H <sub>2</sub> O)	P (mg/dm <sup>3</sup> )	K (mg/dm <sup>3</sup> )	Ca (mg/dm <sup>3</sup> )	Mg (mg/dm <sup>3</sup> )	Al (mg/dm <sup>3</sup> )	H + Al (cmolc/dm <sup>3</sup> )	Matéria Orgânica (g/Kg)
T1	6,90	37,73	270,00	3,43	1,65	0	0	5,67
T2	8,11	36,07	176,00	4,82	1,05	0	0	5,00
T3	7,99	5,94	149,00	5,31	0,96	0	0	9,68
T4	7,78	20,81	190,00	6,54	1,55	0	0	16,02
T5	7,73	21,72	120,00	6,48	1,39	0	0	16,69

T1: 0% de lodo de esgoto higienizado; T2: 15% de lodo de esgoto higienizado; T3: 30% de lodo de esgoto higienizado; T4: 45% de lodo de esgoto higienizado; T5: 60% de lodo de esgoto higienizado

## 5.2 Crescimento das mudas e análise das variáveis altura, diâmetro do colo, matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz e área foliar

O crescimento das mudas foi afetado negativamente a partir do uso de lodo de esgoto, no qual ajustou-se um modelo de regressão linear de primeiro grau. É possível observar nas figuras 2, 3, 4 e 5 um efeito linear decrescente, onde os valores estimados da altura, diâmetro do caule, área foliar e matéria seca da parte aérea tenderam a diminuir a partir da aplicação do lodo de esgoto higienizado nos substratos.

Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos foram 48.98%, 65.68%, 26.93% e 21.91% para as variáveis altura de mudas, diâmetro do caule, área foliar e matéria seca da parte aérea respectivamente. Geralmente, o coeficiente de determinação é um dos principais critérios de escolha do modelo estatístico para explicar a variação na variável dependente em função da independente, em que quanto maior este valor maior a variação na resposta é explicada pela regressão obtida. Neste trabalho constatou-se valores considerados baixos para o  $R^2$ , mas como no método de regressão por polinômios ortogonais o critério de escolha do modelo foi a regressão linear de mais alto grau significativa, manteve-se os modelos ajustados mesmo com valores de  $R^2$  baixos

Na Figura 6 é apresentado o modelo de regressão linear de segundo grau para explicar a variação no teor de matéria seca da raiz em função das doses de lodo de esgoto higienizado. Houve uma redução do teor de matéria seca da raiz até a dose de 32%, em que observou-se uma inversão, tendendo a aumentar o teor de matéria

seca da raiz com o incremento do mesmo. O coeficiente de determinação obtido foi 89.57%, o que evidencia que 89.57% da variação no teor de matéria seca de raiz é explicada pela variação nas doses de lodo.

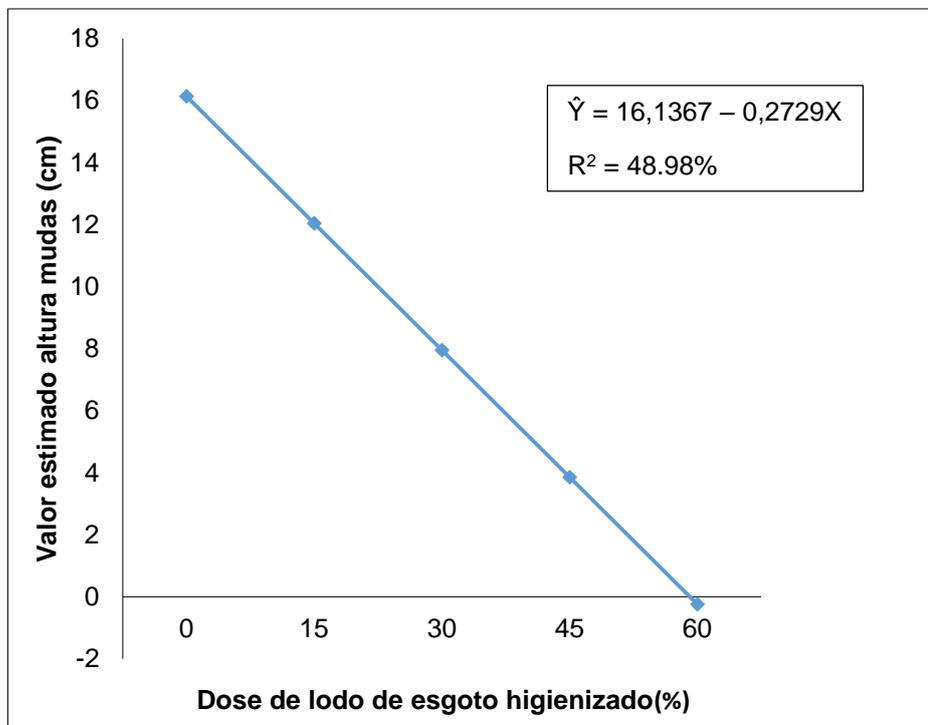


Figura 2. Valor estimado da altura das mudas (cm) em função das doses de lodo de esgoto higienizado (%)

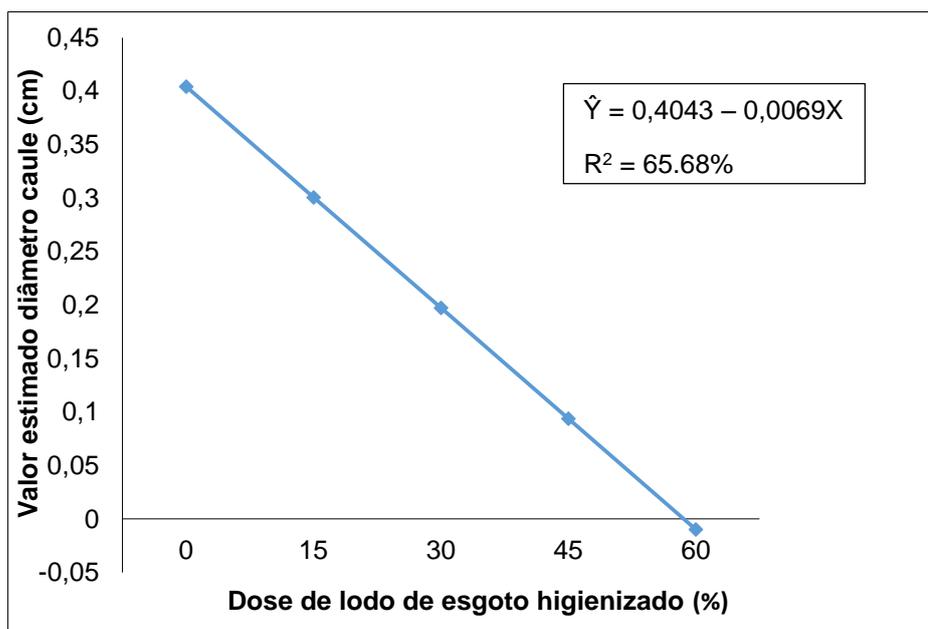


Figura 3. Valor estimado do diâmetro do caule (cm) em função das doses de lodo de esgoto higienizado (%)

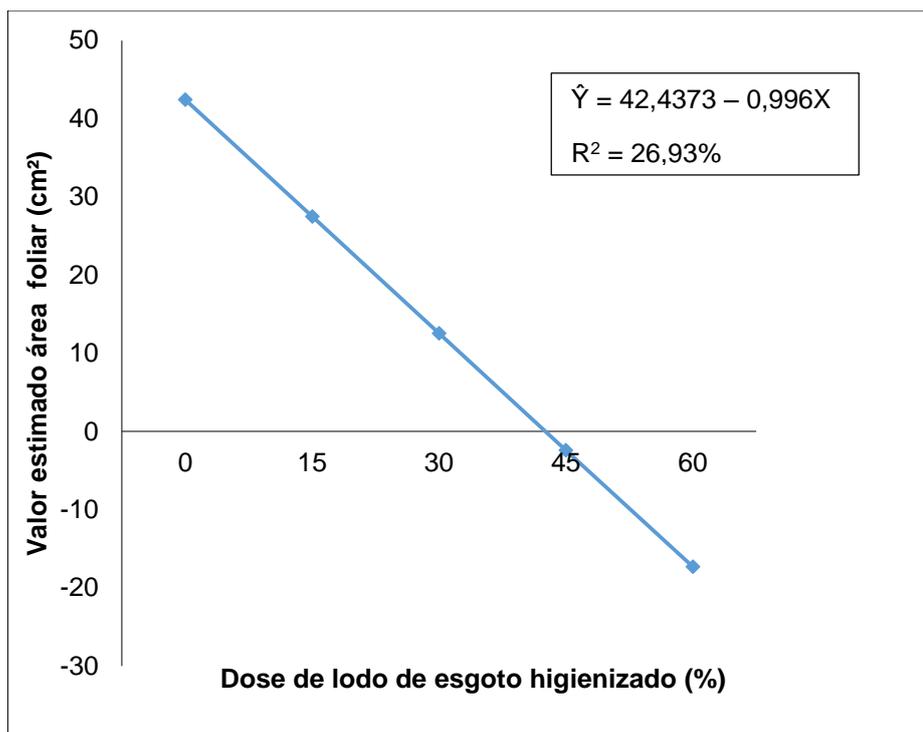


Figura 4. Valor estimado da área foliar (cm<sup>2</sup>) em função das doses de lodo de esgoto higienizado (%)

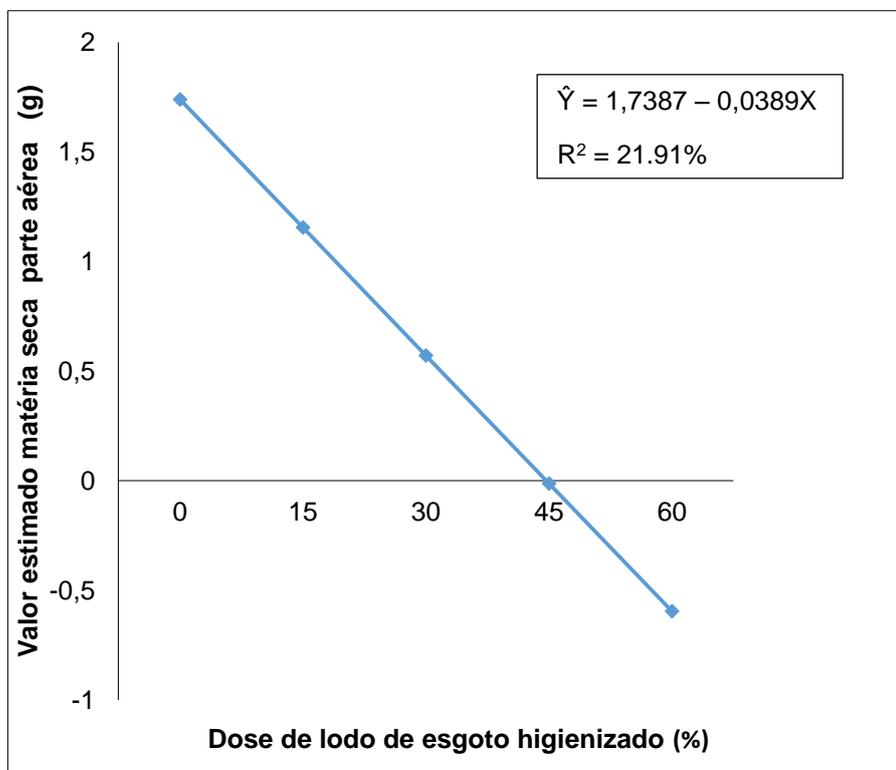


Figura 5. Valor estimado da matéria seca da parte aérea (g) em função das doses de lodo de esgoto higienizado (%)

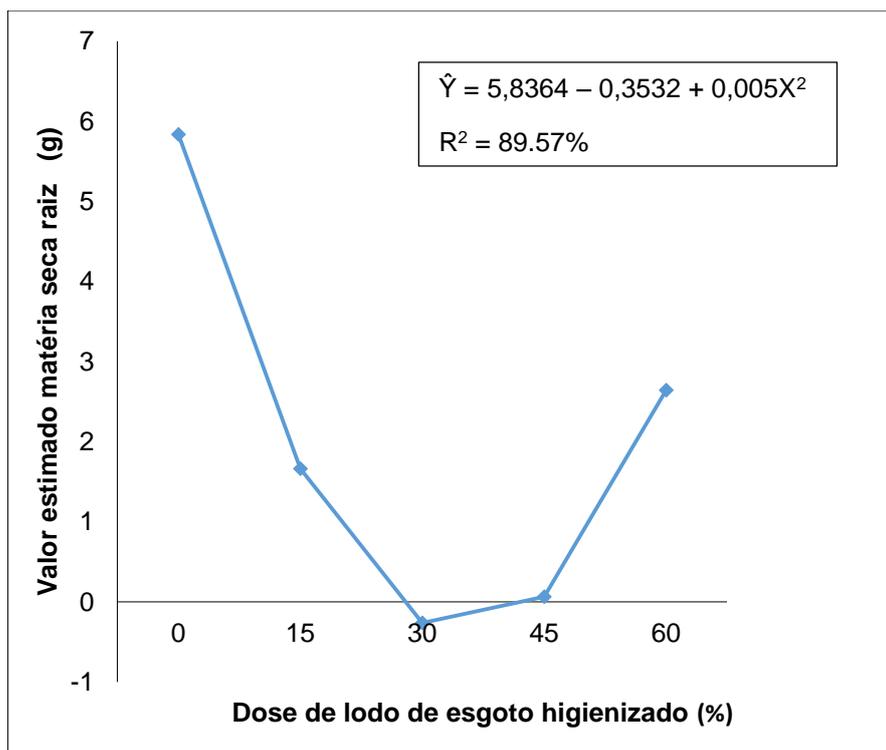


Figura 6. Valor estimado da matéria seca da raiz (g) em função das doses de lodo de esgoto higienizado (%)

Costa et al (1999) avaliaram diferentes proporções de cal virgem na higienização de lodo de esgoto para a produção de mudas de café conilon (*Coffea canephora*) constatando que a concentração de 30% de cal virgem apresentou aumento das massas seca da raiz e da parte aérea, altura e número de folhas das plantas. Os resultados obtidos por esses autores, ressaltam a importância do pH na disponibilidade dos nutrientes, visto que, com o aumento da dose de cal, ocorreu aumento do pH e manifestação de sintomas visuais típicos de deficiência nutricional, principalmente provocados pela deficiência de Mn induzida por alto pH. A higienização provocou um aumento do valor de pH superior a 9,0 em todos os tratamentos, diminuindo o conteúdo de P, K, Fe, Zn, Mn e Cu nas folhas, que foram classificados abaixo dos níveis foliares considerados adequados.

Estudos utilizando lodo de esgoto calado na composição de substrato suplementado com doses de cloreto de potássio na formação de mudas de café arábica demonstraram que a concentração de 30% de lodo calado/m<sup>3</sup> de substrato apresentou os melhores resultados para os teores de nitrogênio (g/kg) na matéria seca da parte aérea, refletindo num maior desenvolvimento das mudas. Contudo, todas as doses testadas provocaram elevação de pH dos substratos, mantendo-os acima da faixa adequada de disponibilidade de nutrientes, reduzindo os teores de

fósforo e de micronutrientes das plantas (COSTA et al., 1999). Resultados semelhantes foram evidenciados por Teles et al. (1999), onde substratos contendo solo com diferentes concentrações de lodos higienizados com cal, nas proporções de 0, 25, 50, 75 e 100%, interferiram negativamente no crescimento de mudas de Tamboril (*Enterolobium contortisiliquum* Vell. Morong). Os autores atribuíram tais resultados ao elevado pH dos substratos, no entanto o desenvolvimento de mudas em lodo higienizado através da pasteurização foi maior do que o apresentado pela testemunha.

De acordo com Schawambach et al. (2005), a deficiência de fósforo na fase de formação das raízes reduz consideravelmente seu comprimento. Similarmente, Guimarães et al. (2010), relataram que o emprego do fósforo no desenvolvimento inicial das mudas de café é considerado de grande relevância pela capacidade de aumentar significativamente o sistema radicular. Sendo que em substratos com deficiência desse nutriente, as mudas apresentam um pequeno desenvolvimento radicular, acompanhado de paralisação. A calagem previamente realizada no lodo de esgoto, elevou o pH do substrato, podendo ter contribuído com o aumento da concentração de cálcio, proporcionando a formação de fosfato de cálcio, transformando em um composto insolúvel e não aproveitável para as plantas.

O aumento da massa seca da raiz observada nesse estudo, pode estar relacionado com a baixa disponibilidade de fósforo. Fageria e Moreira (2011) relatam que a planta sob baixa concentração de fósforo, prioriza o crescimento radicular em detrimento da parte aérea por meio da exploração de um volume de solo maior buscando compensar a baixa concentração desse elemento. Nesse mesmo sentido Crusciol et al. (2013) observaram que a baixa disponibilidade de fósforo no solo também, condicionou maior crescimento radicular em relação a parte aérea em cultivares de arroz.

A deficiência do micronutriente catiônico zinco pode ser observada em folhas mais novas, caracterizando menor crescimento dos ramos. Em condições de pH alcalino essa deficiência pode ser agravada (GUIMARÃES et al., 2010). No presente trabalho, pressupõem-se que o efeito da redução da biomassa foliar e consequentemente a redução da área foliar, pode estar relacionada com essa deficiência.

O cobre é absorvido pelas raízes na forma de  $\text{Cu}^{2+}$  desempenhando relevante função como ativador enzimático no desenvolvimento de mudas de cafeeiro. Sua disponibilidade está relacionada com o pH, a medida em que se eleva o pH, o cobre

torna-se menos disponível (GUIMARÃES et al., 2010). Podemos presumir que a deficiência do cobre pode afetar consideravelmente o desenvolvimento das mudas de cafeeiro em condições de pH alcalino.

Delarmelina et al. (2013), observaram melhor desempenho das características morfológicas como altura, diâmetro do colo, matéria seca da parte aérea e das raízes nas mudas de *Sesbania virgata*, crescidas em substrato que continham uma maior proporção de composto orgânico (esterco bovino) em relação a proporção de lodo de esgoto. O que corrobora com o resultado obtido nesse trabalho em que o substrato contendo esterco bovino, apresentou melhor resposta de crescimento nas variáveis analisadas em mudas de café.

Neste trabalho, o pH foi considerado acima do ideal para a produção de mudas de café. Contudo, pode-se concluir que esse fator não foi o principal causador de baixo crescimento das mudas. O pH do tratamento T2 foi o mais alto dentre os tratamentos contendo lodo de esgoto higienizado, porém apresentou resultados melhores quanto as variáveis de crescimento analisadas. O pH do tratamento T5 apresentou pH mais baixo dentre os tratamentos contendo lodo de esgoto higienizado, porém com crescimento considerado mais afetado. Pode-se inferir que as concentrações crescentes de lodo de esgoto higienizado pode ter sido uma das causas do baixo crescimento das mudas, devido a possível presença de compostos poluentes no lodo de esgoto com efeitos sinérgicos resultando em toxidez. Isso corrobora os resultados obtidos no bioensaio com *A. cepa*.

### **5.3 Bioensaio com *A. cepa***

Considerando o experimento de contato direto, o tratamento T3 foi citotóxico em relação aos demais tratamentos (Tabela 4). Os tratamentos T4, T5 e o lodo bruto foram genotóxicos, onde se observa a relação da maior a quantidade de lodo com a maior a atividade genotóxica. O potencial mutagênico foi avaliado por meio da formação de micronúcleos e quebras cromossômicas e os tratamentos T4, T5 e lodo bruto apresentaram diferenças significativas em relação aos demais (Tabela 4).

Tabela 4. Média  $\pm$  desvio padrão do índice mitótico (IM), aberrações mitóticas e cromossômicas (AMC) e de micronúcleos (MN) + quebras cromossômicas (QC) em células meristemáticas radiculares de *A. cepa*, após exposição aos substratos de diferentes concentrações de lodo de esgoto higienizado por contato direto e controles

Tratamentos	IM	AMC	MN + QC
CN	129,4 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup>	1,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
CP	49,1 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>	31,6 $\pm$ 9,7 <sup>b</sup>	5,1 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>
T1	87,5 $\pm$ 5,5 <sup>a</sup>	5,7 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	1,6 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
T2	73,4 $\pm$ 3,6 <sup>a</sup>	7,2 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	3,1 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
T3	7,9 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>	3,0 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	3,3 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>
T4	74,2 $\pm$ 5,2 <sup>a</sup>	29,2 $\pm$ 8,8 <sup>b</sup>	11,3 $\pm$ 7,4 <sup>b</sup>
T5	73,0 $\pm$ 3,2 <sup>a</sup>	41,9 $\pm$ 11,4 <sup>b</sup>	18,2 $\pm$ 14,3 <sup>b</sup>
Lodo bruto	96,1 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	82,2 $\pm$ 9,7 <sup>b</sup>	7,6 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>

CN: controle negativo (água destilada); CP: colchicina (0,025%); T1: 0% de lodo de esgoto higienizado; T2: 15% de lodo de esgoto higienizado; T3: 30% de lodo de esgoto higienizado; T4: 45% lodo de esgoto higienizado; T5: 60% lodo de esgoto higienizado.

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ ).

Considerando resultados com os substratos solubilizados, não foram observadas alterações quanto a taxa de proliferação celular. Os tratamentos T3, T4, T5 e lodo bruto foram genotóxicos em relação aos demais. Nenhum tratamento foi mutagênico (Tabela 5).

Tabela 5. Média  $\pm$  desvio padrão do índice mitótico (IM), aberrações mitóticas e cromossômicas (AMC) e de micronúcleos (MN) + quebras cromossômicas (QC) em células meristemáticas radiculares de *A. cepa*, após exposição aos substratos de diferentes concentrações de lodo de esgoto higienizado solubilizados e controles

Tratamentos	IM	AMC	MC+QC
CN	129,4 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup>	1,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
CP	49,1 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>	31,6 $\pm$ 9,7 <sup>b</sup>	5,1 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>
T1	83,4 $\pm$ 3,0	2,0 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	1,7 $\pm$ 1,5
T2	85,5 $\pm$ 5,2	5,6 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 1,3
T3	88,7 $\pm$ 4,8	11,8 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	4,6 $\pm$ 1,3
T4	75,9 $\pm$ 4,3	13,0 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	1,2 $\pm$ 1,4
T5	78,4 $\pm$ 1,7	17,5 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>	3,7 $\pm$ 0,7
Lodo bruto	88,1 $\pm$ 4,1	19,1 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	0,4 $\pm$ 0,9

CN: controle negativo (água destilada); CP: colchicina (0,025%); T1: 0% de lodo de esgoto higienizado; T2: 15% de lodo de esgoto higienizado; T3: 30% de lodo de esgoto higienizado; T4: 45% lodo de esgoto higienizado; T5: 60% lodo de esgoto higienizado

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ )

As principais alterações observadas foram aderência cromossômica, anáfases multipolares, brotos, células multinucleadas, células poliploides, microcitos, núcleos lobulados, núcleos periféricos e perdas e pontes cromossômicas (Figura 7; Tabelas 6 e 7).

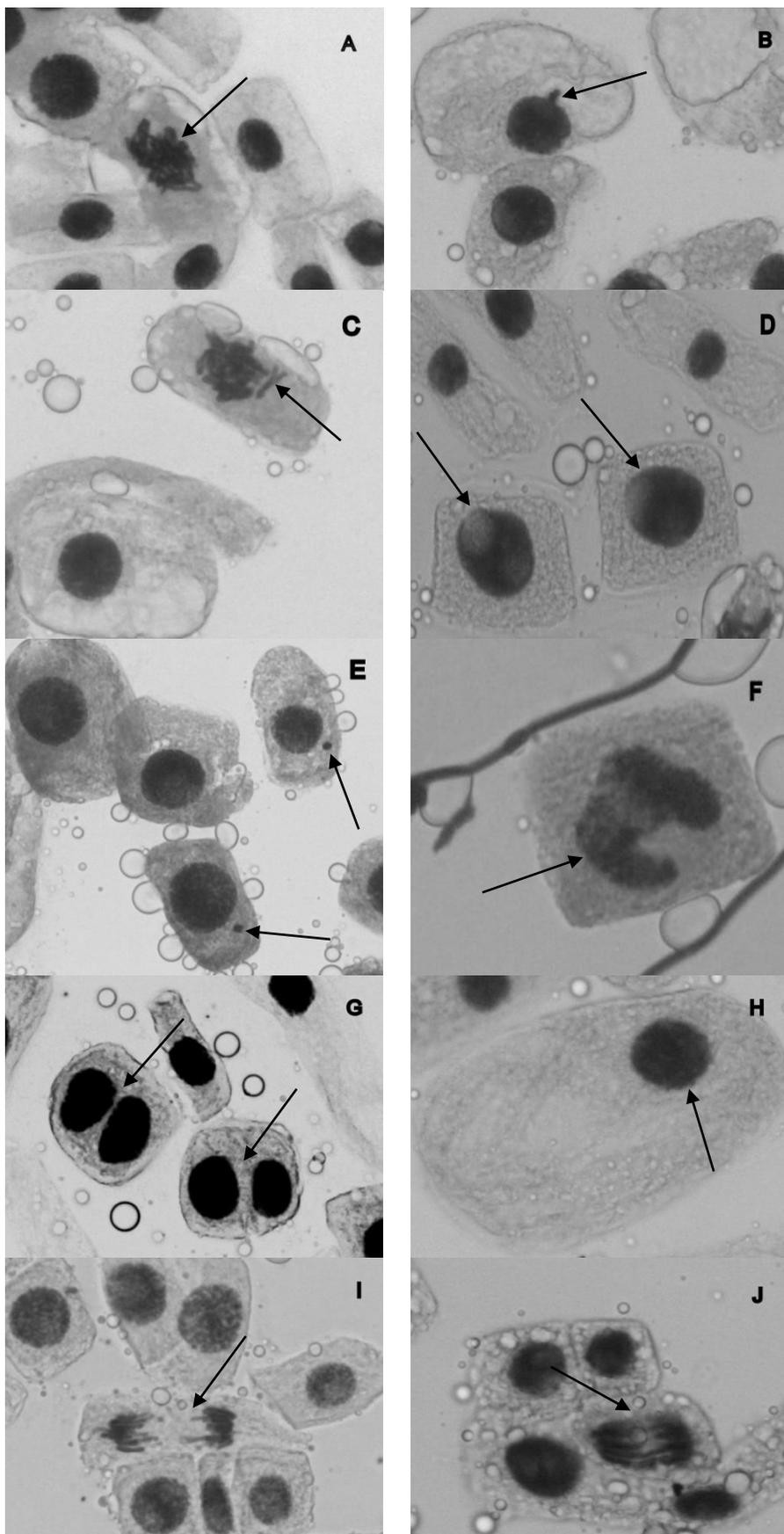


Figura 7. Principais alterações mitóticas e cromossômicas observadas em *A. cepa* após exposição a diferentes concentrações de lodo de esgoto higienizado ou lodo bruto. (A) Aderência cromossômica (seta); (B) Broto nuclear (seta); (C) Perda cromossômica (seta); (D) Núcleos poliploides (seta); (E) Micronúcleo (seta); (F) Núcleo lobulado (seta); (G) Células binucleadas (seta); (H) Núcleo periférico (seta); (I) Atraso cromossômico (seta); (H) Ponte cromossômica (seta)

Tabela 6. Média  $\pm$  desvio padrão das alterações mitóticas e cromossômicas observadas em células meristemáticas radiculares de *A. cepa*, após exposição aos substratos de diferentes concentrações de lodo de esgoto higienizado contato direto e controles

Tratamentos	Alterações mitóticas e cromossômicas										
	AC	AM	AT	BR	C-M	CM	PC	PP	PTC	MCT	NL
CN	0,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
CP	5,0 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	6,5 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	0,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	4,8 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>	5,3 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	3,9 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	4,0 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>	0,3 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
T1	0,8 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	0,9 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,9 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	1,3 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	1,4 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
T2	1,5 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	1,8 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	1,9 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 4,35 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>			
T3	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 4,35 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
T4	0,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	6,5 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>	3,2 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	9,0 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	1,9 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	5,0 $\pm$ 3,7 <sup>b</sup>	3,0 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>
T5	0,6 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	1,3 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	6,8 $\pm$ 2,4 <sup>b</sup>	1,3 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	10,4 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	2,1 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	8,0 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	11,1 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>
Lodo bruto	5,4 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	4,0 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	3,6 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>	5,6 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>	42,7 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>	9,0 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	1,2 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	4,2 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>

CN: controle negativo (água destilada); CP: colchicina (0,025%); T1: 0% de lodo de esgoto higienizado; T2: 15% de lodo de esgoto higienizado; T3: 30% de lodo de esgoto higienizado; T4: 45% lodo de esgoto higienizado; T5: 60% lodo de esgoto higienizado.

AC: aderência cromossômica; AM: anáfase multipolar, AT: atraso cromossômico; BR: broto nuclear; C-M: C-metáfase; CM: célula multinucleada PC: perda cromossômica; PP: poliploidia; PTC: ponte cromossômica; MCT: microcito; NL: núcleo lobulado.

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ )

Tabela 7. Média  $\pm$  desvio padrão das alterações mitóticas e cromossômicas observadas em células meristemáticas radiculares de *A. cepa*, após exposição aos substratos de diferentes concentrações de lodo de esgoto higienizado solubilizados e controles

Tratamentos	Alterações mitóticas e cromossômicas										
	AC	AM	AT	BR	C-M	CM	PC	PP	PTC	NL	NP
CN	0,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
CP	5,0 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	6,5 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	0,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	4,8 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>	5,3 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	3,9 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	4,0 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>	0,3 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
T1	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
T2	1,2 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	4,0 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>
T3	3,2 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	4,0 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	0,1 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	1,2 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	2,1 $\pm$ 5,3 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
T4	1,0 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	5,0 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	2,0 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	3,3 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	0,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
T5	0,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	3,1 $\pm$ 3,8 <sup>b</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	14,0 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>			
Lodo bruto	3,7 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	3,2 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	2,5 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	3,4 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	0,3 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	5,6 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>

CN: controle negativo (água destilada); CP: colchicina (0,025%); T1: 0% de lodo de esgoto higienizado; T2: 15% de lodo de esgoto higienizado; T3: 30% de lodo de esgoto higienizado; T4: 45% lodo de esgoto higienizado; T5: 60% lodo de esgoto higienizado.

AC: aderência cromossômica; AM: anáfase multipolar, AT: atraso cromossômico; BR: broto nuclear; C-M: C-metáfase; CM: célula multinucleada PC: perda cromossômica; PP: poliploidia; PTC: ponte cromossômica; NL: núcleo lobulado; NP: núcleo periférico.

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ )

De acordo com Fernandes et al. (2007), o índice mitótico é utilizado na avaliação da citotoxicidade de vários agentes químicos que podem retardar ou bloquear completamente a divisão celular, podendo levar o indivíduo à morte.

Apenas o Tratamento T3 (contato direto) mostrou-se citotóxico apresentando redução do índice mitótico, podendo supor que a concentração de contaminantes que causaram toxicidade nessa amostra foi maior que nos demais tratamentos, visto que o lodo de esgoto é uma material que apresenta variações na sua constituição.

Resultados obtidos por Bonomo (2014) mostram que amostras de lodo de esgoto higienizado levou a inibição do desenvolvimento radicular de *A. cepa* confirmando que esse parâmetro avaliado seja um forte indicativo para o monitoramento dos níveis de poluentes ambientais. Já para Brossi (2008) os resultados obtidos na avaliação da frequência do índice mitótico também de *A. cepa*, mostraram que as doses de lodo de esgoto não causaram toxicidade e ainda promoveram um aumento na taxa mitótica, verificando que este teste não foi efetivo para avaliar a toxicidade do solo em função das doses de lodo de esgoto e que o solo tratado não continha concentração suficiente de substâncias que pudessem causar efeito citotóxico. Esse mesmo autor atribui o efeito benéfico à presença da matéria orgânica e nutrientes que o lodo viabilizou, podendo afirmar o potencial agrícola do lodo de esgoto.

Martins et al (2016), em estudo com lodo bruto e lodo higienizado de origem doméstica, constataram potencial fitotóxico, como inibição da germinação de sementes e inibição do crescimento radicular respectivamente de *A. cepa*. Verificaram também que amostras de lodo solubilizado e de lodos solubilizados higienizados apresentam potencial citotóxico, atribuindo esses efeitos ao valor elevado de nitrogênio numa das amostras e também com o pH mais alcalino, presente no lodo higienizado. Esses resultados relativos ao potencial fitotóxico corrobora com Maziviero (2011) onde observou também inibição da germinação das sementes de *A. cepa* após exposição ao lodo de esgoto bruto de origem também doméstica, possivelmente em função à elevada concentração de amônia presente, exercendo potencial tóxico.

Bonomo (2014) observou alterações cromossômicas em células de *A. cepa* quando expostas a maior dose de lodo de esgoto, mesmo mostrando o enquadramento deste resíduo nos limites preconizados pela legislação para todos os parâmetros e poluentes avaliados. Dentre as aberrações cromossômicas existentes

nesse estudo foram observadas com mais frequência a formação de pontes, igualmente para Maziviero (2011), que encontrou predominância da formação de pontes. Brossi (2008) observou a frequência de aberrações cromossômicas em amostras tratadas com maior dose lodo de esgoto no sistema-teste *A. cepa*, podendo indicar genotoxicidade dos compostos presentes nas amostras testadas. As alterações mais frequentes nesse estudo foram pontes cromossômicas presentes na anáfase e telófase. Martins et al (2016) observaram potencial genotóxico em amostras com lodo de esgoto solubilizado, podendo verificar os efeitos de compostos tóxicos dissolvidos, constatando a presença de pontes cromossômicas, C-metáfase e poliploidia.

Efeito mutagênico foi observado em células meristemáticas de *A. cepa* em estudo com lodo de esgoto na maior dose (BROSSI, 2008). Para Maziviero (2011) foi possível verificar que o lodo solubilizado induziu maior mutagenicidade do que o lodo bruto. Diante do exposto, deve-se advertir a hipótese de que a substância mutagênica encontra-se na fração solúvel, podendo apresentar potencial à contaminação em razão à mobilidade por meio da lixiviação e carreamento no ambiente.

Brossi (2008) mostrou que amostras tratadas com maior dose de lodo de esgoto foi capaz de induzir a frequência de micronúcleos em *A. cepa* de modo significativo em relação aos demais tratamentos, embora considerados baixos em comparação a outros trabalhos. O autor considerada que esse dano pode ter sido provocado por alguma substância presente no lodo de esgoto aplicado no solo.

O micronúcleo é considerado um pequeno corpúsculo composto por material cromossômico proveniente de cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico que não se integrou ao novo núcleo por não estar unido ao fuso, ou seja, material genético perdido pelo núcleo principal, como resultado de um dano genético causado muitas vezes por agentes físicos, químicos ou biológicos (SILVA et al., 2003). Também tem sido considerado como um biomarcador para análise de efeitos mutagênicos promovidos por químicos, durante o ciclo de divisão celular, devido à ação de agentes clastogênicos ou aneugênicos que danificam o fuso (Leme e Marin-Morales, 2009). Matsumoto et al. (2006) relata que a ação clastogênica leva a formação do micronúcleo por meio de quebras cromossômicas durante a divisão celular e a ação aneugênica resulta na formação do micronúcleo pela inativação do fuso mitótico, ocorrendo perda de cromossomos inteiros. De acordo com Grant

(1978) e Chauhan e Sundararaman (1990) a ruptura dos cromossomos é induzida pela ação clastogênica de produtos químicos.

Segundo Leme e Marin-Morales (2009) aberrações cromossômicas estão associadas com mudanças tanto na estrutura quanto no número total de cromossomos, decorrente de exposição a agentes físicos ou químicos ou podendo ocorrer de forma espontânea. A ação dos agentes tóxicos sobre as proteínas do ciclo celular podem resultar também em aderência cromossômica (AMIN, 2011). Rank e Nielsen (1998) relata que a origem das anáfases multipolares está relacionada com o mau funcionamento do fuso mitótico, distribuindo os cromossomos de forma irregular, direcionando para mais de dois polos nas células. Perdas cromossômicas são derivados de problemas nos microtúbulos que são responsáveis pela segregação correta dos cromossomos para as células filhas (FERNANDES, 2005).

Poliploidia está relacionada com segregações anormais de cromossomos, podendo decorrer espontaneamente ou pela ação de um agente aneugênico (ALBERTINI et al., 2000). As pontes anafásicas provavelmente são formadas pela quebra e fusão de cromossomos e cromátides, induzidas muitas vezes por compostos químicos, especialmente os metais pesados (TURKOGLU, 2006; MATSUMOTO et al, 2006). A formação de pontes com posterior quebra, resultando em fragmentos acêntricos levam a formação de micronúcleos (LEME e MARIN-MORALES, 2008). Segundo Fernandes et al. (2007) micronúcleos que podem ser eliminados da célula, são caracterizados sob a forma de pequenas porções citoplasmáticas, chamadas de microcitos, que possuem reduzido conteúdo nuclear. A formação de núcleos lobulares pode ser resultante de anáfases multipolares que possuem pontes cromossômicas. Durante a divisão nuclear, essa instabilidade cromossômica não impede que o envoltório nuclear se reestruture (FERNANDES, 2005).

A partir das alterações encontradas em células meristemáticas de *A. cepa*, como formação de micronúcleos e quebras cromossômicas confirmando seu efeito mutagênico e também pelas alterações mitóticas e cromossômicas encontradas também confirmando seu efeito genotóxico, pode-se presumir que as amostras de lodo de esgoto da ETE Mulembá de origem doméstica foram capazes de causar efeito clastogênico e aneugênico.

Comparando as amostras de lodo de esgoto contato direto com amostras de lodo solubilizados, pode-se afirmar que a primeira apresentou efeito citotóxico,

genotóxico e mutagênico e as de lodo solubilizado apresentou apenas efeito genotóxico. Os resultados foram distintos, mesmo sendo amostras de lodo provenientes da mesma ETE, podendo prever que o lodo de esgoto é um material heterogêneo. Diante do exposto, pode-se considerar que a metodologia utilizando lodo de esgoto solubilizado apresentou pouca sensibilidade ao analisar os efeitos mutagênicos, considerando a hipótese de que as substâncias mutagênicas encontram-se na fração do precipitado.

Apesar do tratamento sobre o lodo de esgoto para que atendesse os limites estabelecidos pela Resolução do CONAMA 375/2006 quanto a análise de metais pesados e parâmetros microbiológicos, estando apto para ser utilizado com restrições na agricultura, como condicionador de solo e fertilizante orgânico, ainda assim foi possível obter resultados negativos, tanto para o crescimento das mudas de café quanto para a resposta referente a toxicidade observada em *A. cepa*. A partir desses resultados pode-se inferir que esse efeito pode estar relacionado com outros compostos como poluentes orgânicos que podem apresentar efeitos sinérgicos ou antagônicos.

Quando o lodo é tratado e processado, segundo Barbosa e Tavares Filho (2006), obtêm-se características admissíveis para o uso agrícola de forma ambientalmente segura. No entanto, neste trabalho observou-se que os constituintes presentes no lodo de esgoto não proporcionaram efeitos positivos com relação ao crescimento das mudas de café e ainda não se pode afirmar que o seu uso pode ser seguro ambientalmente, mediante resultados obtidos no bioensaio com *A. cepa*.

Enfim, mais estudos se fazem necessários para se estipular limites seguros do potencial tóxico do lodo de esgoto, de forma ambientalmente segura, visto que seu uso é relativamente recente e até então não se sabe qual a consequência dessa prática a longo prazo.

## 6 CONCLUSÃO

O lodo de esgoto da Estação de Tratamento de Esgoto de Mulembá apresenta níveis de metais pesados abaixo dos limites estabelecidos pela Conama, e são considerados adequados para a sua utilização na agricultura.

O uso do lodo de esgoto eleva a concentração de matéria orgânica do solo.

Não se deve utilizar lodo de esgoto para a formação de mudas de café.

Há efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico com o uso do lodo de esgoto.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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

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

AMIN, A. W. Evaluation of the genotoxicity of residual repeated applications of sewage sludge on M<sub>2</sub> meiocytes of *Zea* plants. **Research Journal of Environmental Toxicology**, v. 5, n. 4, p. 235-250, 2011.

ANDREOLI, C. V.; LARA, A. I.; PEGORINI, E. S.; IHLENFELD, R. G. K. PROSAB/SANEPAR. **Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura**. Curitiba. 98p.1999.

ANDREOLI, C.V.; SPERLING, M.V.; FERNANDES, F. **Lodo de esgotos: tratamento e disposição final**. Belo Horizonte: UFMG, v.6, 444p. 2014.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **experimentação agrícola**. Jaboticabal: FUNEP, 2006, 237p.

BARBOSA, G. M. C.; TAVARES FILHO, J. Uso agrícola do bio sólido: influência nas propriedades químicas e físicas do solo, produtividade e recuperação de áreas degradadas. **Ciências Agrárias**, v. 27, n. 04, p. 565-580. 2006.

BARD, A. J.; ZOSKI, C. G. Voltammetric retrospective. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 9, p. 364-352, 2000.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente - Conama. 2006. Resolução, N° 375: **Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências.** 167 ed. Diário Oficial Da União, Brasília, p. 25.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. **A disposição de Lodo de Esgoto e Solo Agrícola IN: Lodo de Esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura.** Jaguariúna: EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 2006. 349p.

BEZERRA, L. J. D.; LIMA, V. L. A.; ANDRADE, A. R. S.; ALVES, V. W.; AZEVEDO, C. A. V. GUERRA, H. O. C. Análise de crescimento do algodão colorido sob os efeitos da aplicação de água residuária e biossólidos. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola Ambiental**, Suplemento, p. 333-338, 2005.

BONOMO, M. M. **Efeitos citogenéticos, bioquímicos, morfológicos e anatômicos da aplicação de lodo de esgoto higienizado em *carica papaya* I.** 2014. 85f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

BROSSI, M. J. L. **Ecotoxicologia de um sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto.** 2008. 85f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

CARITÁ, R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da cidade de Santa Gertrudes – SP.** 2010. 190 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2010.

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

Cesan. Companhia Espírito Santense de Saneamento (Ed.). **Tratamento de Esgoto**. Vitória: CESAN, 2013. 15 f.

CHAUHAN, L. K. S.; SUNDARARAMAN, V. Effect of substituted ureas on plant cells I. cytological effects of isoproturon on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Cytologia**. v.55, p. 91-98, 1990.

CHAVES, J. C. D.; FERREIRA, T. L.; MIYAZAWA, M. Efeito de lodo urbano, calcário e resíduos vegetais no crescimento do cafeeiro e química do solo. **Anais XXVIII Congresso Brasileiro de Ciências do Solo**, Londrina-PR. 2001.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, Safra 2013 – Quarto levantamento. Dezembro/2013. Disponível em: [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br). Acesso em: 07 de novembro de 2014.

COSTA, A. N.; COSTA, A. F. S. **Manual de uso agrícola e disposição do lodo de esgoto para o estado do Espírito Santo**. Vitória-ES. 125p. 2011.

COSTA, A. N.; KRHOLING, B.; RODRIGUES, C. E.; TELES, C. R.; NASCIMENTO, C. G. PASSAMANI, F. R. F.; OLIVEIRA, F. F.; LIMA, M. R. P. GONÇALVES, R. F. **Gerenciamento do lodo de lagoas de estabilização não mecanizadas**. PROSAB. 68p. 1999.

CRUZ, C.D. **Programa Genes estatística experimental e matrizes**. Viçosa: UFV, 2006, 285p.

CRUSCIOL, C. A. C.; NASCENTE, A. S.; MAUAD, M.; SILVA, A. C. L. Desenvolvimento radicular e aéreo, nutrição e eficiência de absorção de macronutrientes e zinco por cultivares de arroz de terras altas afetadas pela adubação fosfatada. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 5, p. 2061-2076, 2013.

CUNHA, A. M.; CUNHA, G. M.; SARMENTO, R. A.; CUNHA, G. M.; AMARAL, J. F. T.; Efeito de diferentes substratos sobre o desenvolvimento de mudas de *Acacia* sp. **Revista Árvore**, v. 30, n. 2, p. 207-214, 2006.

DELARMELINA, W. M.; CALDEIRA, M. V. W.; FARIA, J. C. T.; GONÇALVES, E. O. Uso do lodo de esgoto e resíduos orgânicos no crescimento de mudas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 7, n. 2, p. 184-192, 2013.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 1997. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro, Brasil, 212 p.

EMBRAPA. Embrapa Agrobiologia. 2004. Sistemas de produção - Cultivo do Café Orgânico. Seropédica, Brasil, 95 p.

EMBRAPA. Embrapa Circular Técnica. 2002. Produção de mudas de cafeeiro por sementes e estacas. Rio Branco, Brasil, 10 p.

FAGERIA, N. K.; MOREIRA, A. The role of mineral nutrition on root growth of crop plants. **Advances in Agronomy**, New York, v.1, p. 251-331, 2011.

FASSARELA, M. M.; SIMÃO, J. B. P. Avaliação do crescimento de mudas de café arábica submetidas a doses de lodo de esgoto e *Lithothamnium calcareum*. **VI Jornada de Iniciação Científica, Desenvolvimento Tecnológico e Inovação**. Vitória-ES. 2011.

FERNANDES, T. C. C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste**. 2005. 212 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2005.

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

FREITAS, A. R.; LOPES, J. C.; ALEXANDRE, R. S.; VENANCIO, L. P.; ZANOTTI, R. F. Emergência e crescimento de mudas de maracujá doce em função de lodo de esgoto e luz. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 2, p. 234-240, 2015.

GARCIA, G. O.; GONÇALVES, I. Z.; MADALÃO, J. C.; NAZÁRIO, A. A.; REIS, E. F. Análise nutricional de mudas de eucalipto submetidas à aplicação de lodo de esgoto doméstico. **Revista Engenharia Ambiental**, v. 6, n. 3, p. 275-290, 2009.

GOMES, I. H.; BERNADINO, U. B. **Estudo comparativo da produção de lodo das estações de tratamento de esgoto de Mulembá e Vale Encantado e avaliação dos custos com sua disposição**. 2013, 73f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Engenharia Ambiental, Fundação de Assistência e Educação – FAESA Faculdades Integradas Espírito-Santenses. Vitória, 2013.

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

GRANT, W. F. Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. **Environmental Health Perspectives**. v. 27, p. 37-73, 1978.

GUEDES, M. C.; ANDRADE, C. A.; POGGIANI, F.; MATIAZZO, M. E. Propriedades químicas do solo e nutrição do eucalipto em função da aplicação de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 30, p. 267-280. 2006.

GUIMARAES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. **Semiologia do Cafeeiro: Sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas**. Editora: UFLA, 2010, 215p.

HOPKE, P. K.; PLEWA, M. P.; STAPLETON, P. L.; WEAVER, D. L. Comparison of the mutagenicity of sewage sludges. **Environmental Science & Technology** v. 18, nº 12, p. 909-916, 1984.

INCAPER - Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, Incaper em Revista – Café sustentável. Ano 1, nº 1, Janeiro a Dezembro de 2010. Disponível em: [www.incaper.es.gov.br](http://www.incaper.es.gov.br). Acesso em 08 de novembro 2014

KUMMROW, F.; MARTINS, R. S. L.; LELIS, C. M.; RECH, C. M.; MATTA, M. E. M.; UMBUZEIRO, G. A. Caracterização da mutagenicidade de extratos aquosos e orgânicos de lodos tratados de cinco estações de tratamento de esgoto (ETE) localizadas no Estado de São Paulo. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 3, n. 3, p. 18-27, 2010.

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

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

LOPES, N. F.; MAESTRI, M. Análise de crescimento e conversão da energia solar em populações de milho (*Zea mays* L.) em Viçosa, Minas Gerais. Ver. **Ceres**, v. 20, n. 109, p. 189-201, 1973.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental: metais pesados, mitos, mistificação e fatos**. São Paulo: PRODUQUÍMICA, 1994, 153p.

MARTINS, D.R. **Estado nutricional e qualidade de bebida em cafeeiros tratados com lodo de esgoto**. 2003. 98f. Dissertação de mestrado. Instituto Agrônomo de Campinas. Campinas, 2003.

MARTINS, M. N. C.; SOUZA, V. V.; SOUZA, T. S. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 148, p. 481-486, 2016.

MARTINS, M. N. C.; SOUZA, V. V.; SOUZA, T. S. Genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on higher plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 489-496, 2016.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTII, 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.

MAZIVIERO, G. T. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de lodo de esgoto por meio dos sistemas-teste *Allium cepa* e *Tradescantia pallida***. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 106 p. 2011.

MIELLI, A. C.; MATTA, M. E. M.; NERSESYAN, A.; SALDIVA, P. H. N.; UMBUZEIRO, G. A. Evaluation of the genotoxicity of treat urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenis**, v.672, p. 51-54, 2009.

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

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.

RIBEIRINHO, V. S.; MELO, W. J.; SILVA, D. H.; FIGUEIREDO, L. A.; MELO, G. M. P. Fertilidade do solo, estado nutricional e produtividade de girassol, em função da aplicação de lodo de esgoto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 2, p. 166-173, 2012.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA. 2003. 356p.

SAITO, M. L. **O uso do lodo de esgoto na agricultura: precauções com contaminantes orgânicos**. Jaguariúna: EMBRAPA MEIO AMBIENTE. 2007. 35p.

SCHEER, M. B.; CARNEIRO, C.; SANTOS, K. G. Substratos à base de lodo de esgoto compostado na produção de mudas de *Parapiptadeniarigida* (Benth.) Brenan. **Scientia Forestalis**. v. 38, n. 88, p. 637-644, 2010.

SCHWAMBACH, J.; FADANELLI, C.; FETT-NETO, A. G. Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, v. 25, p. 487-494, 2005.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: ALCANCE, 2003, 424p.

SILVA, P. R. P.; BARBISAN, L. F.; DAGLI, M. L. Z.; SALDIVA, P. H. N. Sewage sludge does not induce genotoxicity and carcinogenesis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 3, p. 657-663, 2012.

SOLANO, M. L. M.; LIMA, P. L. A.; LUVIZUTTO, J. F. L.; SILVA, P. R. P.; UMBUZEIRO, G. A.; CAMARGO, J. V. In vivo genotoxicity evaluation of a treated urban sewage sludge sample. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenis**, v. 676, p. 69-73, 2009.

TELES, C. R.; COSTA, A. N.; GONCALVES, R. F. Produção de lodo em lagoas de estabilização e o seu uso no cultivo de espécies florestais na região Sudoeste do Brasil. **Sanare**, Curitiba, v.12 n.12 1999.

TOMAZ, M. A.; AMARAL, J. F. T.; JESUS JUNIOR, W. C. .; FONSECA, A. F. A.; FERRAO, R. G.; FERRAO, M. A. G.; MARTINS, L. D. RODRIGUES, W. N. **Inovação, Difusão e Integração: Bases para a Sustentabilidade da Cafeicultura**. Alegre ES: CAUFES, 2012, 270p.

TÜRKOĞLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v. 626, p. 4-14, 2006.