

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DA ÁGUA
RESÍDUÁRIA DE SUINOCULTURA PROCESSADA POR
BIODIGESTOR EM MODELOS ANIMAIS E VEGETAIS

Autor: André Luiz Silva

Orientadora: Dr. Maria Andréia Corrêa Mendonça

Coorientadora: Lia Raquel de Souza Santos

Rio Verde – GO

Fevereiro – 2020

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DA ÁGUA
RESÍDUÁRIA DE SUINOCULTURA PROCESSADA POR
BIODIGESTOR EM MODELOS ANIMAIS E VEGETAIS

Autor: André Luiz Silva
Orientadora: Dr. Maria Andréia Corrêa Mendonça
Coorientadora: Lia Raquel de Souza Santos

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde
Área de concentração: Conservação dos recursos naturais.

Rio Verde – GO

Fevereiro - 2020

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

S586e Silva, André Luiz
Efeitos genotóxicos e citotóxicos da água
residuária de suinocultura processada por
biodigestor em modelos animais e vegetais / André
Luiz Silva; orientadora Maria Andréia Corrêa
Mendonça; co-orientadora Lia Raquel de Souza Santos.
-- Rio Verde, 2020.
103 p.

Dissertação (em Programa de pós-graduação em
Biodiversidade e Conservação) -- Instituto Federal
Goiano, Campus Rio Verde, 2020.

1. Anormalidades eritrocitárias nucleares. 2.
Teste de micronúcleo. 3. Ecotoxicologia. 4. Anfíbios.
5. Alterações cromossômicas. I. Mendonça, Maria Andréia
Corrêa, orient. II. Santos, Lia Raquel de Souza,
co-orient. III. Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: André Luiz Silva

Matrícula: 2018102310840020

Título do Trabalho: Efeitos genotóxicos e citotóxicos da água residuária de suinocultura processada por biodigestor em modelos animais e vegetais

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 27/04/2020

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

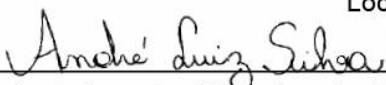
DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde – GO,
Local

27/04/2020.
Data



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DA ÁGUA
RESIDUÁRIA DE SUINOCULTURA PROCESSADA POR
BIODIGESTOR EM MODELOS ANIMAIS E VEGETAIS**

Autor: André Luiz Silva
Orientadora: Maria Andréia Corrêa Mendonça

TITULAÇÃO: Mestre em Biodiversidade e Conservação – Área de
concentração Conservação dos Recursos Naturais.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2020.



Prof. Dr. Lucas Anjos de Souza
Avaliador interno
IF Goiano / Rio Verde



Prof. Dr. Rinneu Elias Borges
Avaliador externo
UniRV / Rio Verde



Prof.ª Dr.ª Maria Andréia Corrêa Mendonça
Presidente da Banca
IF Goiano / Rio Verde

AGRADECIMENTOS

“Agradeço à minha família pelo apoio, incentivo e pela confiança, principalmente ao meu pai, à minha mãe, à minha irmã e aos meus avós, que estiveram sempre ao meu lado, não apenas nestes anos de mestrado, mas durante toda minha vida, me dando apoio emocional.”

“Ao meu namorado pelo companheirismo e às minhas amigas de mestrado Thais, Leticia, Rhayane, Lucy e Eliane, pelas risadas e por me ajudarem a não desistir, por aguentarem o meu drama, me incentivarem e por me ajudarem com o desenvolvimento do meu trabalho. Espero conseguir retribuir, de alguma forma, todos os favores que me fizeram durante o mestrado.”

“Agradeço também à minha orientadora Profa. Maria Andréia, pela confiança, paciência, compreensão e aprendizado, estendendo também para minha coorientadora Profa. Lia Raquel, que me orientou por um ano, esclarecendo minhas dúvidas e me ensinando a desenvolver parte deste trabalho.”

“À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.”

“Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram a crescer pessoalmente ou profissionalmente, seja de forma direta ou indireta, incluindo amigos e professores que já tive.”

BIOGRAFIA DO AUTOR

Me chamo André Luiz Silva, nasci no município de Quirinópolis – GO, no dia 29 de maio de 1996. No momento possuo 23 anos de idade e sou filho do Paulo André da Silva e da Sonia Martins Ramos. Em 2013, aos 16 anos, ingressei na Universidade Estadual de Goiás – Campus Quirinópolis para cursar Ciências Biológicas e após a conclusão deste curso, na mesma universidade, em 2017, cursei a pós-graduação em Cultura, Diversidade e Meio Ambiente. Em março de 2018 ingressei no programa de mestrado em Biodiversidade e Conservação do IF Goiano – Campus Rio Verde e, agora, em fevereiro 2020, concluo mais esta etapa.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	XIV
RESUMO GERAL.....	XVI
ABSTRACT.....	XVIII
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	04
3. OBJETIVOS.....	07
3.1 OBJETIVO GERAL.....	07
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	07
4. CAPÍTULO I	
AVALIAÇÃO GENOCITOTÓXICA EM MODELO ANIMAL: EFEITOS	
SUBLETAIS DA ÁGUA RESÍDUÁRIA DE SUINOCULTURA	
PROCESSADA POR BIODIGESTOR EM GIRINOS DE RÃ-TOURO	
(<i>Lithobates catesbeianus</i>) (SHAW, 1802) E RÃ-QUATRO OLHOS	
(<i>Physalaemus nattereri</i>) (BOULENGER, 1888)	
RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
4.1 INTRODUÇÃO.....	11
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.2.1 Resíduo de suinocultura.....	12
4.2.2 Espécies utilizadas e delineamento experimental.....	12
4.2.3 Concentrações letais e subletais.....	14
4.2.4 Testes comportamentais.....	14
4.2.5 Teste de micronúcleo e outras anormalidades eritrocitárias.....	16
4.2.6 Análises estatísticas.....	17
4.3 RESULTADOS.....	17
4.3.1 Análises químicas da ARS parâmetros físicos e químicos da ARS utilizadas.	17
4.3.2 Teste de comportamento natatório em girinos de rã-touro (<i>Lithobates</i>	

	<i>catesbeianus</i>)	22
4.3.3	Teste de comportamento natatório em girinos de rã-quatro olhos (<i>Physalaemus nattereri</i>)	24
4.3.4	Teste de preferência de substrato em girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>)	27
4.3.5	Teste de preferência de substrato em girinos de rã-quatro olhos (<i>Physalaemus nattereri</i>)	27
4.3.6	Frequência de micronúcleos e outras anormalidades eritrocitárias em girinos de rã-touro expostos a ARS.....	31
4.3.7	Frequência de micronúcleos e outras anormalidades eritrocitárias em girinos de rã-touro que ficaram em período de recuperação.....	32
4.3.8	Recuperação dos girinos de rã-touro (comparação entre as frequências dos danos nucleares)	34
4.3.9	Frequência de micronúcleos e outras anormalidades eritrocitárias em girinos de rã-quatro olhos expostos a ARS.....	38
4.3.10	Frequência de micronúcleos e outras anormalidades eritrocitárias em girinos de rã-quatro olhos que ficaram em período de recuperação.....	39
4.3.11	Recuperação dos girinos de rã-quatro olhos (comparação entre as frequências dos danos nucleares)	40
4.4	DISCUSSÃO	43
4.5	CONCLUSÃO	50
4.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
5.	CAPÍTULO II	
	AVALIAÇÃO GENOCITOTÓXICA EM MODELO VEGETAL: EFEITOS DA ÁGUA RESÍDUARIA DE SUINOCULTURA PROCESSADA POR BIODIGESTOR EM MERISTEMAS DE CEBOLA (<i>Allium cepa</i>) E ALFACE (<i>Lactuca sativa</i>)	
	RESUMO	58
	ABSTRACT	59
5.1	INTRODUÇÃO	60
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	61
5.2.1	Modelos vegetais na utilização dos bioensaios	61
5.2.2	Resíduo de suinocultura	61
5.2.3	Delineamento dos bioensaios	61
5.2.4	Análises Macroscópicas	63
5.2.5	Análises Microscópicas	63
5.2.6	Análises estatísticas	64
5.3	RESULTADOS	65
5.3.1	Análises químicas do resíduo	65
5.3.2	Análises do crescimento das raízes de alface (<i>Lactuca sativa</i>)	66
5.3.3	Análises do crescimento das raízes de cebola (<i>Allium cepa</i>)	68
5.3.4	Índice mitótico dos meristemas de alface e cebola	68
5.3.5	Alterações cromossômicas, micronúcleos e anormalidades nucleares de alface.....	72
5.3.6	Alterações cromossômicas, micronúcleos e anormalidades nucleares de cebola.....	73
5.4	DISCUSSÃO	76
5.5	CONCLUSÃO	81
5.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
6.	CONCLUSÃO GERAL	86

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
<p>CAPÍTULO I. AVALIAÇÃO GENOCITOTÓXICA EM MODELO ANIMAL: EFEITOS SUBLETAIS DE RESÍDUO DE SUINOCULTURA PROCESSADO POR BIODIGESTOR EM GIRINOS DE RÃ-TOURO (<i>Lithobates catesbeianus</i>) (SHAW, 1802) E RÃ-QUATRO OLHOS (<i>Physalaemus nattereri</i>) (BOULENGER, 1888)</p>	
<p>Tabela 1. Macronutrientes, micronutrientes e outros parâmetros do resíduo de suinocultura processado pelo biodigestor, juntamente com os valores permitidos pelo CONAMA 397/2008</p>	18
<p>Tabela 2. Média dos valores dos parâmetros físicos e químicos das bandejas com girinos de rã-touro expostos as soluções de resíduo de suinocultura processados por biodigestores.....</p>	20
<p>Tabela 3. Média dos valores dos parâmetros físicos e químicos das bandejas com girinos de rã-quatro olhos expostos as soluções de resíduo de suinocultura processados por biodigestores.....</p>	21
<p>Tabela 4. Tipos de comportamento natatório dos girinos de rã-touro expostos no resíduo de suinocultura e durante a recuperação em água limpa.....</p>	23

Tabela 5. Tipos de comportamento natatório dos girinos de rã-quatro olhos expostos no resíduo de suinocultura e durante a recuperação em água limpa..... 25

Tabela 6. Porcentagem de preferência entre os substratos de fundo claro e escuro dos girinos de Rã-touro submetidos ao teste comportamental de substrato durante os dias de exposição e de recuperação do resíduo de suinocultura..... 29

Tabela 7. Porcentagem de preferência entre os substratos de fundo claro e escuro dos girinos de Rã-quatro olhos submetidos ao teste comportamental de substrato durante os dias de exposição e de recuperação do resíduo de suinocultura..... 30

Tabela 8. Valores de média e desvio-padrão da frequência de MN e AENs em eritrócitos de girinos de rã-touro expostos ao resíduo de suinocultura..... 32

Tabela 9. Valores de média e desvio-padrão da frequência de MN e AENs em girinos de rã-touro que ficaram de recuperação em água limpa após serem expostos ao resíduo de suinocultura..... 34

Tabela 10. Valores de média e desvio-padrão de MN e AENs em eritrócitos de girinos de rã-quatro olhos expostos ao resíduo de suinocultura..... 38

Tabela 11. Valores de média e desvio-padrão de MN e AENs em eritrócitos de girinos de rã-olhos que ficaram de recuperação em água limpa após serem expostos ao resíduo de suinocultura 40

CAPITULO II. AVALIAÇÃO GENOCITOTÓXICA EM MODELO VEGETAL: EFEITOS DA ÁGUA RESÍDUARIA DE SUINOCULTURA PROCESSADA POR BIODIGESTOR EM MERISTEMAS DE CEBOLA (*Allium cepa*) E ALFACE (*Lactuca sativa*)

Tabela 1. Macronutrientes, micronutrientes e outros parâmetros do resíduo de suinocultura processado pelo biodigestor, juntamente com os valores permitidos pelo CONAMA 397/2008..... 63

Tabela 2. Valores de média e desvio padrão do comprimento das raízes de <i>A. cepa</i> e <i>L. sativa</i> expostas a ARS.....	69
Tabela 3. Índice mitótico e porcentagem das diferentes fases do ciclo celular e alterações cromossômicas/anormalidades nucleares de <i>L. sativa</i>	71
Tabela 4. Índice mitótico e porcentagem das diferentes fases do ciclo celular e alterações cromossômicas/anormalidades nucleares de <i>A. cepa</i>	71
Tabela 5. Valores de média e desvio-padrão das alterações cromossômicas e anormalidades nucleares encontradas em <i>L. sativa</i> expostas a ARS.....	75
Tabela 6. Valores de média e desvio-padrão das alterações cromossômicas e anormalidades nucleares encontradas em <i>A. cepa</i> expostas a ARS.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO I. AVALIAÇÃO GENOCITOTÓXICA EM MODELO ANIMAL: EFEITOS SUBLETAIS DE RESÍDUO DE SUINOCULTURA PROCESSADO POR BIODIGESTOR EM GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*) (SHAW, 1802) E RÃ-QUATRO OLHOS (*Physalaemus nattereri*) (BOULENGER, 1888)

Figura 1. (A) Representação da vista superior de uma bandeja de girinos com metade do fundo claro e metade escuro. (B- E) Fotos do delineamento experimental das bandejas com as concentrações de resíduo de suinocultura e com os girinos..... 15

Figura 2. Exemplos de anormalidades nucleares encontradas e analisadas em eritrócitos de rã – quatro olhos (*Physalaemus nattereri*). (A) Célula com núcleo normal. (B) Célula com micronúcleo. (C) Núcleo entalhado. (D) Núcleo reniforme. (E) Célula com binucleação. (F) Célula anucleada. (G) Núcleo com broto. (H) Núcleo segmentado..... 16

Figura 3. Frequência de micronúcleos (A) e núcleos entalhados (B) em girinos de rã-touro entre os tratamentos, demonstrando os efeitos subletais do composto de ARS..... 31

Figura 4. Frequência de núcleos entalhados (A), células anucleadas (B) e a soma de ANEs (C) em girinos de rã-touro entre os tratamentos em que os girinos ficaram em período de recuperação..... 33

Figura 5. Comparação entre a frequência de núcleo entalhado na C1 (A), da soma de ANEs na C1 (B), de micronúcleos na C2 (C) e de núcleo entalhado na C2 (D) de girinos de rã-touro que foram expostos a ARS com os girinos que foram submetidos ao período de recuperação..... 35

Figura 6. Comparação entre a frequência da soma das ANEs na C2(A), de micronúcleos na C3 (B) e de núcleo entalhado do CP (C) de girinos de rã-touro que foram expostos a ARS com os girinos que foram submetidos ao período de recuperação..... 37

Figura 7. Frequência de núcleos entalhados (A) e a soma de ANEs (B) em girinos de rã-quatro olhos entre os tratamentos, demonstrando os efeitos subletais do composto de resíduo de suinocultura..... 39

Figura 8. Comparação entre a frequência de células binucleadas (A), núcleo entalhado (B) e o total de ANEs (C) da C3 de girinos de rã-quatro olhos que foram expostos a ARS com os girinos que foram submetidos ao período de recuperação..... 42

CAPITULO II. AVALIAÇÃO GENOCITOTÓXICA EM MODELO VEGETAL: EFEITOS DA ÁGUA RESÍDUARIA DE SUINOCULTURA PROCESSADA POR BIODIGESTOR EM MERISTEMAS DE CEBOLA (*Allium cepa*) E ALFACE (*Lactuca sativa*)

Figura 1. (A) Sistema de marcação numérica das sementes durante o experimento. (B) Fotografia das raízes a ser utilizada para a medição do comprimento..... 63

Figura 2. Alterações cromossômicas e anormalidades nucleares encontradas em células meristemáticas de cebola e de alface. Núcleo normal (A), prófase (B), metáfase (C), anáfase (D), telófase (E), micronúcleo na interfase (F), micronúcleo na prófase (G), ponte cromossômica na telófase (H), ponte cromossômica na anáfase (I), c-metáfase (J), quebra e perda cromossômica na metáfase (K), broto nuclear (L), perda cromossômica na anáfase

(M), quebra cromossômica na anáfase (N) e aderências cromossômicas (O-P).....	64
Figura 3. Comprimento das raízes de <i>L. sativa</i> com 24 hora (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) de exposição as concentrações de ARS.....	67
Figura 4. Comprimento das raízes de <i>A. cepa</i> com 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) de exposição as concentrações da ARS.....	70
Figura 5. Frequência de células em divisão (Prófase, Metáfase, Anáfase e Telófase) de <i>A. cepa</i> submetidos ao teste de ANOVA.....	72
Figura 6. Gráficos de frequência de células com aderência cromossômica (A) e com micronúcleos na interfase (B) encontradas nos indivíduos de <i>A. cepa</i> expostos as concentrações de ARS.....	74

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

ACH.....	Acetilcolina
AchE.....	Acetilcolinesterase
Al.....	Alumínio
ANEs.....	Alterações nucleares eritrocitárias
ANU.....	Anucleada
ARS.....	Água residuária de suinocultura
ChEs.....	Colinesterases
Be.....	Berílio
B.O.D.....	Biochemical Oxygen Demand
BN.....	Binucleação
BUD.....	Broto nuclear
Cd.....	Cádmio
CN.....	Controle negativo
CP.....	Controle positivo
Cu.....	Cobre

DIC.....	Delineamento Inteiramente Casualizado
ET.....	Entalhado
Fe.....	Ferro
HCl.....	Ácido clorídrico
Hg.....	Mercúrio
Li.....	Lítio
MN.....	Micronúcleo
Mn.....	Manganês
Ni.....	Níquel
Pb.....	Chumbo
RE.....	Reniforme
SG.....	Segmentado
Zn.....	Zinco

RESUMO GERAL

SILVA, ANDRÉ LUIZ. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, 27 de Fevereiro de 2020. **Efeitos genotóxicos e citotóxicos da água residuária de suinocultura processada por biodigestor em modelos animais e vegetais.** Orientadora: Dra. Maria Andréia Côrrea Mendonça. Coorientadora: Dra. Lia Raquel de Souza Santos

A destinação dos resíduos a biodigestores para a fertilização e irrigação de lavouras tem crescido como alternativa economicamente viável para a agricultura, aproveitando a matéria orgânica e os nutrientes oriundos desse resíduo para adubação. No entanto, sua utilização tem sido questionada uma vez que, por ser muito rico em macro e micronutrientes, o uso descontrolado pode provocar efeitos adversos aos esperados. Diante disto, o objetivo deste trabalho é de avaliar os efeitos genotóxicos e citotóxicos da ARS em modelos vegetais, como cebola (*Allium cepa*) e alface (*Lactuca sativa*) e também em modelos animais, como em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) e rã-quatro olhos (*Physalaemus nattereri*) expostos a água residuária de suinocultura processado pelo biodigestor (ARS). Para isto, as espécies animais e vegetais foram expostas a ARS, sendo que nas espécies animais foi avaliado o comportamento e a frequência de micronúcleos (MN) e outras anormalidades nucleares (ANEs) e nas espécies vegetais foi avaliado o crescimento, índice mitótico (IM), alterações cromossômicas (AC) e anormalidades nucleares. Os resultados apontaram alterações comportamentais e a presença significativa de MN e ANEs para ambas espécies animais indicando genotoxicidade e citotoxicidade da ARS para anfíbios, enquanto para o modelo vegetal os resultados apontaram que para *A. cepa*, houve inibição no crescimento da raiz, diminuição do IM e diferenças significativas para aderência cromossômica, um tipo de AC, apontando também citotoxicidade e genotoxicidade da ARS em espécie vegetal. A toxicidade da ARS foi atribuída a presença de metais pesados presentes no resíduo que

pode provocar a inibição de colinesterases, provocando alterações comportamentais nos girinos e também a danos nos cromossomos, além de provocar estresse oxidativo nas plantas pela produção de espécies reativas de oxigênio que afeta o crescimento e desenvolvimento das plantas, além de provocar alterações cromossômicas e anormalidades nucleares. Com isto, concluiu-se que a ARS possui potencial genotóxico e citotóxico em ambos os modelos escolhidos para esse estudo, tanto o animal quanto o vegetal.

Palavras-chave: Anormalidades eritrocitárias nucleares; Teste de micronúcleo; Ecotoxicologia; Anfíbios; Alterações cromossômicas; *Allium cepa*; *Lactuca sativa*.

ABSTRACT

SILVA, ANDRÉ LUIZ. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, February, 27th, 2020. **Genotoxic and cytotoxic effects of swine wastewater processed by biodigester in animal and plant models.** Advisor: Dr. Maria Andréia Corrêa Mendonça. Co-advisor: Dr. Lia Raquel de Souza Santos.

The destination of residues to biodigesters for crops fertilization and irrigation has arisen as an economically viable alternative for agriculture, taking advantage of organic matter and nutrients from this residue for plant fertilization. However, its use has been questioned as it is very rich in macro and micronutrients and it may lead to adverse effects. The purpose of this work is to evaluate the genotoxic and cytotoxic effects of ARS in plant models (*Allium cepa* and *Lactuca sativa*), and in animal models, (*Lithobates catesbeianus* and *Physalaemus nattereri*) exposed to swine wastewater processed by the biodigester (SWB). For this, animal and plant species were exposed to SWB. In animal species, the behavior and frequency of micronuclei (MN) and other nuclear abnormalities (NA) were evaluated. In plant species, growth index, mitotic index (MI), chromosomal changes (CC) and nuclear abnormalities (NA) were evaluated. The results showed behavioral changes and the significant presence of MN and NA for both animal species indicating genotoxicity and cytotoxicity of the SWB for amphibians. In plant models, we found root growth inhibition in *A. cepa*, decreasing of MI and significant differences for chromosomal adherence, a type of CC, also pointing to cytotoxicity and genotoxicity of SWB in plant species. The observed toxicity can be caused by heavy metals existing in SWB, which is related with cholinesterase inhibition, causing behavioral changes in tadpoles. Additionally, the heavy metals can impair cell division and promote NA and MN. In addition, these elements can cause oxidative stress in plants, by means of production of reactive oxygen species that affects the growth and development of plants,

leading to CC and NA. Finally, we concluded that the SWB shows genotoxic and cytotoxic effects in animal and plants.

Keywords: Erythrocyte nuclear abnormalities; Micronucleus; Ecotoxicology; Amphibians; Chromosome alterations; *Allium cepa*; *Lactuca sativa*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Verifica-se, em todo o mundo, um crescimento contínuo no consumo de alimentos, o que gera uma necessidade de produção mundial para suprir esta demanda. Neste cenário, dentre as diferentes cadeias produtivas, destaca-se as de produção animal, principalmente a produção global de carne de suínos que, no ano de 2015, representou 38% do total de carne produzida no mundo, superando as aves (35%) e a carne bovina (21%) (OECD-FAO, 2016).

A criação de suínos gera uma grande quantidade de dejetos e, atualmente, o que ocorre com frequência em granjas suínas em operação é a destinação dos resíduos a biodigestores, com o intuito de utilizá-los para a fertilização de lavouras, trazendo ganhos econômicos (ANDREAZZI; SANTOS; LAZARETTI, 2015). A digestão anaeróbica do resíduo da suinocultura provocada pelo biodigestor, além de produzir biogás, reduz a quantidade total de matéria seca, enquanto estabiliza o material orgânico restante, levando a uma redução das emissões de odores (MARCATO *et al.*, 2007).

Entretanto, apesar do foco da utilização desta água residuária na agricultura ser devido à riqueza de macronutrientes, como o nitrogênio e o fósforo, deve-se considerar também as concentrações de metais, como o zinco, cobre, cromo, cobalto, manganês e ferro que podem ser altas, visto que esses elementos são comumente utilizados como suplementos na alimentação animal para satisfazer às exigências minerais e melhorar o desempenho do crescimento dos animais (FENG *et al.*, 2018). Em suínos, as taxas de absorção de Cu e Zn são de apenas 10-20% do total adicionado (FENG *et al.*, 2018), o que culmina com a absorção pelos animais de pequenas quantidades de miligramas destes metais, sendo a maior parte desses elementos excretada nas fezes (CANG *et al.*, 2004).

Portanto, a água residuária de suinocultura (ARS) pode ser rica em metais pesados, e provocar a contaminação do solo e da água. Sabe-se que todos seres vivos, incluindo plantas, animais e microorganismos, necessitam de água (VARDHAN *et al.*, 2019). Para plantas que crescem em solos contaminados por metais pesados, por exemplo, ocorrem mudanças no seu metabolismo, sendo que mecanismos fisiológicos permitem o acúmulo de metais e menor geração de biomassa. A contaminação por metais nos humanos pode dar-se pela alimentação ou água (KIM *et al.* 2019). Pessoas expostas a grandes quantidades de metais pesados, podem manifestar toxicidade gastrointestinal e

renal, problemas cardiovasculares, tumores, disfunções hemáticas, melancólicas, tubulares e glomerulares, além de osteoporose (VARDHAN et al., 2019),

Uma revisão sobre os principais estressores químicos para anfíbios, feita por FEDORENKOVA *et al.* (2012), identificou o Cu como um dos principais contaminantes, sendo o mais preocupante como fator de risco ecológico para o declínio dos anfíbios. Portanto, embora seja comum a utilização deste resíduo para a fertirrigação, conforme a composição do dejetos suíno e as diferentes formas de uso, os resultados podem ser benéficos (adubação sem precisar utilizar outros fertilizantes minerais) ou prejudiciais ao ambiente (contaminação do solo e da água) (ALVES *et al.*, 2008) e, ao considerarmos os danos que este tipo de resíduo pode causar ao meio ambiente, faz-se necessária a avaliação de risco ambiental, que tem como importante requisito a avaliação de toxicidade.

Dentre as diferentes formas de estudar a toxidez, a ecotoxicologia explica a relação entre os poluentes químicos, o ambiente em que são liberados e a biota naquele ambiente. Portanto, a realização de estudos ecotoxicológicos que possam definir potenciais riscos é importante para a biodiversidade, permitindo planejar medidas para atenuar seus prováveis impactos por meios de ações regulatórias e técnicas (CARVALHO; PIVOTO, 2011)

Os estudos ecotoxicológicos propõem testes de toxicidade com organismos, os chamados bioensaios. Dentre os diferentes tipos, os bioensaios para avaliação genotóxica permitem avaliar os efeitos de exposições ao material genético por meio da avaliação de mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA (VALENTE *et al.*, 2017). Enquanto os bioensaios de citotoxicidade avaliam a interferência induzida por agentes químicos nos processos metabólicos celulares e investigam a maneira em que esses processos podem vir a intervir no crescimento/multiplicação celular, ou até mesmo culminar na morte celular (ABREU, 2008).

A utilização de bioensaios para a detecção de danos no material genético tem permitido a quantificação e reconhecimento de uma ampla gama de substâncias com atividade genotóxica (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Bioensaios com organismos aquáticos (incluindo girinos), estão sendo cada vez mais utilizados pois é um sistema modelo que permite a avaliação de muitos parâmetros ambientalmente significativos, não só a genotoxicidade mas também o efeito dos poluentes no sucesso reprodutivo,

desenvolvimento e até sobrevivência embrionária (CALEVRO, 1999). Já os bioensaios que utilizam plantas superiores como modelos são amplamente utilizados em estudos de prospecção de efeitos de poluentes ambientais por apresentarem características desejáveis como rapidez no crescimento, baixo custo, alta sensibilidade e boa correlação com modelos animais (LEME; MARIN-MORALES, 2009). E, embora Grant (1978) já tenha demonstrado que o teste de alterações cromossômicas em *Allium cepa* apresenta boa correlação com os testes de micronúcleos em cultura de células de mamíferos após exposição a alguns pesticidas, considerar uma abordagem comparativa é uma forma de avaliar a sensibilidade de cada tipo de célula, visto que o agente poluente estará agindo por mecanismos diferentes e as células terão respostas diferentes, considerando as barreiras físicas e os meios de defesa e mecanismos implicados em cada tipo de célula.

Considerando uma abordagem ecotoxicológica, poucos estudos foram realizados com a ARS, sendo que os mais frequentes analisaram o efeito do resíduo na fertilização de diferentes tipos de lavouras, como o estudo apresentado por PRIOR *et al.* (2015), em que os autores avaliaram o composto na cultura do milho, ou o trabalho realizado BATISTA *et al.* (2014), em que se estudou o efeito do resíduo no desenvolvimento e na qualidade de mudas de eucaliptos. Dentre a literatura consultada, poucos trabalhos avaliaram aspectos da toxicidade deste resíduo, como PANIAGO *et al.* (2015) que avaliou a ecotoxicologia da ARS em minhocas em três tipos diferentes de solos, por meio de parâmetros de letalidade, fuga e reprodução. Os referidos autores concluíram que nas concentrações analisadas o resíduo de suinocultura não induziu danos sob os parâmetros analisados.

Considerando que são incipientes avaliações ecotoxicológicas acerca dos possíveis efeitos dos resíduos de suinocultura em diferentes tipos de organismos, neste estudo, foram escolhidos girinos e sementes germinadas de cebola de alface como modelos biológicos para os bioensaios realizados. Com isto, o trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo o objetivo do primeiro a avaliação de parâmetros genotóxicos e citotóxicos da ARS através da aplicação do teste de micronúcleo e outras anormalidades eritrocitárias em células sanguíneas de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) e rã-quatro olhos (*Physalaemus nattereri*) expostos ao resíduo. Já no segundo capítulo, foram realizadas avaliações de citogenotoxicidade da ARS em células meristemáticas de raiz de alface (*Lactuca sativa*) e cebola (*Allium cepa*) por meio de avaliações citogenéticas (ciclo

celular e alterações cromossômicas) bem como testes macroscópicos, por meio do monitoramento do processo de germinação e crescimento radicular das plântulas.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. L. C. **Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de Quantificação de Proteínas Totais em células 3T3**. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2008.

ALVES, M. V.; SANTOS, J. C. P.; GOIS, D. T.; ALBERTON, J. V.; BARETTA, D. Macrofauna do solo influenciada pelo uso de fertilizantes químicos e dejetos de suínos no oeste do estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32 p. 589-598, 2008.

ANDREAZZI, M. A; SANTOS, J. M. G.; LAZARETTI, R. M. J. Destinação dos resíduos da suinocultura em granjas das regiões noroeste e sudoeste do Paraná. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 3, p. 744-751, 2015.

BATISTA, R. O; MARTINEZ, M. A; PAIVA, H. N; BATISTA, R. O; CECON, P. R. O efeito da água residuária da suinocultura no desenvolvimento e qualidade de mudas de *Eucalyptus urophylla*. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 1, p. 127-135, 2014.

CANG, L.; WANG, Y. J.; ZHOU D. M.; DONG, Y. W. Heavy metals pollution in poultry and livestock feeds and manures under intensive farming in Jiangsu Province, China. **Journal of Environmental Sciences**, v. 16, p. 371-374, 2004.

CARVALHO, N. L., PIVOTO, T. S. Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agrônômica. **Revista Eletrônica do PPGEAmb-CCR/UFSM**, v. 2, n. 2, p. 176 –192, 2011.

CALEVRO, F. Bioassays for testing effects of Al, Cr and Cd using development in the amphibian *Pleurodeles waltl* and regeneration in the planarian *Dugesia etrusca*. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 2, n. 3, p. 281–288, 1999.

FEDORENKOVA, A., VONK, J. A., LENDERS, H. J. R., CREEMERS, R. C. M., BREURE, A. M., HENDRIKS, A. J. Ranking ecological risks of multiple chemical

stressors on amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1416–1421, 2012

FENG, Z.; ZHU, H.; DENG, Q.; HE, Y.; LI, J.; YIN, J.; GAO, F.; HUANG, R.; LI, T.; Environmental pollution induced by heavy metal(loid)s from pig farming. **Environmental Earth Sciences**, v. 77, p. 77-103, 2018.

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

KIM, J. J., KIM, Y. S., KUMAR, V. Heavy metal toxicity: an update of chelating therapeutic strategies. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 54, p. 226-231, 2019.

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.

MARCATO, C. E.; PINELLI, E.; POUÉCH, P.; WINTERTON, P.; GUIRESSE, M. Particle size and metal distributions in anaerobically digested pig slurry. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2340-2348, 2007.

OECD-FAO. **Agricultural Outlook 2016-2025**. OECD Publishing, Paris, 2016.

PRIOR, M.; SAMPAIO, S. C.; NÓBREGA, L. H. P.; DIETER, J. COSTA, M. S. M. Estudo da associação de água residuária de suinocultura e adubação mineral na cultura do milho e no solo. **Revista Engenharia Agrícola**, v. 35, n. 4, p. 744-755, 2015.

PANIAGO, G. G. SAMPAIO, S. C.; ROSA, D. M.; TESSARO, D.; MALDANER, P. A.; MODEL, K. J.; CORRÊA, M. M.; REMOR, M. B. Ecotoxicidade da água residual de suinocultura usando minhocas *Eisenia andrei* como bioindicador. **Revista de Ciências Agrárias [online]**, v. 39, n. 3, p. 447-45, 2016.

VARDHAN, K. H., KUMAR, P. S., PANDA, R. C. A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives. **Journal of Molecular Liquids**, v. 290, p.111-197. 2019.

VALENTE, D; COSTA-AMARAL, I; CARVALHO, L; SANTOS, M; CASTRO, V; RODRIGUES, D; FALCO, A; SILVA, C; NOGUEIRA, S; GONÇALVES, E; MOREIRA, J; ANDRÉ, L; TEIXEIRA, L; SARCIANELLI, P; SISENANDO, H; OLIVEIRA, M; PERINI, J; MATTOS, R; LARENTIS, A. Utilização de biomarcadores

de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, p. 1-21, 2017.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos genotóxicos e citotóxicos da ARS em células meristemáticas de raiz de cebola (*Allium cepa*) e alface (*Lactuca sativa*) e também em células sanguíneas de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) e rã-quatro olhos (*Physalaemus nattereri*) expostos ao resíduo, afim de verificar as diferentes respostas destes organismos frente a uma contaminação por ARS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a genotoxicidade e citotoxicidade da ARS por meio da análise de frequência de alterações cromossômicas, anormalidades nucleares, crescimento da raiz e índice mitótico em células de raiz de *Allium cepa* e *Lactuca sativa* expostas ao resíduo;
- Testar a genotoxicidade e citotoxicidade da ARS em células sanguíneas de girinos de *Lithobates catesbeianus* e *Physalaemus nattereri* expostos ao resíduo por meio de análise de testes comportamentais, frequência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares;
- Avaliar se as células vegetais meristemáticas e as células animais sanguíneas de girinos das espécies escolhidas são eficientes para a avaliação da toxicidade da ARS;
- Verificar as diferentes respostas dos efeitos genotóxicos e citotóxicos dos dois tipos de células (animal e vegetal) a fim de avaliar se a ARS provoca toxidez em todas as espécies testadas.

4. CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO GENOCITOTÓXICA EM MODELO ANIMAL: EFEITOS SUBLETAIS DA ÁGUA RESÍDUÁRIA DE SUINOCULTURA PROCESSADA POR BIODIGESTOR EM GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*) (SHAW, 1802) E RÃ-QUATRO OLHOS (*Physalaemus nattereri*) (BOULENGER, 1888)

RESUMO

Com a expansão populacional, houve uma intensificação da suinocultura no Brasil e com isto os impactos ambientais também foram ampliados. Neste sentido, entender como esta atividade pode impactar diferentes espécies e comunidades é uma atividade desafiadora, principalmente quando consideramos os anfíbios, que estão globalmente em declínio. Diante do exposto, o objetivo deste capítulo foi avaliar os efeitos subletais da água residuária de suinocultura processada por biodigestor (ARS) em células sanguíneas de girinos de *Lithobates catesbeianus* e *Physalaemus nattereri* por meio de análise de testes comportamentais, frequência de micronúcleos (MN) e outras anormalidades nucleares (ANEs). Para isto, girinos de ambas as espécies foram expostos a ARS por 96 horas e, posteriormente, submetidos à recuperação, em água limpa, para a avaliação dos efeitos genotóxicos e citotóxicos. Os testes comportamentais mostraram que os girinos expostos, de ambas espécies, não tiveram um comportamento de modo normal como esperado e/ou encontrado no controle negativo. Para o teste de MN e ANEs foram encontrados resultados significativos nos girinos de rã-touro para micronúcleo e núcleo entalhado, enquanto os girinos de rã-quatro olhos, houve significância para núcleo entalhado, mostrando efeitos genotóxicos do resíduo. O período de recuperação adotado não foi suficiente para recuperar os danos em girinos de rã-touro. As alterações comportamentais podem estar associadas a inibição de colinesterases já que a interrupção da função normal do sistema nervoso pode afetar o desempenho locomotor ou a função muscular dos girinos, principalmente a exposição à metais pesados, enquanto os efeitos genotóxicos também foram associados a presença dos metais pesados na ARS. Concluiu-se que a ARS possui potencial citotóxico e genotóxico, já que afetou o comportamento e apresentou alterações nucleares nos girinos de ambas as espécies expostas e que as 96 horas de período de recuperação não foram o suficiente para recuperá-los dos danos provocados pela ARS.

Palavras-chave: Anfíbios; Anormalidades eritrocitárias nucleares; Teste de micronúcleo.

ABSTRACT

The growth of pig farming in Brazil leads to the increasing of environmental impacts of this activity. Understanding how this activity can impact different species and communities is a challenge, especially for amphibians that are globally in decline. The aim of this chapter was to evaluate the sublethal effects of swine wastewater processed by biodigester (SWB) in blood cells of tadpoles of *Lithobates catesbeianus* and *Physalaemus nattereri* through behavioral tests, frequency of micronuclei (MN) and other nuclear abnormalities (NAs). For this purpose, tadpoles of both species were exposed to SWB for 96 hours and were subsequently recovered in clean water after exposure to assess genotoxic and cytotoxic effects of this waste. Behavioral tests showed that exposed tadpoles of both species did not behave in a normal way as expected and / or found in the negative control. The MN and ANE tests were significant for *Lithobates catesbeianus* tadpoles, while *Physalaemus nattereri* tadpoles showed significance for the carved nucleus, showing genotoxic effects of the residue. Additionally, the recovery time used was not enough for *Lithobates catesbeianus*. The exposure to heavy metals present in SWB can be related to the behavioral changes observed, which can be associated with cholinesterase inhibition by disrupting normal nervous system function, leading to effect in locomotion performance or muscle function of tadpoles. The genotoxic effects have also been associated with the presence of metals heavy in the SWB. In conclusion, SWB has cytotoxic and genotoxic potential, as this waste affected the behavior and caused nuclear changes in the tadpoles of both species exposed, and the recovery period (96 hours) were not enough to recover them from the damages caused by the SWB.

Keywords: Amphibians; Erythrocyte nuclear abnormalities; Micronucleus; Ecotoxicology.

4.1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de produção agropecuários dão origem a diversos tipos de resíduos e o crescimento do setor pecuário aumenta a pressão sobre os recursos naturais e o meio ambiente, contribuindo, até mesmo, com as mudanças climáticas (ROBINSON, *et al.* 2014). No Brasil, a atividade do setor suinícola detém grande importância econômica e social visto que é uma das mais importantes na produção de carne (IBGE, 2016)

Com a expansão populacional, a intensificação da suinocultura no Brasil, a partir da década de 1970 por meio do processo de integração com empresas abatedoras/processadoras, trouxe uma série de avanços na cadeia produtiva colocando o país entre os maiores produtores e exportadores mundiais de carne suína (ITO; GUIMARÃES; AMARAL, 2016). Com esta intensificação, os impactos ambientais também foram ampliados. Neste sentido, entender como esta atividade pode impactar diferentes espécies não-alvo e comunidades é uma atividade desafiadora, principalmente para os anfíbios, que estão globalmente em declínio provocado em parte pela perda de habitat, fragmentação e degradação de habitats, doenças introduzidas e mudanças climáticas (HOULAHAN *et al.* 2000, COLLINS E STORFER 2003; SCHEELE *et al.* 2019 HOWELL *et al.* 2019).

Atualmente, existem mais de oito mil espécies de anfíbios no mundo (FROST, 2019), sendo o Brasil o país com o maior número de representantes, com mais de 1100 espécies, das quais mais de mil espécies pertencem a ordem Anura (sapos, rãs e pererecas) (SBH, 2019). Com isto em mente, girinos foram escolhidos como bioindicadores neste estudo por se tratar de organismos sensíveis a alterações ambientais, principalmente por possuírem pele permeável. Além disso, as populações de anfíbios possuem elevada importância na teia trófica, já que qualquer alteração que sofram podem desencadear respostas em série (efeito cascata), desequilibrando toda a cadeia trófica afetando todo o ecossistema (VASCONCELOS, 2014).

A utilização de espécies com importância ecológica e abundantes no ambiente natural estudado é uma ferramenta confiável para o monitoramento do meio ambiente (NINKMAA, 2014). Neste contexto, para este trabalho utilizou-se duas espécies (*Lithobates catesbeianus* e *Physalaemus nattereri*). Aliado a isto, são incipientes avaliações ecotoxicológicas acerca dos possíveis efeitos do ARS em girinos.

Diante do exposto, o objetivo deste capítulo foi avaliar os efeitos subletais do resíduo de suinocultura processado por biodigestor por meio da (i) análise comportamental natatória dos girinos e em relação ao tipo de preferência de substrato dos girinos, e (ii) aplicação do teste de micronúcleo e outras anormalidades eritrocitárias em células sanguíneas de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) e rã-quatro olhos (*Physalaemus nattereri*) expostos a ARS.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Resíduo de suinocultura

A água residuária de suinocultura processada por biodigestor (ARS) é composta por dejetos (fezes, urina, resíduos de ração e água) que contêm componentes inorgânicos e orgânicos (ITO; GUIMARÃES; AMARAL, 2016). Sendo que sua composição pode variar de acordo com a idade dos suínos, da sua alimentação, quantidade de indivíduos, alojamento e fatores ambientais como temperatura e umidade (CHYNOWETH *et al.* 1999; NAGARAJAN *et al.* 2019).

O resíduo (ARS) utilizado para o presente estudo foi coletado em uma granja comercial no município de Rio Verde – Goiás, Brasil. Foram realizadas análises da composição química do resíduo, incluindo os macros e micronutrientes no laboratório Solotech Cerrado, situado em Rio Verde – Goiás, Brasil (Tabela 1).

4.2.2 Espécies utilizadas e delineamento experimental

Para a realização dos testes e análises acerca do potencial citogenotóxico do resíduo de suinocultura em modelo animal, girinos das espécies *Lithobates catesbeianus* (rã-touro) e *Physalaemus nattereri* (rã-quatro olhos) foram utilizados como sistema teste nos bioensaios realizados. Espera-se que um bioensaio com a utilização destas duas espécies possa ajudar a avaliar os efeitos da ARS em uma espécie endêmica e exótica, além de analisar também divergências em suas respostas em exposição da ARS que possam diferenciar ou não em relação a espécie exótica x endêmica.

Como a maioria das espécies de anfíbios tem um ciclo de vida dividido em duas fases (fase larval aquática e fase adulta terrestre), estes organismos podem ser sensíveis à contaminação do solo e da água e, portanto, são considerados bioindicadores valiosos em

estudos ecotoxicológicos e de avaliação de risco ambiental (HE *et al.*, 2014; AMARAL *et al.*, 2019).

Os exemplares de rã-touro foram obtidos em um criadouro comercial, enquanto os exemplares de rã-quatro olhos foram coletados em uma fazenda localizada no município de Rio Verde – Goiás (17°47'48.45”S 50°59'25.40”O). O estágio de desenvolvimento dos girinos se encontrava entre as fases 28G ao 32G, de acordo com Gosner (1960).

Ambas as espécies foram aclimatadas no Laboratório de Biologia Animal do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, em bandejas com bombas de oxigênio para peixes de aquário, por cerca de 4 dias e alimentadas com ração de peixe triturada até o momento da execução dos experimentos. O projeto foi registrado e aprovado junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal Goiano sob o nº 3753130918.

Para o delineamento dos bioensaios, realizados nos meses de março e abril de 2019, foram utilizados 140 animais de cada espécie, divididos em sete repetições com quatro animais cada, totalizando 28 animais expostos por tratamento. Os animais ficaram expostos às diluições do resíduo de suinocultura e aos controles durante 96 horas (CABAGNA *et al.*, 2006) em bandejas de cinco litros, na qual utilizou-se um litro de resíduo diluído por animal, ou seja, em cada bandeja continha quatro animais com quatro litros de diluição, e cada bandeja contabilizava uma réplica.

Posteriormente à exposição, os animais foram anestesiados com gelo e em seguida, o sangue foi coletado por secção caudal de 12 animais por tratamento, direto em lâminas limpas, que foram preparadas por meio da técnica de esfregaço, sendo que os 14 animais restantes foram colocados em novas bandejas com água limpa declorada para a recuperação, por mais 96 horas, seguindo a proporção de um litro de água por girino.

As lâminas de esfregaço sanguíneo, tanto dos animais de exposição quanto dos animais em recuperação, foram fixadas em metanol na geladeira por 20 minutos, e posteriormente, coradas com solução de Giemsa e secas em condição ambiente (GONÇALVES *et al.* 2017). Foram feitas duas lâminas por animal e contabilizadas 1.000 células por animal (CABAGNA *et al.* 2006).

Durante o período de exposição, também foram realizadas, diariamente, análises para avaliar parâmetros físico-químicos das concentrações de resíduos e dos controles por

meio da utilização de sonda multiparâmetro. Foram avaliados pH, condutividade, oxigênio dissolvido, temperatura, sólidos totais dissolvidos, salinidade e resistividade (Tabela 2). Esses parâmetros foram analisados uma vez ao dia, sendo a primeira leitura realizada após 24 horas de exposição dos girinos e a última quando se completou 96 horas de exposição, e em seguida, após 24 horas de recuperação até completar as 96 horas de recuperação.

4.2.3 Concentrações letais e subletais

Para a definição das concentrações a serem utilizadas, foram, primeiramente, realizados testes de letalidade com diluições feitas com o ARS e água dechlorada. A concentração inicial foi de 50% da ARS, seguido por 25%, 12,5%, 6,25% e 3,125%. As concentrações a serem utilizadas para a exposição dos girinos foi definida a partir da dose sub-letal (CL50), resultando em três concentrações a serem utilizadas no experimento: 3,125% (C1), 1,5625% (C2) e 0,78125% (C3). Os parâmetros utilizados para a definição da dose subletal foi de todos os girinos sobreviverem por 96 horas de exposição na dose subletal.

Para o controle negativo foi utilizada água dechlorada, e para o controle positivo a Ciclofosfamida (40mg/L) (CABAGNA *et al.*, 2006), um agente comumente usado em bioensaios com girinos, que induz a genotoxicidade (SINGH *et al.*, 1988).

4.2.4 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados durante o período de exposição e aplicados durante a manhã (8h-10h) e a tarde (15h-17h) em todos os dias de exposição. O primeiro teste consistia na avaliação da preferência do tipo de substrato, no qual as bandejas em que os girinos estavam e que eram transparentes foram cobertas, metade com papel preto, simulando um substrato escuro, e a outra metade transparente foi posta em uma superfície com o fundo branco, simulando um substrato claro (Figura 1).

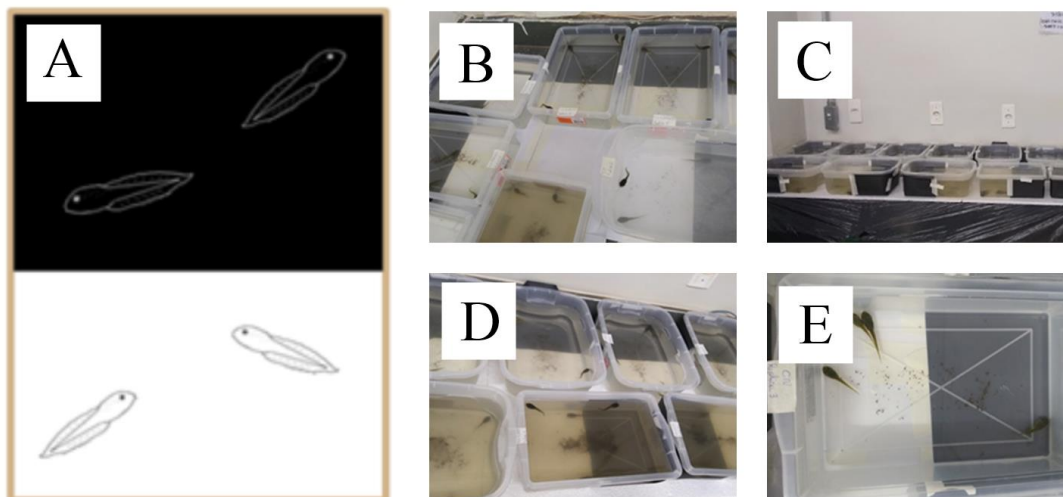


Figura 1: (A) Representação esquemática da vista superior de uma bandeja com metade do fundo claro e metade escuro utilizada para os testes comportamentais. (B- E) Fotos do delineamento experimental, em que as diferentes concentrações de ARS foram utilizadas.

Para este teste foi avaliado o posicionamento dos girinos nos substratos, primeiramente com os girinos em repouso, e em seguida, após a movimentação da água. Ou seja, analisou-se, inicialmente, quantos girinos estavam em cada substrato (claro e escuro), e contabilizou-se quantos girinos estavam em cada substrato 2 minutos após a realização de movimentos circulares na água. Para a movimentação da água foi utilizado um bastão de vidro e eram realizados três movimentos circulares na água de forma lenta, a fim de não provocar nenhum tipo de estresse nos animais, o que poderia afetar nos resultados para danos genotóxicos.

O segundo teste comportamental foi um teste de movimentação natatória adaptado de Wrubleswski *et al.* (2018) descrito inicialmente para girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a pesticidas. Para isso, foi analisado o movimento natatório do girino, que foi classificado como: (3) movimentos de natação iguais ao controle, ou seja, sem modificações nos movimentos natatórios quando comparados ao grupo controle; (2) movimentos de natação diferentes do controle, ou seja, movimentos lentos, reduzidos e/ou circulares; (1) movimentos de natação somente após algum toque estimulando em alguma parte do corpo; e por fim, (0) estático, mas vivo, não se movimenta apesar do toque de estímulo. Nesse teste, foi usado um bastão de vidro para a efetuar o toque de estímulo, sendo o teste realizado juntamente com o teste de preferência de substrato, ou seja, como no primeiro teste foi avaliado a preferência dos girinos pelo substrato em

repouso e após a movimentação, neste teste natatório também foi avaliado o comportamento natatório dos girinos em repouso, isto é, antes da movimentação da água e cerca de dois minutos após a movimentação.

4.2.5 Teste de micronúcleo e outras anormalidades eritrocitárias

O teste de micronúcleos tem sido amplamente utilizado para avaliar a capacidade de um agente induzir a quebra de cromossomos (clastogenicidade da ARS), bem como também avaliar a capacidade do resíduo em afetar a formação de placa metafásica e/ou fuso mitótico (aneugenicidade), ambos capazes de levar à distribuição desigual dos cromossomos durante a divisão celular (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

Para este estudo, além do teste de micronúcleos, outros biomarcadores nucleares também foram considerados com o objetivo de complementar a análise da citogenotoxicidade do resíduo de suinocultura. Estes outros biomarcadores estão relacionados a outras alterações nucleares (ANEs) que, assim como os MNs, podem ter sido provocadas pela exposição dos animais ao resíduo. São elas: binucleação (BN), núcleo segmentado (SG), núcleo entalhado (ET), núcleo reniforme (RE), célula anucleada (ANU) e núcleo com broto (BUD) (BENVINDO-SOUZA *et al.*, 2019) (Figura 2).

A frequência de micronúcleos e de outras anormalidades eritrocitárias em girinos de rã-touro e de rã-quatro olhos foram avaliadas a partir da exposição dos animais as concentrações subletais do resíduo e também após o tempo de recuperação em que os indivíduos permaneceram em água limpa.

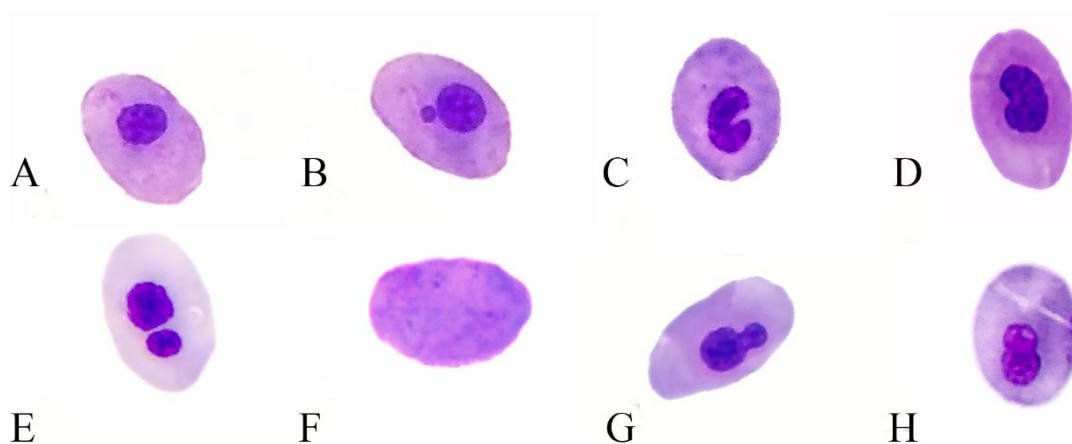


Figura 2: Exemplos de anormalidades nucleares encontradas e analisadas em eritrócitos de rã – quatro olhos (*Physalaemus nattereri*). (A) Célula com núcleo normal. (B) Célula

com micronúcleo. (C) Núcleo entalhado. (D) Núcleo reniforme. (E) Célula com binucleação. (F) Célula anucleada. (G) Núcleo com broto. (H) Núcleo segmentado.

4.2.6 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas dos animais expostos ao resíduo de suinocultura, primeiramente foi testada a normalidade dos dados com o Teste de Levene ($p > 0.05$) e, em seguida, foi utilizada ANOVA One-Way para dados paramétricos ou o teste Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. No entanto, em um primeiro momento, quando os dados se mostravam não paramétricos, eles eram submetidos à transformação $\text{Log}(x+1)$ e a normalidade era testada novamente. Os testes post hoc utilizados foram o Teste de Tukey e o Teste de Student Newman Keuls.

Estes testes foram aplicados considerando a frequência de micronúcleos e das outras anormalidades eritrocitárias separadamente em relação às concentrações do resíduo e aos controles, bem como também considerando a soma de todas as anormalidades nucleares encontradas, com exceção, neste caso, dos micronúcleos.

Para as análises estatísticas de comparação dos indivíduos que foram expostos ao resíduo de suinocultura com os indivíduos que ficaram em recuperação, testou-se a normalidade dos dados com o Teste de Levene ($p > 0.05$). Utilizou-se o Teste T para os dados paramétricos e o Teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Nestes testes foram comparadas a frequência das anormalidades nucleares entre os indivíduos expostos ao resíduo e do grupo controle com os indivíduos remanescentes, que foram expostos, mas que permaneceram em água limpa para um período de recuperação.

O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo, sendo as todas análises realizadas com auxílio do software Statística 7, exceto o teste de Student Newman Keuls, que foi realizado utilizando-se o BioEstat v.5.0.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Análises químicas da ARS e parâmetros físicos e químicos da ARS utilizada

Os resultados referentes à quantificação dos macro e micronutrientes do ARS estão dispostos na tabela 1. Na análise destes valores, a ARS avaliado apresentou valores

acima dos padrões recomendados pelo CONAMA, de acordo com a resolução nº 397/2008 que estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, principalmente de micronutrientes como zinco, cobre, ferro e manganês.

Tabela 1: Macronutrientes, micronutrientes e outros parâmetros do resíduo de suinocultura processado pelo biodigestor, juntamente com os valores permitidos pelo CONAMA 397/2008.

Macronutrientes, Micronutrientes e outros parâmetros	Valores	
	Resíduo	CONAMA
Nitrogênio	3,4 g/L	20,0 mg/L
Fosforo	0,5 g/L	-
Potássio	0,3 g/L	-
Calcio	0,6 g/L	-
Magnésio	0,2 g/L	-
Enxofre	0,4 g/L	-
Matéria Orgânica	0,6 g/L	-
Ferro	125,0 mg/L	15,0mg/L
Manganês	11,4 mg/L	1,0 mg/L
Cobre	54,8 mg/L	1,0 mg/L
Zinco	113,8 mg/L	5,0 mg/L
pH	7,68	-
Densidade	1004 g/L	-
Massa Seca	1,4%	-

Os dados dos parâmetros físicos e químicos das concentrações selecionadas para os tratamentos, mostrados nas Tabelas 2 e 3, apontam que o pH da C1 e C2 de exposição dos girinos de ambas as espécies, e da C3 e do CP de recuperação dos girinos de rã-quatro olhos não estão ideais para o desenvolvimento saudável de anfíbios, visto que o ideal seria entre 6,3 a 7,7 mas, a variação encontrada destes valores foram baixas e estão de acordo com o nível recomendado para organismos aquáticos em geral (entre 6,5 a 8,0) (POLLO *et al.*, 2017).

As médias da temperatura da água estão de acordo com as encontradas por BABINI *et al.*, (2015) e as quantidades dos sólidos totais dissolvidos estão de acordo com a WHO (2011), que aconselha valores abaixo de 600 mg/L para uma água palatável. Para condutividade não existe um padrão estabelecido para girinos (MANSANO *et al.*, 2019),

A média de oxigênio dissolvido se mostrou aceitável para anfíbios de acordo com ODUM; ZIPPEL (2008), que aponta níveis acima de 80% como ideal.

Tabela 2: Média dos valores dos parâmetros físicos e químicos das bandejas com girinos de rã-touro expostos as soluções de resíduo de suinocultura processados por biodigestores

Parâmetros	Bandejas com girinos em exposição					Bandejas com girinos em recuperação				
	C1	C2	C3	CP	CN	C1	C2	C3	CP	CN
pH	7.943	7.822	7.735	7,360	7.682	7.776	7.781	7.800	7,576	7.683
Temperatura (°C)	19,6	19,4	19,9	19,8	19,7	20,9	20,9	20,8	20,9	20,5
Condutividade (μ^s/cm^2)	548,25	437,5	389,25	365,75	342,5	319,5	315,75	327	316,75	329
TDS* (ppm)	274,5	219,25	195,2	183,525	172,125	160,325	158,8	164,525	159,325	165,2
Salinidade (psu)	0,26	0,2075	0,1825	0,1725	0,16	0,1525	0,15	0,155	0,1525	0,155
Resistividade (Ωm)	1,815	2,2775	2,5525	2,7225	2,905	3,1125	3,1425	3,0575	3,1325	3,025
Oxigênio Dissolvido (%)	115	115,4	112,9	109,1	114,2	-	-	-	-	-

*TDS=Sólidos Totais Dissolvidos

Tabela 3: Média dos valores dos parâmetros físicos e químicos das bandejas com girinos de rã-quatro olhos expostos as soluções de resíduo de suinocultura processados por biodigestores

Parâmetros	Bandejas com girinos em exposição					Bandejas com girinos em recuperação				
	C1	C2	C3	CP	CN	C1	C2	C3	CP	CN
pH	7.963	7.915	7.750	7.378	7.661	7.964	7.987	8.019	8.021	7.945
Temperatura (°C)	19,2	19,1	19,2	18,8	18,5	20,5	20,6	20,6	20,8	20,7
Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	417,75	383,5	319,75	288,75	247,25	301,33	276	253,66	256,33	257
TDS* (ppm)	209,4	192,275	161,125	155,825	133,885	140,933	138,633	127,2	128,1	130,66
Salinidade ($^{\text{psu}}$)	0,20	0,1825	0,1425	0,14	0,1275	0,1366	0,1233	0,13	0,123	0,14
Resistividade (Ωm)	2,4125	2,8275	3,14	3,275	3,6475	3,9366	3,97	4,38	3,726	4,21
Oxigênio Dissolvido (%)	107,7	115,7	119,6	-	115,9	103,7	104,03	107,8	106,9	108,3

*TDS=Sólidos Totais Dissolvidos

4.3.2 Teste de comportamento natatório em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)

O teste de comportamento natatório mostrou que, para os indivíduos de rã touro (Tabela 4) expostos a C1, enquanto a água estava em repouso, a grande maioria dos girinos (96%) estavam parados, sem movimentação. Quando a água foi movimentada com um bastão de vidro, mais da metade destes girinos (59%) nadaram de forma normal e regular quando comparada ao controle. Esse resultado foi semelhante obtido com os girinos que ficaram em recuperação, pois a maior parte desses girinos (94%) estavam em repouso enquanto a água estava parada, já quando a água foi mexida a maioria se movimentou de forma normal (69%).

Para os girinos da C2, os resultados foram semelhantes: os girinos que estavam expostos, permaneceram quase todos imóveis (96%) quando a água estava parada; e quando houve movimentos na água, mais da metade deles (63%) nadaram de forma normal. O mesmo ocorreu nos girinos de recuperação, com a maioria estáticos (87%) quando a água estava parada e mais da metade (68%) se movimentaram de forma normal.

A maioria dos girinos expostos da C3 estavam parados (83%) durante a avaliação da água em repouso e quando a água foi movimentada a maior parte deles nadou de forma normal (74%). Os girinos em recuperação da C3 também tiveram comportamentos similares, com 81% deles parados com a água em repouso e 70% deles nadaram de forma normal com a água em movimento.

Os girinos do controle negativo também apresentaram resultados similares aos expostos, pois em um primeiro momento quando a água estava em repouso 73% deles estavam parados e quando a água foi movimentada, 80% deles nadou de forma normal. Esses resultados se prolongaram por mais tempo no período de recuperação, com 92% dos girinos parados na água em repouso e 69% deles se movimentaram com a água em movimento.

Quando se comparou os resultados do período recuperação com o de exposição ao resíduo, observou-se que os girinos expostos aos tratamentos C1, C2 e C3 apresentaram comportamento natatório de forma muito satisfatória quando a água estava em repouso, ou seja, em comparação com o CN quando a água estava parada a porcentagem de girinos parados na C1, C2 e C3 se aproxima do CN. No entanto, a comparação dos resultados da água em movimento mostra que os girinos expostos a C1,

C2 e C3 não estão com o nado de forma normal e satisfatória quanto o CN, ou seja, a porcentagem dos girinos da C1, C2 e C3 da água em movimento mostra que os girinos não estão nadando da forma esperada, semelhante ao CN.

Os resultados do CP mostraram que enquanto a água estava em repouso, o comportamento dos girinos foi similar aos demais tratamentos, com 73% dos girinos parados e, quando houve movimentação da água, apenas 51% dos girinos nadaram de forma normal, sendo estes resultados mais próximos dos resultados encontrados na C1, C2 e C3. Durante o período de recuperação os resultados não apontaram grandes alterações, sendo que 75% dos girinos permaneceram parados enquanto a água estava em repouso e 58% dos girinos nadando de forma normal.

Tabela 4: Tipos de comportamento natatório dos girinos de rã-touro expostos no resíduo de suinocultura e durante a recuperação em água limpa.

Tratamento	Período	Parâmetros do teste	Exposição		Recuperação	
			Água em repouso	Água em movimento	Água em repouso	Água em movimento
C1	Manhã	0	94%	3%	90%	6%
		1	0%	27%	0%	12%
		2	3%	9%	0%	12%
		3	3%	61%	10%	70%
		0	100%	10%	100%	0%
	Tarde	1	0%	19%	0%	18%
		2	0%	16%	0%	14%
		3	0%	55%	0%	68%
		0	96%	5%	94%	3%
		Total	1	0%	24%	0%
		2	2%	12%	0%	13%
		3	2%	59%	6%	69%
C2	Manhã	0	93%	5%	85%	0%
		1	0%	21%	0%	22%
		2	0%	5%	6%	11%
		3	7%	69%	9%	67%
		0	100%	8%	91%	4%
	Tarde	1	0%	21%	0%	12%
		2	0%	15%	0%	15%
		3	0%	56%	9%	(69%
		0	96%	7%	87%	2%
		Total	1	0%	20%	0%
		2	0%	10%	4%	13%
		3	4%	63%	9%	68%
C3	Manhã	0	80%	11%	78%	0%
		1	0%	11%	0%	13%
		2	3%	2%	0%	13%

		3	17%	76%	22%	74%
		0	88%	10%	85%	0%
	Tarde	1	0%	14%	0%	31%
		2	4%	4%	0%	4%
		3	8%	72%	15%	65%
	Total	0	83%	10%	81%	0%
		1	0%	12%	0%	21%
		2	3%	4%	0%	9%
		3	14%	74%	19%	70%
	Manhã	0	69%	15%	76%	5%
		1	0%	15%	0%	24%
		2	2%	7%	0%	5%
		3	29%	63%	24%	66%
CP	Tarde	0	81%	19%	74%	3%
		1	0%	16%	0%	32%
		2	0%	26%	0%	16%
		3	19%	39%	26%	49%
	Total	0	73%	17%	75%	4%
		1	0%	15%	0%	27%
		2	2%	17%	0%	11%
		3	25%	51%	25%	58%
CN	Manhã	0	69%	12%	93%	3%
		1	0%	9%	0%	30%
		2	0%	0%	0%	0%
		3	31%	79%	7%	67%
	Tarde	0	78%	4%	91%	0%
		1	0%	15%	0%	27%
		2	0%	0%	0%	0%
		3	22%	81%	9%	73%
	Total	0	73%	8%	92%	2%
		1	0%	12%	0%	29%
		2	0%	0%	0%	0%
		3	27%	80%	8%	69%

4.3.3 Teste de comportamento natatório em girinos de rã-quatro olhos (*Physalaemus nattereri*)

Os resultados do teste de comportamento natatório dos girinos de rã-quatro olhos (Tabela 5) apontaram que para a C1 enquanto a água estava parada todos os girinos estavam em repouso (100%) e quando a água foi movimentada com o bastão a maioria dos girinos apresentaram movimentos lentos (41%) e movimento somente após o toque (33%). Já os girinos da C1 que ficaram de recuperação enquanto a água estava parada todos ficaram parados e quando houve movimentação na água a maioria se comportou de forma normal (57%), mostrando uma melhoria em relação a exposição.

A maioria dos girinos de exposição da C2 ficaram em repouso (98%) enquanto a água estava parada. Já quando houve movimentação na água, parte deles apresentou

comportamento natatório somente quando tocados (39%) e parte deles estavam lentos (37%). Já os girinos que ficaram em recuperação, permaneceram parados (100%) quando a água estava em repouso e apenas uma parte nadaram de forma normal (34%) e uma outra parte de forma lenta (26%) após movimentação na água, apresentando uma melhoria no nado de forma normal (de 24% para 34%).

Na C3 quase todos os girinos em exposição estavam em repouso (98%) enquanto a água estava parada e, quando a água foi movimentada, mais da metade deles nadaram de forma normal (53%). Todos os girinos da C3 que ficaram em recuperação ficaram em repouso (100%) quando a água estava parada e quando houve movimentação na água, mais da metade dos girinos (61%) nadou de forma normal.

Durante a exposição, no CN enquanto a água estava em repouso todos os girinos (100%) estavam imóveis e, após a movimentação da água, a maioria dos girinos (76%) se moveram de forma normal. Esses resultados praticamente se repetiram durante a fase de recuperação, de forma que enquanto a água estava em repouso todos os girinos (100%) estavam imóveis, e quando houve movimentação da água, todos (100%) nadaram de forma normal. Já no CP durante a fase de exposição enquanto a água estava parada, todos os girinos (100%) ficaram imóveis, e após a movimentação da água uma porção nadou de forma lenta (38%, e outra de forma normal (34%). Já durante a recuperação do CP, enquanto a água estava estática todos os girinos estavam imóveis (100%) e após mexer a água mais da metade dos girinos (52%) continuaram nadando de forma lenta.

Os resultados do grupo controle, se comparados com os animais expostos ao resíduo, apontam que a C1 e a C2 estão mais semelhantes ao CP pelo comportamento natatório de forma lenta, enquanto apenas o C3 teve resultados similares ao CN com uma movimentação normal.

Tabela 5: Tipos de comportamento natatório dos girinos de rã-quatro olhos expostos no resíduo de suinocultura e durante a recuperação em água limpa.

Tratamento	Período	Parâmetros do teste	Exposição		Recuperação	
			Água em repouso	Água em movimento	Água em repouso	Água em movimento
C1	Manhã	0	100%	2%	100%	0%
		1	0%	29%	0%	20%
		2	0%	40 %	0%	30%
	Tarde	3	0%	29%	0%	50%
		0	100%	3%	100%	0%
		1	0%	38%	0%	15%

		2	0%	41%	0%	19%
		3	0%	18%	0%	66%
		0	100%	2%	100%	0%
	Total	1	0%	33%	0%	18%
		2	0%	41%	0%	25%
		3	0%	24%	0%	57%
		0	96%	0%	100%	0%
	Manhã	1	0%	30%	0%	26%
		2	0%	35%	0%	26%
		3	4%	35%	0%	48%
		0	100%	0%	100%	0%
C2	Tarde	1	0%	49%	0%	22%
		2	0%	40%	0%	41%
		3	0%	11%	0%	37%
		0	98%	0%	100%	20%
	Total	1	0%	39%	0%	20%
		2	0%	37%	0%	26%
		3	2%	24%	0%	34%
		0	96%	0%	100%	4%
	Manhã	1	0%	17%	0%	12%
		2	0%	25%	0%	23%
		3	4%	58%	0%	61%
		0	100%	0%	100%	8%
C3	Tarde	1	0%	30%	0%	15%
		2	0%	26%	0%	18%
		3	0%	44%	0 (0%	59%
		0	98%	0%	100%	5%
	Total	1	0%	22%	0%	13%
		2	0%	25%	0%	21%
		3	2%	53%	0%	61%
		0	100%	0%	100%	0%
	Manhã	1	0%	33%	0%	11%
		2	0%	33%	0%	41%
		3	0%	34%	0%	48%
		0	91%	0%	100%	0%
CP	Tarde	1	0%	22%	0%	15%
		2	0%	46%	0%	63%
		3	9%	32%	0%	22%
		0	96%	0%	100%	0%
	Total	1	0%	28%	0%	13%
		2	0%	38%	0%	52%
		3	4%	34%	0%	35%
		0	100%	24%	100%	0%
	Manhã	1	0%	14%	0%	0%
		2	0%	0%	0%	0%
		3	0%	62%	0%	100%
		0	100%	5%	100%	0%
CN	Tarde	1	0%	0%	0%	0%
		2	0%	0%	0%	0%
		3	0%	95%	0%	100%
		0	100%	16%	100%	0%
	Total	1	0%	8%	0%	0%
		2	0%	0%	0%	0%
		3	0%	76%	0%	100%

4.3.4 Teste de preferência de substrato em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)

Os girinos de rã-touro submetidos ao teste de preferência de substrato (Tabela 6) expostos ao tratamento C1 apontaram que enquanto a água estava em repouso, mais de metade deles (65,4%) preferiam o substrato com fundo claro, e após a movimentação da água estes mesmos girinos preferiram o substrato com fundo escuro (52,9%), já os girinos da C1 que ficaram em recuperação em água limpa preferiram o substrato claro enquanto a água estava em repouso (53,6%) e escuro após o movimento da água (50,9%).

Os girinos da C2 expostos, enquanto a água estava em repouso, preferiram o substrato de fundo preto (54,1%) e após a movimentação da água optaram pelo fundo branco (57,7%). Os girinos da C2 em recuperação preferiram o substrato escuro, tanto enquanto a água estava parada (59,8%) quanto após a movimentação (57,1%). Os girinos da C3 expostos preferiram o fundo escuro (53%) quando a água estava parada e após a movimentação da água (52,5%) e no período de recuperação enquanto a água estava parada preferiram o substrato claro (51,2%) e após a movimentação da água o substrato escuro (59,5%).

No CN, num primeiro momento, houve preferência pelo substrato de fundo preto (55,7%), quando a água estava em repouso. Com a água em movimento, o substrato de fundo branco (51,9%) foi preferido. No segundo momento, os girinos optaram pelo substrato escuro, seja enquanto a água estava em repouso (56,1%) ou após a movimentação (60,4%). Já no CP em todos os momentos os girinos preferiram o substrato escuro.

Ao comparar os resultados obtidos pelo CN e CP com os girinos que ficaram expostos percebe-se que os girinos expostos da C3 são os que possuem um comportamento mais próximo ao CN, enquanto os resultados dos girinos da C1 e C2 foram os que mais destoaram do CN, até mesmo mais que os girinos do CP, visto que os girinos do CP tiveram resultados similares aos do CN.

4.3.5 Teste de preferência de substrato em girinos de rã-quatro olhos (*Physalaemus nattereri*)

Os girinos de rã-quatro olhos submetidos ao teste de preferência de substrato e expostos ao resíduo (Tabela 7) da C1, enquanto a água estava em repouso, preferiram o substrato escuro (50,8%) e, após mexer a água, mais da metade deles se moveram para o fundo claro (60,1%). Já os girinos da C1 que ficaram em recuperação nos dois momentos (água em repouso e após a movimentação) preferiram o fundo escuro.

Os girinos de exposição da C2 enquanto a água estava em repouso preferiram o fundo escuro (51,5%), mantendo essa preferência após o movimento da água (63,8%). Posteriormente ao período de recuperação, essa preferência pelo fundo escuro se manteve tanto para a água em repouso (62,6%) quanto após o movimento da água (63,5%).

Os girinos da C3, enquanto expostos, preferiram o substrato escuro (50,5%) quando a água estava parada e após a movimentação da água preferiram o fundo branco (60,7%). Durante a recuperação em água limpa, os girinos preferiram o fundo claro quando a água estava parada (53,1%) e após o movimento da água (59,4%).

No controle positivo os girinos expostos preferiram o fundo branco quando a água estava parada (53,6%) e após o movimento da água (59,2%). Durante a recuperação, os girinos preferiram o fundo escuro quando a água estava em repouso (57,3%) e após o movimento da água (54,2%). Já no controle negativo em primeiro momento preferiram o fundo branco quando a água estava em repouso (51%) e também após a movimentação da água (59,4%). No período de recuperação, os girinos preferiram o fundo escuro quando a água estava parada (56,7%) e o fundo claro após o movimento da água (54,5%).

A partir destes resultados, percebe-se que durante o período de exposição foram poucas as vezes em que os girinos preferiram o substrato de fundo escuro e que, inclusive após a movimentação da água, em nenhum momento os girinos optaram pelo substrato escuro. Até mesmo os girinos do CN, contrariando o esperado, visto que os girinos possuem tonalidade escura. No entanto, no período de recuperação percebe-se a predominância do C1 e C2 pelo fundo escuro e até mesmo do CP, se assemelhando ao CN.

Tabela 6: Porcentagem de preferência entre os substratos de fundo claro e escuro dos girinos de rã-touro submetidos ao teste comportamental de substrato durante os dias de exposição e de recuperação do resíduo de suinocultura.

Tratamento	Período	Exposição				Recuperação			
		Água em repouso		Água após movimentação		Água em repouso		Água após movimentação	
		Fundo Claro	Fundo Escuro	Fundo Claro	Fundo Escuro	Fundo Claro	Fundo Escuro	Fundo Claro	Fundo Escuro
C1	Manhã	80%	20%	47,6%	52,4%	53,1%	46,9%	50%	50%
	Tarde	52,4%	47,6%	46,4%	53,6%	54,2%	45,8%	47,9%	52,1%
	Total	65,4%	34,6%	47,1%	52,9%	53,6%	46,4%	49,1%	50,9%
C2	Manhã	42,1%	58,9%	58,3%	41,6%	42,2%	57,8%	42,2%	57,8%
	Tarde	52,4%	47,6%	57,1%	42,9%	37,5%	62,5%	43,7%	56,3%
	Total	45,9%	54,1%	57,7%	42,3%	40,2%	59,8%	42,9%	57,1%
C3	Manhã	50%	50%	43%	57%	47,9%	52,1%	39,6%	60,4%
	Tarde	43%	57%	51,9%	48,1%	55,5%	44,5%	41,6%	58,4%
	Total	47%	53%	47,5%	52,5%	51,2%	48,8%	40,5%	59,5%
CP	Manhã	47,3%	52,7%	52,4%	47,6%	42,2%	57,8%	50%	50%
	Tarde	51,2%	48,8%	44%	56%	41,6%	58,4%	54,2%	45,8%
	Total	49%	51%	48,2%	51,8%	42%	58%	51,8%	48,2%
CN	Manhã	48,6%	51,4%	60%	40%	48,1%	51,9%	34,6%	65,4%
	Tarde	38,7%	61,3%	43,8%	56,2%	38,5%	61,5%	46,1%	53,9%
	Total	44,3%	55,7%	51,9%	48,1%	43,9%	56,1%	39,6%	60,4%

Tabela 7: Porcentagem de preferência entre os substratos de fundo claro e escuro dos girinos de rã-quatro olhos submetidos ao teste comportamental de substrato durante os dias de exposição e de recuperação do resíduo de suinocultura.

Tratamento	Período	Exposição				Recuperação			
		Água em repouso		Água após movimentação		Água em repouso		Água após movimentação	
		Fundo Claro	Fundo Escuro	Fundo Claro	Fundo Escuro	Fundo Claro	Fundo Escuro	Fundo Claro	Fundo Escuro
C1	Manhã	46,4%	53,6%	62,7%	37,3%	44,4%	55,6%	46,7%	53,3%
	Tarde	53%	47%	56,6%	43,4%	40%	60%	44,4%	55,6%
	Total	49,2%	50,8%	60,1%	39,9%	42,2%	57,8%	45,5%	54,5%
C2	Manhã	47,3%	52,7%	61,6%	38,4%	37,5%	62,5%	33,3%	66,7%
	Tarde	57,1%	42,9%	66,7%	33,3%	31,2%	68,8%	39,6%	60,4%
	Total	51,5%	48,5%	63,8%	36,2%	34,4%	62,6%	36,5%	63,5%
C3	Manhã	39,3%	60,7%	52,7%	47,3%	52,1%	47,9%	64,6%	35,4%
	Tarde	63,1%	36,9%	71,4%	28,6%	54,2%	45,8%	54,2%	45,8%
	Total	49,5%	50,5%	60,7%	39,3%	53,1%	46,9%	59,4%	40,6%
CP	Manhã	48,2%	51,8%	60,7%	39,3%	50%	50%	43,7%	56,3%
	Tarde	60,7%	39,3%	57,1%	42,9%	35,4%	64,6%	47,9%	52,1%
	Total	53,6%	46,4%	59,2%	40,8%	42,8%	57,3%	45,8%	54,2%
CN	Manhã	46,4%	53,6%	56,4%	43,6%	40%	60%	51,1%	48,9%
	Tarde	57,3%	42,7%	63,4%	36,6%	46,7%	53,3%	57,8%	42,2%
	Total	51%	49%	59,4%	40,6%	43,3%	56,7%	54,5%	45,5%

4.3.6 Frequência de micronúcleos e outras anormalidades eritrocitárias em girinos de rã-touro expostos a ARS

Os valores de média e desvio-padrão da frequência de micronúcleos e outras anormalidades eritrocitárias nucleares de girinos de rã-touro expostos a ARS estão mostrados na tabela 8.

O teste de micronúcleos apresentou diferença estatísticas ($H_{(4, N=60)} = 15.94402$; $p = 0.0031$) entre as concentrações do resíduo para o grupo controle (Figura 3). O teste post hoc apontou que houve diferenças entre a C2 e CP ($p=0,0087$), C2 e CN ($p=0,0158$), C3 e CP ($p=0,0126$), e por fim entre a C3 e CN ($p=0,0223$).

O núcleo entalhado também apresentou diferenças significativas ($F_{(4,55)} = 9.8870$, $p=0.00000$) entre as concentrações do resíduo para o grupo controle (Figura 3), sendo as diferenças significativas entre C1 e C3 ($p=0,025054$), C1 e CP ($p=0,000168$), C2 e CP ($p=0,000385$) e CP e CN ($p=0,000227$).

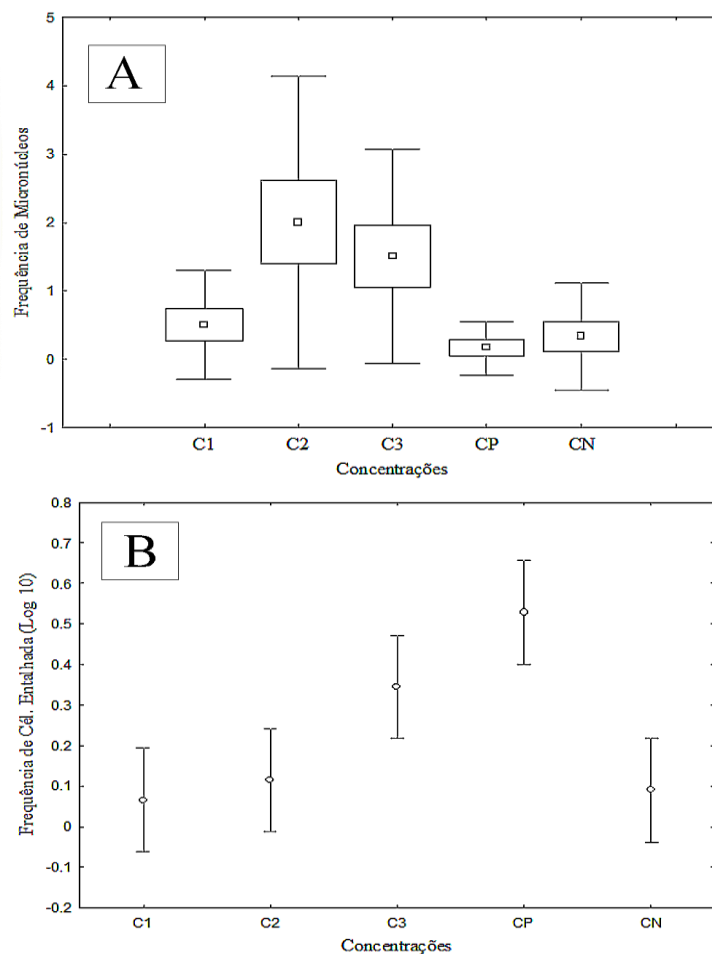


Figura 3: Frequência de micronúcleos (A) e núcleos entalhados (B) em girinos de rã-touro entre os tratamentos, demonstrando os efeitos subletais do composto de ARS.

A frequência de células binucleadas não apresentou diferença significativa ($H_{(4,N=60)}=8.955357$ $p=0.0622$) entre as concentrações e ao grupo controle, assim como os brotos nucleares ($H_{(4,N=60)}=5.538482$ $p=0.2364$), células anucleadas ($F_{(4,55)}=4.0278$, $p=0.80582$), núcleo segmentados ($H_{(4,N=60)}=9.035819$ $p=0.0602$) e núcleo reniforme ($F_{(4,55)}=1.2268$, $p=0.31014$) e a soma do total das anormalidades ($F_{(4,55)}=2.2674$, $p=0.07355$).

Tabela 8: Valores de média e desvio-padrão da frequência de MN e ANEs em eritrócitos de girinos de rã-touro expostos ao resíduo de suinocultura.

MN e ANEs	Tratamentos				
	C1 (n=12)	C2 (n=12)	C3 (n=12)	CP (n=12)	CN (n=12)
Micronúcleo	0,5±0,79	2±2,13	1,5±1,56;	0,16±0,38	0,33±0,77
Célula binucleada	0,25±0,45	0±0	0,08±0,28	0 ± 0	0 ± 0
Célula anucleada	1,16±1,26	1,6±1,82	1,16±0,93	0,83±0,71	1,08±0,99
Núcleo Entalhado	0,25±0,62	0,41±0,66	1,5±1,16	3,3±3,33	0,33±0,65
Broto Nuclear	0,41±0,66	0,58±0,79	0,58±0,99	0,25±0,62	0,16±0,38
Núcleo segmentado	0 ± 0	0 ± 0	0,33±0,65	0,07±0,27	0 ± 0
Núcleo reniforme	0,5±1	1,3±1,6	0,58±0,90	0,83±0,83	0,5±0,90
Total de ANEs	2,83±1,64	4,08±2,77	4,25±2,17	5,3±4,22	2,08±1,50

Valores de média±SD (desvio-padrão)

4.3.7 Frequência de micronúcleos e outras anormalidades eritrocitárias em girinos de rã-touro submetidos ao período de recuperação

Os valores de média e desvio-padrão da frequência de micronúcleos e outras anormalidades eritrocitárias nucleares de girinos de rã-touro que ficaram em recuperação em água limpa estão presentes na tabela 9.

Após o período de recuperação dos girinos em água limpa, os testes estatísticos apontaram significância para as frequências de núcleo entalhado, células anucleadas e para a soma das anormalidades (exceto micronúcleos) considerando $p<0,05$ (Figura 4). Para frequência de micronúcleos e as outras anormalidades eritrocitárias não foram encontradas diferenças significativas.

A frequência de núcleo entalhado foi significativa ($F_{(4,54)}=4,8709$, $p=0,00199$), e o teste post hoc mostrou que as diferenças foram entre a C2 e CN ($p=0,006051$) e a C2 e CP ($p=0,006051$). A frequência de células anucleadas também se mostrou significativa ($F_{(4,54)}=2,9472$, $p=0,02824$) e a diferença significativa foi entre a C2 e o CN ($p=0,016952$). Por fim, a frequência total de ANEs foi significativa ($F_{(4, 54)}=6,6964$, $p=0,00019$), com diferenças entre a C2 e CP ($p=0,003262$) e C2 e CN ($p=0,000237$).

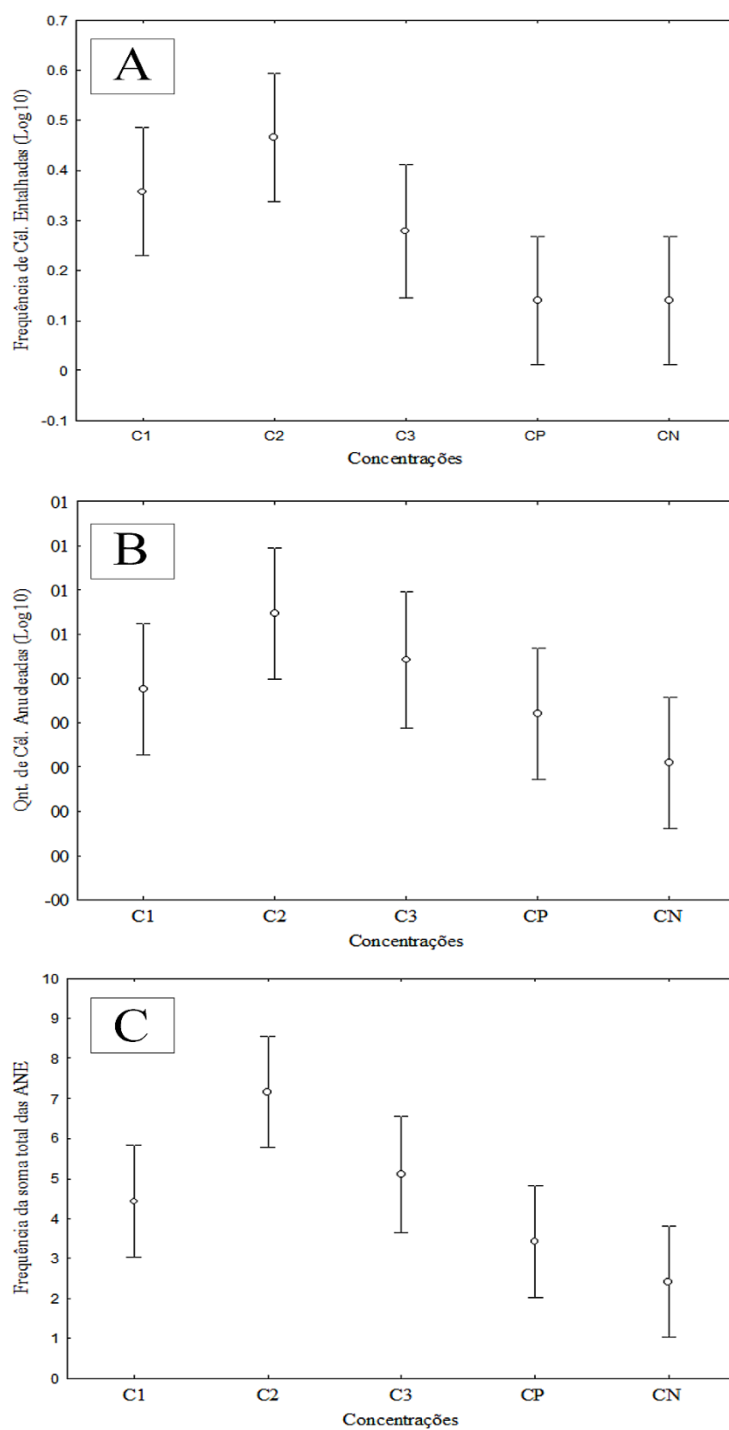


Figura 4: Frequência de núcleos entalhados (A), células anucleadas (B) e a soma de ANEs (C) em girinos de rã-touro entre os tratamentos em que os girinos ficaram em período de recuperação.

A frequência de micronúcleos não foi significativa ($H_{(4, N=59)} = 7.4664$, $p=0.1132$), assim como a frequência de células binucleadas ($H_{(4, N=59)} = 2.661713$, $p = 0,6159$), brotos nucleares ($F_{(4, 54)} = 0,42303$, $p=0,79133$), núcleo segmentado ($F_{(4, 54)} = 0,44003$, $p=0,77911$) e núcleo reniforme ($F_{(4, 54)} = 0,21277$, $p=0,93024$).

Tabela 9: Valores de média e desvio-padrão da frequência de MN e ANEs em girinos de rã-touro que ficaram de recuperação em água limpa após serem expostos ao resíduo de suinocultura.

MN e ANEs	Tratamentos				
	C1 (n=12)	C2 (n=12)	C3 (n=11)	CP (n=12)	CN (n=12)
Micronúcleo	0,25±0,62	0,08±0,28	0,27±0,46	1±1,41	0±0
Célula binucleada	0,16±0,38	0,16±0,38	0,18±0,40	0,08±0,28	0±0
Célula anucleada	1,75±1,48	3,25±2,73	2,27±1,79	1,33±1,07	0,83±0,93
Núcleo Entalhado	1,5±1,08	2,5±2,15	1,18±1,16	0,5±0,67	0,5±0,67
Broto Nuclear	0,25±0,62	0,25±0,62	0,45±0,52	0,58±0,28	0,41±0,51
Núcleo segmentado	0,16±0,38	0,25±0,45	0,18±0,40	0,08±0,28	0±0
Núcleo reniforme	0,58±0,66	0,75±0,86	0,81±0,75	0,83±1,40	0,58±0,66
Total de ANEs	4,41±2,02	7,16±3,12	5,09±2,91	3,41±2,10	2,41±1,56

Valores de média±SD (desvio-padrão)

4.3.8 Recuperação dos girinos de rã-touro (comparação entre as frequências dos danos nucleares)

A comparação das frequências de micronúcleos e outras anormalidades eritrocitárias nucleares em girinos expostos ao resíduo de suinocultura (ARS) e após o período de recuperação apontou que para C1, a frequência de micronúcleo não foi significativa ($p=0.401036$; $t=-0.856349$), ou seja, não apresentou maiores danos durante o período de recuperação, mas também não apresentou recuperação. O mesmo resultado foi obtido para células binucleadas ($p= 0.633323$; $t= -0.483779$), brotos nucleares ($p= 0.166606$; $t = -1.43056$), células anucleadas ($p=0.311836$; $t= 1.035167$), núcleo segmentado ($p =0.488423$; $u = 60.00000$) e núcleo reniforme ($p= 0.812566$; $t= 0.239983$).

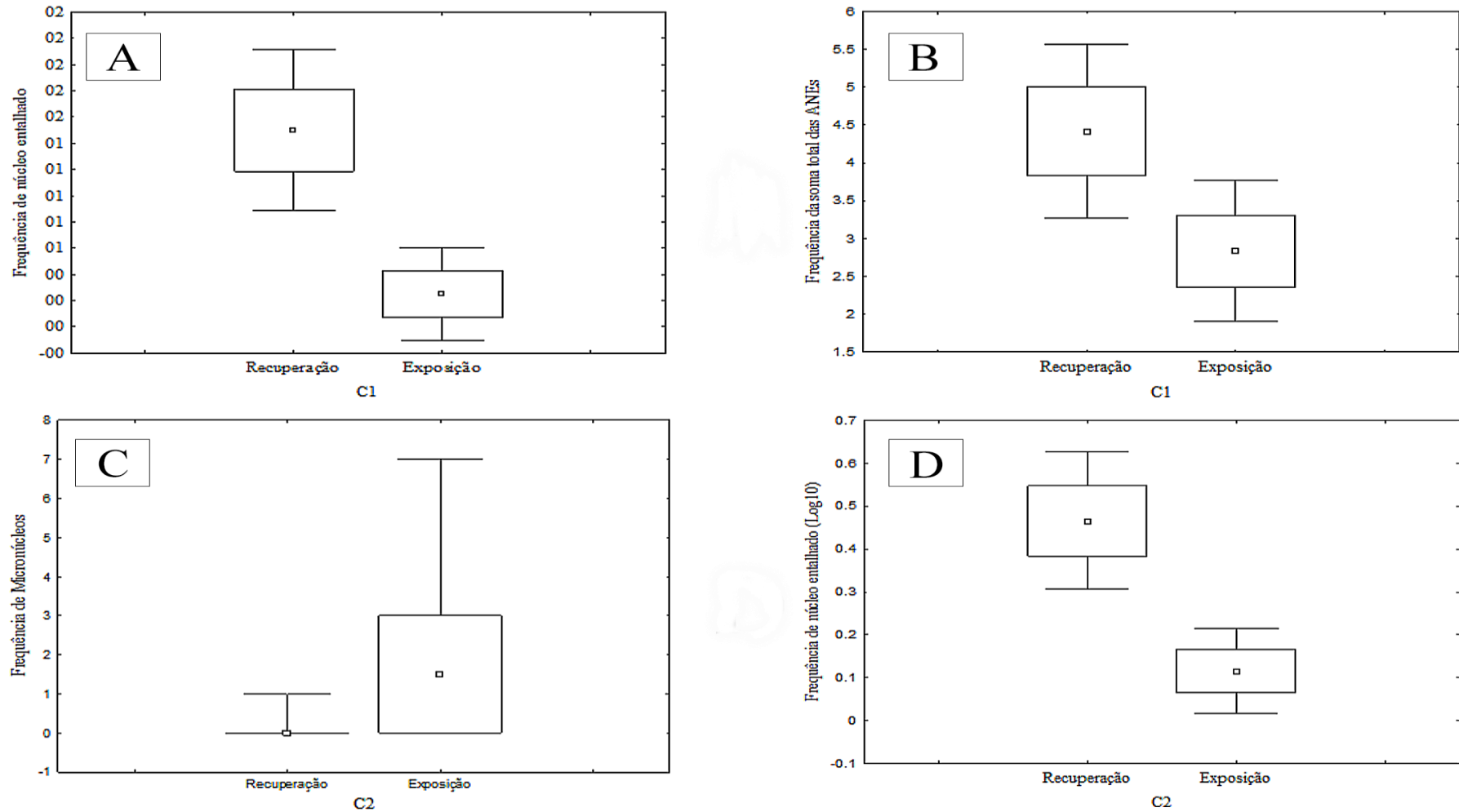


Figura 5: Comparação entre a frequência de núcleo entalhado na C1 (A), da soma de ANEs na C1 (B), de micronúcleos na C2 (C) e de núcleo entalhado na C2 (D) de girinos de rã-touro que foram expostos a ARS com os girinos que foram submetidos ao período de recuperação.

No entanto, a frequência de núcleo entalhado ($p= 0.002239$; $t=3.457820$; Figura 5) e a soma de ANEs ($p= 0.046805$, $t= 2.106388$; Figura 5) foram significativas. Para estes dois parâmetros, nota-se que não houve recuperação e que a frequência de anormalidades aumentou após o referido período.

Para a C2, a comparação de frequência de micronúcleos da exposição com a recuperação mostrou-se significativa ($p=0,009375$; $u=27,00000$;) apontando que houve recuperação (Figura 5). No entanto, a frequência de núcleo entalhado ($p= 0.001421$, $t= 3.646942$; Figura 5) e o total de ANEs ($p= 0.018145$, $t= 2.552690$; Figura 6) que também foram significativos, não foi observada recuperação, e sim mais danos nos indivíduos após o período de recuperação.

Para C3, o micronúcleo apresentou diferença significativas entre as comparações ($p= 0.012789$, $t= -2.73398$; Figura 6), mostrando que houve recuperação. Para células binucleadas ($P=0.556804$ $t=0.597614$), brotos nucleares ($P=0.606431$ $t=-0.523424$), células anucleadas ($P=0.181285$ $t=1.385077$), núcleo entalhado ($P=0.362606$ $t=-0.931695$), núcleo segmentado ($P=0.452062$ $t=-0.766965$), núcleo reniforme ($P=0.618134$ $t=0.506370$) e para o total de ANEs ($P=0.615369$ $t= 0.510384$), os testes não apresentaram significância.

Para o CN não houve significância estatística para MN ($P=0.488423$ $U= 60.00000$) e nem para as outras ANE, com os resultados dos testes para brotos nucleares ($P=0.193398$ $t=1.341641$), células anucleadas ($P=0.533198$ $t=-0.633095$), núcleo entalhado ($P=0.544293$ $T= 0.615882$), núcleo segmentado ($P= 0.729035$ $U=66.00000$), núcleo reniforme ($P=0.799835$ $T=0.256648$), soma de ANEs ($P=0.600100$ $t=0.531938$) e células binucleadas não apresentaram frequência.

Por fim, a comparação entre as frequências do controle positivo apontou que houve recuperação para núcleo entalhado ($p= 0.001571$, $t= -3.60542$; Figura 6), enquanto micronúcleo ($p=0.061792$ $t=1.968055$), células binucleadas ($p=0.729035$ $u=66.00000$), brotos nucleares ($p=0.414120$ $t=0.832414$), células anucleadas ($p=0.193398$ $t=1.341641$), núcleo segmentado ($p=1.000000$ $t=-0.000000$), núcleo reniforme ($p=1.000000$ $t=0.00$) e a soma de ANEs ($p=0.173930$ $t=-1.40519$) não foram significativos.

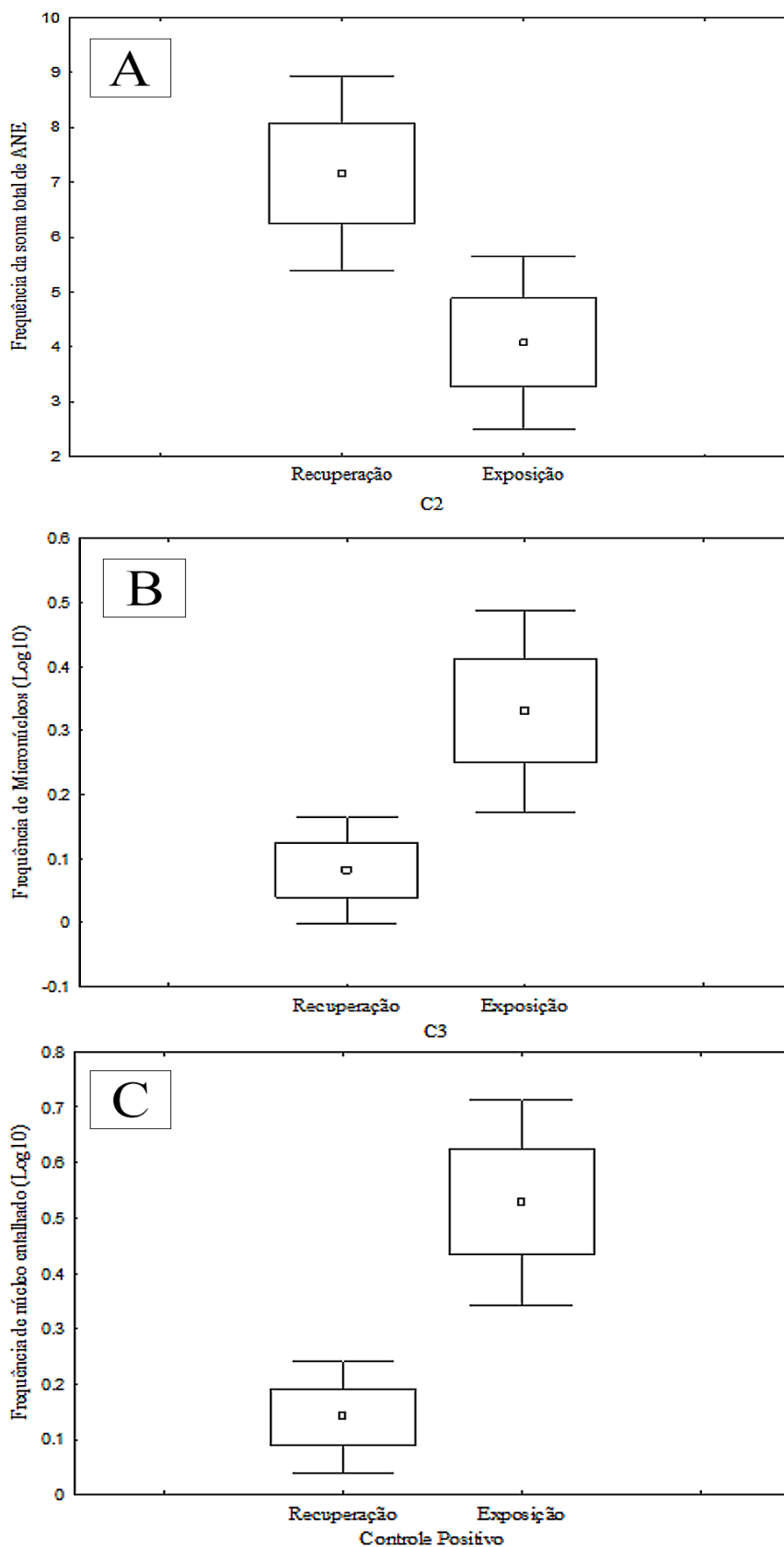


Figura 6: Comparação entre a frequência da soma das ANEs na C2(A), de micronúcleos na C3 (B) e de núcleo entalhado do CP (C) de girinos de rã-touro que foram expostos a ARS com os girinos que foram submetidos ao período de recuperação.

4.3.9 Frequência de micronúcleos e outras anormalidades eritrocitárias em girinos de rã-quatro olhos expostos a ARS

A exposição dos girinos de rã-quatro olhos as concentrações da ARS mostraram que houve diferenças significativas para núcleo entalhado e para o total das ANEs (exceto micronúcleo), considerando $p < 0,05$ (Figura 7).

Os valores de média e desvio-padrão da frequência de micronúcleos e outras anormalidades eritrocitárias nucleares de girinos de rã-quatro olhos expostos ao resíduo estão presentes na tabela 10.

Tabela 10. Valores de média e desvio-padrão de MN e ANEs em eritrócitos de girinos de rã-quatro olhos expostos ao resíduo de suinocultura.

MN e ANEs	Tratamentos				
	C1 (n=12)	C2 (n=12)	C3 (n=12)	CP (n=12)	CN (n=10)
Micronúcleo	0±0	0,08±0,28	0,5±0,79	0,25±0,45	0,1±0,31
Célula binucleada	0,25±0,45	0,5±0,67	1±1,04	0,58±0,68	0,5±0,97
Célula anucleada	0,5±0,90	1,42±1,50	1,33±1,66	1,83±1,74	0,9±1,28
Núcleo Entalhado	0,45±0,47	1,08±1,44	2,66±1,92	3,58±5,19	0,6±1,26
Broto Nuclear	0,41±0,66	0,58±0,79	0,25±0,45	1,16±1,64	0 ± 0
Núcleo segmentado	0,16±0,38	0,16±0,38	0,08±0,28	0,08±0,28	0 ± 0
Núcleo reniforme	1±0,95	1,66±3,33	0,91±1,08	2,16±1,89	0,7±0,82
Total de ANEs	2,83±1,74	5,41±6,09	6,25±3,01	9,41±6,93	2,7±2,11

Valores de média±SD (desvio-padrão)

A presença de núcleo entalhado ($H_{(4, N=58)} = 12,43982$ $p = 0,0144$), que foi significativa, apontou que houve diferença significativa de C3 para C1 ($p = 0,0078$) e C3 para CN ($p = 0,0063$). A soma de ANEs também se mostrou significativa ($F_{(4,53)} = 4,2213$, $p = 0,00486$), no entanto o teste de Tuckey apontou que as diferenças foram entre o CP e a C1 ($p = 0,007752$) e CP e CN ($p = 0,010190$).

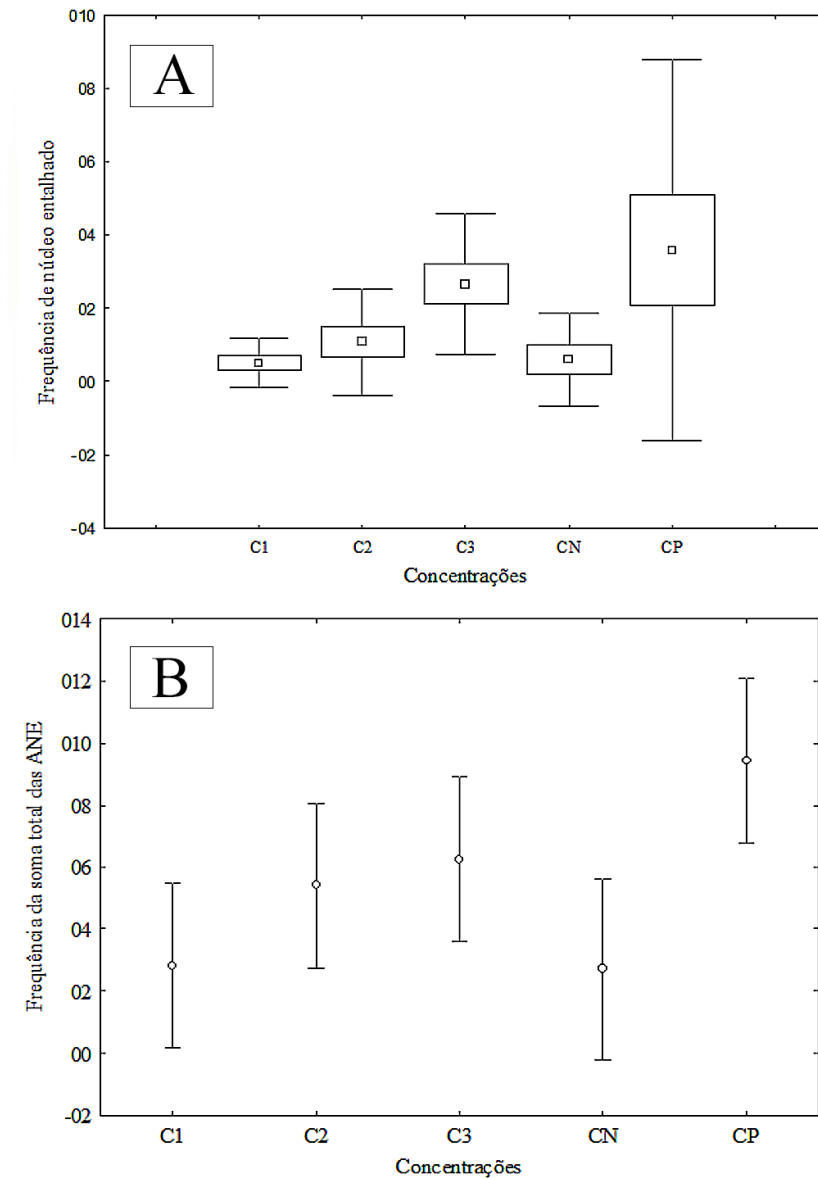


Figura 7: Frequência de núcleos entalhados (A) e total de ANEs (B) em girinos de rã-quatro olhos entre os tratamentos, demonstrando os efeitos subletais do composto de resíduo de suinocultura.

Para a espécie nativa que foi exposta ao resíduo de suinocultura, não foi identificada diferença significativa para a frequência de micronúcleos ($H_{(4, N=58)} = 6,894966$ $p = 0,1415$), bem como para células binucleadas ($F_{(4,53)} = 1,4430$, $p = 0,23277$), BUD's ($H_{(4, N=58)} = 8,1901$ $p = 0,0849$), células anucleadas ($F_{(4,53)} = 1,4482$, $p = 0,23112$), núcleo segmentado ($H_{(4, N=58)} = 2,253205$ $p = 0,6893$) e núcleo reniforme ($F_{(4,53)} = 1,1816$, $p = 0,32955$).

4.3.10 Frequência de micronúcleos e outras anormalidades eritrocitárias em girinos de rã-quatro olhos que ficaram em período de recuperação

Após o período de recuperação dos girinos em água limpa, os testes estatísticos não apontaram que houve danos nucleares significativos considerando $p < 0,05$. Portanto, micronúcleo ($F_{(3,42)}=0,53346$, $p=0,66186$), células binucleadas ($H_{(3,N=46)}=4,166063$, $p=0,2441$), células anucleada ($F_{(3,42)}=1,9173$, $p=,14144$), BUDs ($H_{(3,N=46)}=3,546512$ $p=0,3148$), núcleo entalhado ($F_{(3,42)}=,19195$, $p=0,90130$), núcleo segmentado ($H_{(3,N=46)}=1,875000$ $p=0,5988$), núcleo reniforme ($F_{(3,42)}=0,39053$, $p=,76042$) e a soma de ANEs ($F_{(3,42)}=0,93588$, $p=0,43186$) não foram estatisticamente significativos.

Os valores de média e desvio-padrão da frequência de micronúcleos e outras ANEs de girinos de rã-quatro olhos que ficaram em recuperação em água limpa estão apresentados na tabela 11.

É importante ressaltar que as lâminas sanguíneas do controle negativo e positivo não coraram, mesmo após várias tentativas de coloração. Portanto para efeito de comparação destes resultados, foram utilizados os dados dos girinos do controle negativo de exposição. Não foi utilizado nenhum dado de controle positivo, apenas do CN, C1, C2 e C3.

Tabela 11: Valores de média e desvio-padrão de MN e ANEs em eritrócitos de girinos de rã-quatro olhos que ficaram de recuperação em água limpa após serem expostos ao resíduo de suinocultura.

MN e ANEs	Tratamentos			
	C1 (n=12)	C2 (n=12)	C3 (n=12)	CN (n=10)
Micronúcleo	0,33±0,49	0,16±0,57	0,16±0,38	0,1±0,31
Célula binucleada	0,16±0,38	0,5±0,52	0,16±0,38	0,5±0,97
Célula anucleada	0,5±0,79	1,75±1,71	1,16±1,26	0,9±1,28
Núcleo Entalhado	0,91±0,99	0,83±1,11	0,75±0,62	0,6±1,26
Broto Nuclear	0,08±0,28	0±0	0,16±0,38	0±0
Núcleo segmentado	0,08±0,28	0,08±0,28	0±0	0±0
Núcleo reniforme	0,75±0,86	0,66±0,65	1±0,95	0,7±0,82
Total de ANEs	2,5±1,56	3,83±2,58	3,25±2,09	2,7±2,11

Valores de média±SD (desvio-padrão)

4.3.11 Recuperação dos girinos de rã-quatro olhos (comparação entre a frequência dos danos nucleares)

A comparação das frequências de micronúcleos e outras ANEs após tratamentos em ARS e período de recuperação, apontou que para a C1, a frequência de micronúcleo ($p=0.165858$, $u=48.00000$), célula binucleada ($p= 0.633323$, $t=-0.483779$), BUD

($p=0.285477$, $u=53.50000$), célula anucleada ($p=1.000000$, $t=0.000000$), núcleo entalhado ($p=0.242936$, $t=1.199913$), núcleo segmentado ($p=0.557466$, $t=-0.595683$), núcleo reniforme ($p=0.508361$, $t=-0.672350$) e a soma de ANEs ($p=0.627809$, $t=-0.491689$) não foram significativos.

Para C2, os testes também não apontaram nenhum $p < 0,05$, sendo a frequência de micronúcleo ($p=0.659093$ $t=0.447214$), célula binucleada ($p=1.000000$ $t=-0.000000$), BUD ($p=0.083265$ $u=42.00000$), célula anucleada ($p=0.617532$ $t=0.506517$), núcleo entalhado ($p=0.639552$ $t=-0.474882$), núcleo segmentado ($p=0.557466$ $t=-0.595683$), núcleo reniforme ($p=0.319669$ $t=-1.01816$) e o total das ANEs ($p=0.416517$ $t=-0.828082$) não significativos estatisticamente.

No tratamento C3, as frequências de micronúcleo ($p=0.418924$ $u=58.00000$), broto nuclear ($p=0.633323$ $t=-0.483779$), células anucleadas ($p=0.785556$ $t=-0.275431$), núcleo segmentado ($p=0.328183$ $t=-1.00000$) e núcleo reniforme ($p=0.843318$ $t=0.200000$) não foram significativos. No entanto, células binucleadas ($p=0.00278$, $t=-2.589848$), núcleo entalhado ($p=0.008038$, $t=-2.91426$) e a soma de ANEs ($p=0.009782$, $t=-2.82843$) se mostraram significativas e apresentaram recuperação em comparação com os indivíduos que foram expostos ao resíduo de suinocultura (Figura 8).

Para o controle negativo e positivo não houve a contagem de MN e ANEs, pois houve dificuldade em se realizar a coloração das lâminas sanguíneas dos indivíduos que ficaram de recuperação. Portanto, não foi possível realizar as comparações com os indivíduos do CN e CP durante o período de exposição.

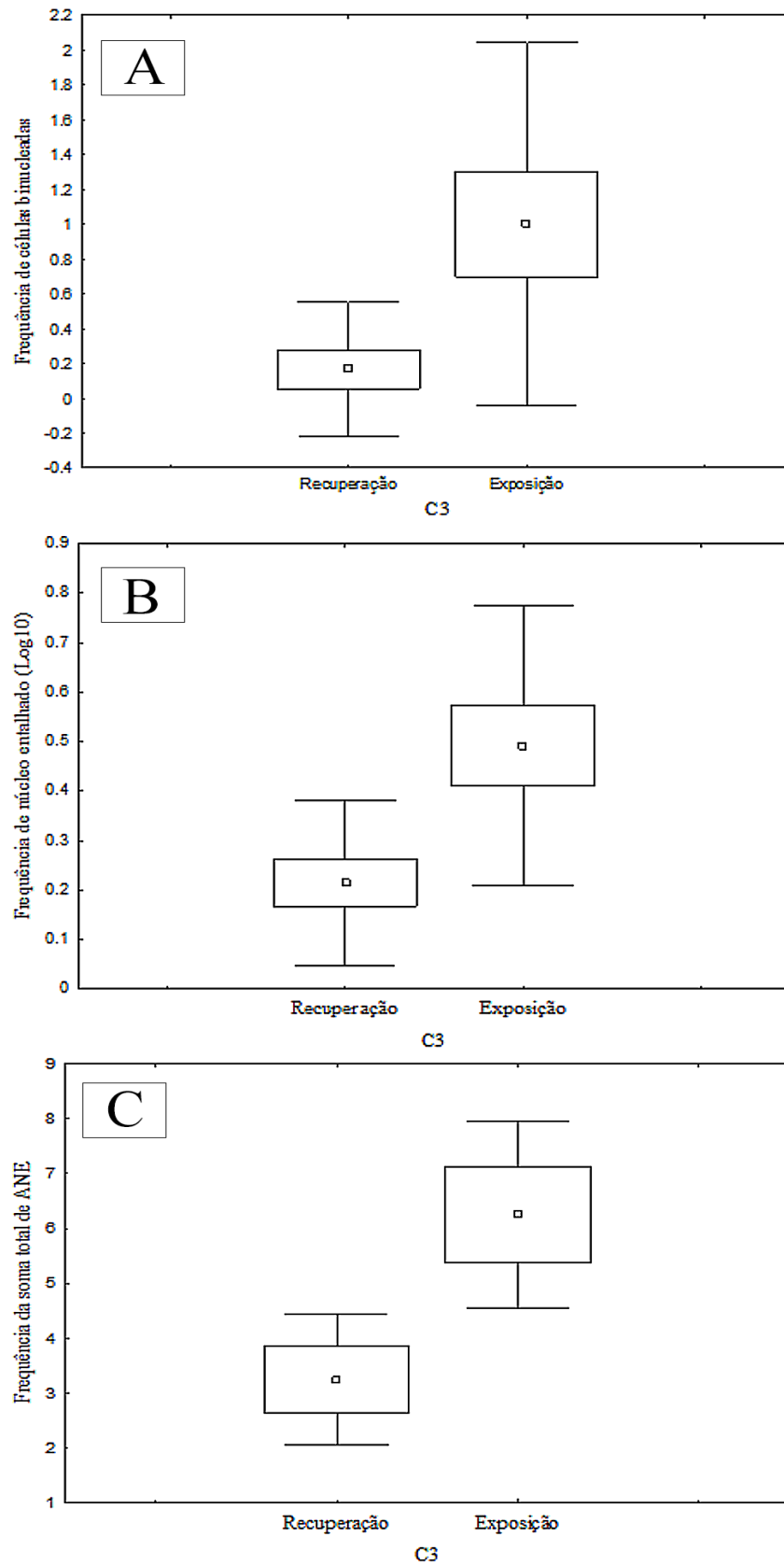


Figura 8: Comparação entre a frequência de células binucleadas (A), núcleo entalhado (B) e o total de ANEs (C) da C3 de girinos de rã-quatro olhos que foram expostos a ARS com os girinos que foram submetidos ao período de recuperação.

4.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pela análise química da ARS apontam concentrações de metais pesados superiores às permitidas pela resolução do CONAMA 397/2008. Cabe ressaltar que o resíduo, no estado em que se encontrava, já estava preparado para a fertirrigação de lavouras das regiões próximas a granja em que o resíduo foi coletado. A presença de metais em grande quantidade, como obtida neste resíduo, pode culminar com o acúmulo de alguns elementos no solo como, por exemplo, o cobre, devido sua baixa mobilidade (OLIVEIRA; MATTIAZZO, 2001). Além disso, para organismos sensíveis, como os anuros, poças artificiais que são formadas pela chuva e que são uma alternativa de reprodução de anfíbios, podem se tornar impróprias para a sua manutenção, caso haja contaminação do solo e da água por esses resíduos.

Além disso, os girinos acumulam metais pesados mais facilmente que os indivíduos adultos, possivelmente devido a sua pele semipermeável e altamente vascularizada, que permite a respiração cutânea e o acúmulo de poluentes ambientais nos tecidos do animal, sejam eles oriundos da água ou do solo. Uma vez que metais podem bioacumular na cadeia alimentar, é importante monitorar a quantidade de metais que entram na dinâmica trófica da cadeia alimentar para prevenir possíveis consequências de atividades antropogênicas dos setores agrícolas e industriais (SINGH; DEY; RAMANUJAN, 2016).

Contudo, deve-se levar em consideração que a dinâmica destes elementos potencialmente tóxicos é extremamente complexa, principalmente a longo prazo (MESSIAS *et al.*, 2007). Um estudo realizado por Ferreira *et al.* (2004) com *Rana catesbeiana* mostrou que girinos expostos a cobre na concentração de 0.2 mg/L podem bioacumular a mesma quantidade de cobre que girinos expostos a uma concentração 6 vezes superior (1.2 mg/L) após 13 dias de experimento. Esses mesmos autores relataram a mortalidade gradativa dos girinos do 5º ao 9º dia de exposição ao cobre, em uma concentração de 2.4 mg/L, que culminou com a morte de 100% dos girinos.

Portanto, aplicações frequentes da ARS no mesmo local, acima da capacidade máxima de retenção de solutos no solo ou acima da absorção máxima das plantas, podem fazer com que os nutrientes do resíduo sejam lixiviados em corpos d'água, tornando-se

um poluente. Portanto, deve-se considerar, nesses casos, a quantidade e a frequência da aplicação do resíduo de acordo com o tipo de solo, composição do resíduo, condições climáticas e a espécie de cultura que está sendo plantada no local (ROSA *et al.*, 2017a), a fim de diminuir a porcentagem do resíduo restante no local visto que até mesmo baixas concentrações podem bioacumular e, conseqüentemente, afetar os girinos e outros organismos não-alvos. Além do mais, o acúmulo de Zn e Cu pode ser prejudicial até mesmo para os agricultores visto que pode reduzir o crescimento e o rendimento das lavouras a longo prazo (ROSA *et al.*, 2017b).

Embora alguns estudos recomendam quantidades do resíduo de suinocultura que são ideais para cumprir a demanda nutricional e incrementar a produção em alguns cultivos agrícolas, como para milho (ROSA *et al.*, 2017b), maracujá (CRUZ *et al.*, 2008) e forrageiras (braquiária e capim-estrela) (OLIVEIRA, 2006), é importante considerar também os seus lixiviados. Portanto, ao considerarmos as doses letal e subletal da ARS neste estudo para girinos e as compararmos com doses que seriam recomendadas para aumentar a produção e atender a demanda nutricional em lavouras como dos trabalhos citados acima, percebe-se que o resíduo poderá ser prejudicial para estes anfíbios, já que a dose letal para girinos deste resíduo foi de apenas pouco mais de 6% da ARS e as concentrações subletais são ainda mais baixas, chegando a menos de 1%.

Assim, deve-se considerar a absorção das plantas destes macros e micronutrientes como um fator chave na fertirrigação da ARS para que não ocorra a acumulação ou lixiviados do resíduo acima da concentração letal encontrada neste trabalho. Para isto, é necessário estudos com diferentes dosagens da ARS em diferentes tipos de culturas, juntamente com a avaliação dos seus lixiviados, para a definição de doses corretas do ARS a serem utilizadas.

Por meio do teste de comportamento natatório, no qual se avaliou a movimentação natatória dos girinos, foi possível constatar que, quando a água era movimentada pelo bastão, os girinos de rã-touro expostos não tiveram um comportamento de modo normal, como esperado e/ou encontrado no controle negativo, apontando alteração na resposta ao movimento da água/bastão que simulava um predador. Em girinos de rã-quatro olhos, os índices de natação alterada foram ainda maiores, já que o que se ocorreu, principalmente nas maiores concentrações da ARS, além de ser observado o comprometimento da motilidade, causou também a movimentação de forma lenta. Um fator que pode ter

afetado o comportamento natatório dos girinos é a temperatura média da água em que os animais estavam (tabelas 2 e 3).

As alterações comportamentais observadas podem ter significados ecológicos já que estes girinos estão menos ativos e, conseqüentemente, mais visíveis aos predadores, aumentando o risco de predação (PEREZ IGLESIAS, 2015). Este tipo de comportamento conhecido como “morte ecológica” pode ocorrer após a exposição a níveis mais baixos de toxicidade, e mesmo que o animal não esteja aparentemente prejudicado pelo agente, seu comportamento pode ter sido alterado e o animal pode não ser capaz de responder a um estímulo normalmente em um contexto ecológico (SCOTT; SLOMAN, 2004). Por isso, o uso de testes comportamentais integrados à toxicologia é importante para compreender os efeitos de agentes xenobióticos, visto que, na maioria das vezes, a contaminação ambiental acontece em concentrações baixas e inferiores às concentrações que são causadoras de morte (PELTZER et.al, 2013).

Ainda sobre o comportamento dos girinos, o teste de preferência de substrato mostrou que os girinos de rã-touro expostos às maiores concentrações de resíduo ARS (C1 e C2) foram os que mais destoaram do controle negativo e preferiram o substrato de fundo claro, até mesmo mais que os girinos do controle positivo, diferente do esperado (preferência pelo o substrato de fundo escuro como meio de camuflagem). Estes resultados são ainda mais visíveis nos experimentos realizados com os girinos de rã-quatro olhos que, na maioria das vezes, preferiram o fundo claro, e que, em nenhum momento (inclusive após o movimento da água) demonstraram a preferência pelo fundo escuro. Esse comportamento mostra que estes girinos estão mais susceptíveis a serem predados, pois possuem cor escura e ficam mais expostos quando em fundo claro. Embora a variação das porcentagens seja pequena, no ambiente natural, se metade dos girinos de uma desova tiverem este tipo de comportamento e forem predados a perda para aquela espécie pode ser grande considerando que há espécies de anfíbios ameaçadas de extinção e a energia gasta com a reprodução, visto que em anuros, principalmente as fêmeas investem em um esforço reprodutivo (MAZZARELLI, 2015)

Alterações comportamentais podem ser induzidas por uma disfunção neurológica provocada pela exposição a substâncias tóxicas (SCOTT; SLOMAN, 2004). Esse efeito pode estar associado a inibição de colinesterases (ChEs) já que a interrupção da função normal do sistema nervoso pode afetar o desempenho locomotor ou a função muscular dos girinos (PAYNE *et al.*1996; PELTZER *et al.*, 2013), pois, quando as ChEs são

inibidas, o excesso de neurotransmissor acetilcolina (ACH) que, normalmente, seria degradado pela enzima acetilcolinesterase (AChE) em colina e ácido acético (BALLESTEROS *et al.*, 2009) se acumula, atuando como um neurotransmissor do músculo no sistema nervoso somático, causando inicialmente hiperatividade e espasmos musculares, seguido de atividade reduzida e paralisia, e então insuficiência respiratória e morte (WALKER *et al.* 2001; PELTZER *et al.*, 2013).

Ao considerar os metais pesados do resíduo como agentes prejudiciais em organismos aquáticos e causadores dessas alterações comportamentais, sabe-se que o cobre reduz os níveis de dopamina/serotonina (DE BOECK *et al.*, 1995) e, aliado a isto, um estudo realizado com girinos de rã-touro expostos a metais pesados (Cu, Cd e Zn) avaliando a atividade de ChEs mostrou que combinações como Cu+Cd (1:1) e Zn+Cu+Cd (1:1:1) em 16 dias inibiram de 36 a 43 vezes mais a atividade da AChE quando comparado com o grupo controle e que também estes metais combinados diminuiram significativamente a atividade de AChE em comparação com os metais aplicados sozinhos e com o tempo de exposição, sendo 16 dias comparados com 2 dias (CARVALHO *et al.*, 2017).

No ambiente natural, deve-se atentar ao risco do resíduo não apenas como o único agente causador de alterações comportamentais visto que também, dependendo do tipo de cultivo, ocorre a utilização de fungicidas, pesticidas, herbicidas e inseticidas que podem potencializar os efeitos prejudiciais e também provocar alterações comportamentais, como já demonstrado por PELTZER *et al.* (2013), que expos girinos de *Hypsiboas Pulchellus* (Anura: Hylidae) ao herbicida glufosinato de amônio. Nesse estudo, foram relatados impactos da exposição ao herbicida no comportamento dos girinos, incluindo prejuízos às atividades natatórias e às atividades das colinesterases.

O teste de micronúcleo e outras ANEs mostrou alterações significativas ($p < 0,05$) nos girinos de rã-touro para frequência de micronúcleo e de núcleo entalhado, enquanto os girinos de rã-quatro olhos apresentaram significância apenas para frequência de núcleo entalhado. Portanto, estes resultados confirmam que o resíduo possui potencial para danos genotóxicos e que o teste de micronúcleo e outras anormalidades são biomarcadores eficientes na detecção do dano deste resíduo. No entanto, neste tipo de resíduo, é difícil mensurar qual componente é o causador do dano toxicológico, devido as suas interações. O nitrogênio amoniacal por exemplo, pode ter sido um dos causadores da toxicidade da

ARS, mas no ambiente natural o nitrogênio apresenta uma dinâmica complexa, traduzida por grande mobilidade no solo e por diversas transformações em reações mediadas por microrganismos, como o processo de nitrificação levando ao nitrito e nitrato, ou desnitrificação levando ao gás nitrogênio (ANDRADE, 2009; VASCONCELOS, 2012), com isto é importante saber a demanda nutricional do tipo de lavoura em que se está utilizando a ARS, já que a toxicidade mediada por este componente pode ser evitada com isto.

A contaminação e poluição ambiental por metais pesados, como os metais encontrados neste resíduo, é conhecida por ser prejudicial a organismos aquáticos devido a sua toxicidade, contribuindo com o declínio de populações de animais afetados (ALI, KHAN; ILAHI, 2019).

Metais pesados como Cu, Fe, Zn e Mn são essenciais para alguns organismos, mas em concentrações baixas. A deficiência ou o excesso destes pode causar doenças ou condições anormais, pois se tornam tóxicos além de certos limites (ALI, KHAN; ILAHI, 2019). Além disso, os metais pesados são cancerígenos, mutagênicos e teratogênicos, sendo considerado perigosos devido, principalmente, a três características: persistência, bioacumulação e toxicidade (ALI, KHAN; ILAHI, 2019).

Uma exposição crônica realizada com girinos de *L. catesbeianus* com minério de ferro, ferro e manganês resultou na acumulação destes metais nos tecidos dos girinos, além de afetá-los morfológicamente, afetou também o desenvolvimento, provocou danos genotóxicos e efeitos bioquímicos associados a uma condição de estresse oxidativo induzido por metal (VERONEZ *et al.*, 2016).

Marcantonio (2005) expôs girinos de rã-touro ao sulfato de cobre e de zinco e verificou através de testes hematológicos e de letalidade que os girinos apresentaram menor tolerância ao cobre associado ao zinco quando comparado com o Cu e Zn separadamente, mesmo com dose sub-letal do Cu+Zn (2mg/L(1:1)) sendo menor que a dose do Cu (2,2mg/L) e do Zn(2,78mg/L) separadamente, indicando um efeito sinérgico aumentando a toxicidade dos elementos e sensibilidade dos organismos.

Os resultados dos testes que mostraram que as alterações significativas foram observadas na C2 e C3 em girinos de rã-touro e na C3 em girinos de rã-quatro olhos, contrariando o esperado, ou seja, que a C1, que é a maior concentração, causasse mais danos. Isso pode ser explicada ao considerar os metais pesados como agentes causadores

de toxicidade, pois a quantidade de fezes encontradas proporcionalmente no fundo das bandejas conforme o nível da concentração mostra que o metabolismo digestivo pode ser considerado um eficiente mecanismo de desintoxicação de metal em organismos aquáticos (FERREIRA *et al.*, 2004).

Além disto, um estudo recente expõe girinos de rã-touro à água do Rio Lujan, na Argentina, que continha concentrações de metais pesados acima do permitido pelas diretrizes da secretária de recursos hídricos, mostrou que os girinos expostos a água que continha a maior concentração de metais pesados não foram os que apresentaram a frequência de micronúcleo significativa quando comparada com o CN, e sim os girinos que foram expostos as concentrações menores (OSSANA; SALIBIAN, 2013). Os autores atribuíram isto a dureza da água que, na concentração maior na qual a dureza da água foi mais alta, diminuiu a toxicidade dos metais, porque a toxicidade dos metais está inversamente relacionada com a dureza da água (OSSANA; SALIBIAN, 2013). Isto se deve ao fato de os metais serem complexados com carbonatos de cálcio e magnésio tornando-se muito menos disponível para absorção no organismo dos girinos (ALABASTER, LLOYD, 1980). Portanto, supõe-se que os carbonatos de cálcio e magnésio agem como um agente quelante na complexação (reação que envolve um íon metálico e um agente ligante), aumentando a eliminação pelo organismo e diminuindo a absorção por impedir a ligação dos metais a moléculas alvos, ou seja, diminuindo a toxicidade (APOSHIAN *et al.* 1995).

Para o presente estudo, não foi avaliado a dureza da água. Portanto, apenas supõe-se que a dureza da água possa ter influenciado na baixa toxicidade da ARS nas concentrações maiores. Cabe ressaltar que um dos efeitos provocados pelos agentes quelantes é a excreção como forma de eliminação dos metais pelo organismo (APOSHIAN *et al.* 1995) e isso pode estar relacionado com os indivíduos expostos a C1 e C2 em que foi observado aumento na quantidade de fezes.

Outro bioensaio, utilizando girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos a duas concentrações de sulfato de cobre, apontou significância estatística ($p < 0,05$) para alteração na frequência de MN na concentração maior (0.4mg/L) nas primeiras 24 horas quando comparado ao CN. No entanto, após 48 horas de exposição, a concentração menor (0.2mg/L) foi a que causou a maior frequência de MN (ROCHA, 2011). OSSANA *et al.*, (2010) que também expuseram girinos de *L. catesbeianus* a duas concentrações (2mg/L e 3mg/L) de cobre por 96 horas descobriram que a frequência de MN foi

significativamente maior estatisticamente ($p < 0,05$) na concentração menor quando comparado com o CN.

Ambos os autores não explicam o motivo da frequência de MN ser maior em concentrações menores. Portanto, embora essa genotoxicidade do cobre seja comum em doses mais baixas, ainda não se tem uma explicação assertiva sobre o possível fator que provoca estes resultados em girinos.

Analisando-se os resultados dos experimentos com girinos que ficaram em recuperação, foi possível verificar que os girinos de rã-touro ainda continham danos significativos quando comparados com o CN para núcleo entalhado, células anucleadas e para soma das anormalidades, todos estes considerando a C2. Estes resultados mostram que o período de recuperação para os girinos de rã-touro pode não ter sido suficiente para recuperá-los dos danos citogenéticos provocados pelo resíduo. Isso ocorre principalmente ao se analisar os resultados da recuperação comparados com os girinos expostos ao resíduo, mostrando que para C1 e C2, a frequência do dano para núcleo entalhado e para o total de ANEs foi maior na recuperação do que na exposição. No entanto, para micronúcleo na C2 e C3 houve recuperação. Portanto, esses resultados demonstram a importância da utilização de mais de um biomarcador para a avaliação de um poluente ambiental, pois, em ambiente naturais, os contaminantes estão presentes, geralmente, como misturas complexas e não existe um único biomarcador que possa fornecer um diagnóstico completo. Portanto, o uso de um conjunto de biomarcadores pode ser útil para avaliar as várias respostas de um organismo sob o estresse de uma mistura de poluentes (OSSANA, CASTAÑÉ; SALIBIÁN, 2013).

Os girinos de rã-quatro olhos que ficaram em recuperação não apresentaram nenhum dano significativo. Já a comparação dos girinos expostos com os de recuperação apontou que na C3 houve recuperação para células binucleadas, núcleos entalhados e para a soma das anormalidades. Estes resultados mostram que o que os girinos de *P. nattereri* são organismos que embora tenham sofrido danos citogenéticos como efeito do resíduo, reafirmando a toxicidade já visto em girinos de rã-touro, são organismo mais resistentes que os de rã-touro para este resíduo. Este efeito pode ter ocorrido pelo fato de que os girinos de *P. nattereri* terem sido retirados de uma desova no meio natural, diferente da rã-touro que foi criada em cativeiro. Portanto, a rã-quatro olhos por ser uma espécie generalista e já ocupar ambiente antropizados se reproduzindo em poças que

possivelmente podem estar contaminadas, seja de ARS ou de outros compostos, possui maior resistência a contaminação da ARS.

4.5 CONCLUSÃO

O resíduo de suinocultura foi capaz de provocar danos citogenotóxicos em girinos de *L. catesbeianus* e de *P. nattereri*, sendo que os girinos de rã-touro mostraram-se ser organismos mais sensíveis ao resíduo que os girinos de rã-quatro olhos e as 96 horas de período para reversão dos danos não foram suficientes para recuperá-los de todos os danos provocados pelo resíduo.

Ainda são necessários estudos que avaliem os efeitos do resíduo de suinocultura no crescimento e desenvolvimento, além de anormalidades morfológicas e alterações fisiológicas nos girinos para um diagnóstico de toxicidade mais eficaz e ser possível definir o efeito de dose-dependência do resíduo. Também é necessário que haja um teste de toxicidade crônico para avaliar os efeitos do resíduo a longo prazo. No entanto, de imediato, este trabalho se mostrou capaz de avaliar o potencial de dano citogenotóxico do resíduo de suinocultura em girinos de duas espécies a curto prazo e mostrar o risco que o uso sem controle deste resíduo pode provocar a organismos importantes como os anfíbios.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALABASTER J. S.; LLOYD, R. Application of additive index to laboratory studies. In: **Water quality criteria for freshwater fish**. London: Butterworks; 1980. Cap.2, p.12-46.

ALI, H.; KHAN, E.; ILAHI, I. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. **Journal of Chemistry**, v. 2019, p. 1–14. 2019

ANDRADE, T. V. **Avaliação da toxicidade de água produzida tratada por processo evaporativo com a finalidade de reúso em solo**. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

AMARAL, D. F.; GUERRA, V.; MOTTA, A. G. C.; SILVA, D. M.; ROCHA, T. L. Ecotoxicity of nanomaterials in amphibians: a critical review. **Science of the Total Environment**, v. 686, p. 332-344, 2019.

APOSHIAN, H. V.; MAIORINO, R. M.; GONZALEZ-RAMIREZ, D.; ZUNIGA-CHARLES, M.; XU, Z.; HURLBUT, K. M.; JUNCO-MUNOZ, P.; DART, R.C. APOSHIAN, M. M. Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents. **Toxicology**, v. 97, n. 1-3, p. 23–38, 1995.

BABINI, M. S.; BIONDA, C. de L.; SALAS, N. E.; MARTINO, A. L. Health status of tadpoles and metamorphs of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) that inhabit agroecosystems and its implications for land use. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 118, p. 118–125, 2015.

BALLESTEROS, M. L.; DURANDO, P. E.; NORES, M. L.; DÍAZ, M. P.; BISTONI, M. A.; WUNDERLIN, D. A. Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). **Environmental Pollution**, v. 157, n. 5, p. 1573–1580, 2009.

BENVINDO-SOUZA, M.; OLIVEIRA, E. A. S.; ASSIS, R. A.; SANTOS, C. G. A.; BORGES, R. E.; SILVA, D.M.; SANTOS, L. R. S. Micronucleus test in tadpole erythrocytes: trends in studies and new paths. **Chemosphere**, v.240, 10.1016/j.chemosphere .2019.124910., 2019

DE BOECK, G.; NILSSON, G. E.; ELOFSSON, U.; VLAEMINCK, A.; BLUST, R. Brain monoamine levels and energy status in common carp (*Cyprinus carpio*) after exposure to sublethal levels of copper. **Aquatic Toxicology**, v. 33, n.3-4, p. 265–277, 1995.

BRASIL, **Resolução CONAMA n°397**, de 3 de abril de 2008. Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Publicado no D.O.U. n°66 de 7 abril 2008.

CABAGNA, M. C; LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P. M.; ATTADEMO, A. M.; ALE, E. Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 88, n. 4, p. 729-737, 2006.

CARVALHO, C. S.; PASQUOTO, T.; FERNANDES, M. N.; UTSUNOMIYA, H. S. M.; COSTA, M. J. Cholinesterase activity as potential biomarkers: Characterization in bullfrog tadpole's brain after exposure to metals. In: **XVII Safety, Health and Environment World Congress**. Villa Real, Portugal, July 09-12, 2017.

CHYNOWETH, D.P., WILKIE, A.C., OWENS, J.M. Anaerobic treatment of piggery slurry – review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 12, n. 4, p. 607–628, 1999.,

COLLINS, J. P.; STORFER, A. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. **Diversity and Distributions**, v. 9, p. 89-98, 2003.

CRUZ, M. C. M.; RAMOS, J. D.; OLIVEIRA, D. L.; MARQUES, V. B.; HAFLE, O. M. Utilização de água residuária de suinocultura na produção de mudas de maracujazeiro-azedo cv. 'Redondo Amarelo'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 1107-1112, 2008.

FERREIRA, C. M.; LOMBARDI, J. V.; MACHADO-NETO, J. G.; BUENO-GUIMARÃES, H. M.; SOARES, S. R. C.; SALDIVA, P. H. N. Effects of copper oxychloride in *Rana catesbeiana* Tadpoles: toxicological and bioaccumulative aspects. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.73, n.3, 2004.

FLORES, M., YAMAGUCHI, U. M. Teste do micronúcleo uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

FROST, D.R. **Amphibian Species of the World: An Online Reference**. Version 6.0. (Access July 17, 2019). Electronic Database accessible at: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA, 2019.

GONÇALVES, M. W.; GAMBALE, P. G.; GODOY, F. R.; ALVES, A. A.; REZENDE, P. H. A.; CRUZ, A. D.; MACIEL, N. M.; NOMURA, F.; BASTOS, R. P.; MARCO-JR, P.; SILVA, D. M. The agricultural impact of pesticides on *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Amphibia: Anura) ascertained by comet assay. **Zoologia**, v. 34, p. 1-8, 2017.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, n. 3, p. 183-190. 1960.

HE, X., AKER, W. G., LESZCZYNSKI, J., HWANG, H. M. Using a holistic approach to assess the impact of engineered nanomaterials inducing toxicity in aquatic systems. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, p. 128–146, 2014.

HOULAHAN, J. E.; FINDLAY, C. S.; SCHMIDT, B. R.; MEYER A. H.; KUZMIN, S. L. Quantitative evidence for global amphibian population declines. v.404, p.752-755 **Nature**. 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2016**, v. 44, p. 1-51, 2016.

ITO, M.; GUIMARÃES, D.; AMARAL, G. Impactos ambientais da suinocultura: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, v. 44, p. 125-156, 2016.

MANSANO, C. F. M.; VANZELA, L. S.; AMÉRICO-PINHEIRO, J. H. P.; MACENTE, B. I.; KHAN, K. U.; FERNANDES, J. B. K.; FRIAS, D. F. R.; DE STÉFANI, M. V. Importance of optimum water quality indices in successful frog culture practices. In: GÖKÇE, D. (Orgs.) **Limnology - Some New Aspects of Inland Water Ecology**. 2019. cap. 7, p.134-154.

MARCANTONIO, A. S. **Toxicidade do sulfato de cobre e do sulfato de zinco para rã-touro, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802: Toxicidade aguda e crônica e parâmetros hematológicos**. 2005. Tese (Doutorado em Aquicultura em água continentais) Faculdade de ciências agrárias e veterinárias - Centro de aquicultura da UNESP, Jaboticabal, 2018.

MAZZARELLI, C.C.M. **Biologia reprodutiva de *Hypsiboas lundii* (Anura, Hylidae) em um fragmento de Cerrado no sudoeste de Minas Gerais**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Zoologia)) Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. 2015.

MESSIAS, A. S.; SILVA, H. A.; LIMA, V. N.; SOUZA, J. E. G. Avaliação da mobilidade de micronutrientes em solo tratado com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, v. 3, n. 3, p. 193-211, 2007.

NAGARAJAN, D.; KUSMAYADI, A.; YEN, H. W.; DONG, C. D.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Current advances in biological swine wastewater treatment using microalgae-based processes. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 1-12, 2019.

NIKINMAA, M. Bioindicators and Biomarkers. In: **An Introduction to aquatic toxicology**. Oxford: Academic Press, Elsevier. 2014, Cap.12, p. 147–155.

ODUM, R. A.; ZIPPEL, K. C. Amphibian water quality: approaches to an essential environmental parameter. **International Zoo Yearbook**, v. 42, n. 1, p. 40–52, 2008.

OLIVEIRA, F. C.; MATTIAZZO, M. E. Mobilidade de metais pesados em um latossolo amarelo distrófico tratado com lodo de esgoto e cultivado com cana-de-açúcar. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 4, p.807-812, 2001.

OLIVEIRA, W. 2006. **Uso de água residuária da suinocultura em pastagens da *Brachiária Decumbens* e Grama Estrela *Cynodom Plectostachyum***. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

OSSANA, N. A.; CASTAÑÉ, P. M.; POLETTA, G. L.; MUDRY, M. D.; SALIBIÁN, A. Toxicity of waterborne copper in premetamorphic tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, n. 6, p. 712–715, 2010.

OSSANA, N. A.; CASTAÑÉ, P. M.; SALIBIÁN, A. Use of *Lithobates catesbeianus* tadpoles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the Reconquista River (Argentina). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 65, n. 3, p. 486–497, 2013.

OSSANA, N. A., SALIBIÁN, A. Micronucleus test for monitoring the genotoxic potential of the surface water of Luján River (Argentina) using erythrocytes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, p. 67-74, 2013.

PELTZER, P. M.; JUNGES, C. M.; ATTADEMO, A. M.; BASSÓ, A.; GRENÓN, P.; LAJMANOVICH, R. C. Cholinesterase activities and behavioral changes in *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae) tadpoles exposed to glufosinate ammonium herbicide. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 7, p. 1165–1173, 2013.

PEREZ IGLESIAS, J. M. 2015. **Biomarcadores de exposição e efeito para avaliação dos efeitos da atrazina a distintos níveis em girinos de anuros neotropicais**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) Instituto de Biociências, Letras e Ciências

Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.

ROBINSON, T. P.; WINT, G. R. W.; CONCHEDDA, G.; VAN BOECKEL, T. P.; ERCOLI, V.; PALAMARA, E.; CINARDI G.; D’AIETTI, L.; HAY, S.I.; GILBERT, M. Mapping the global distribution of livestock. **PLOS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1-13, 2014.

ROCHA, C. A. M. The micronucleus test in erythrocytes of amphibian larvae as tool for Xenobiotic exposure risk assessment: a brief review and an example using *Lithobates catesbeianus* exposed to copper sulphate. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 8, n. 1, p. 23-29, 2011.

ROSA, D. M.; SAMPAIO, S. C; PEREIRA, P. A. M.; DOS REIS, R. R.; SBIZZARO, M. Corn fertilization using swine wastewater and soil-water environmental quality. **Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering**, v. 37, n. 4, p. 801-810, 2017b.

ROSA, D. M.; SAMPAIO, S. C; PEREIRA, P. A. M.; MAULI, M. M.; DOS REIS, R. R. Swine wastewater: impacts on soil, plant, and leachate. **Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering**, Jaboticabal, v. 37, n. 5, p. 928-939, 2017a.

SBH. 2019. Brazilian Amphibians List of Species. Disponível em: <<http://sbherpetologia.org.br/listas/lista-anfibios/>>. Acesso em: 24 abr. 2020.

SCHEELE, B. C.; PASMANS, F.; SKERRATT, L. F.; BERGER, L.; MARTEL, A.; BEUKEMA, W.; ACEVEDO, A. A.; BURROWES, P. A.; CARVALHO, T.; CATENAZZI, A.; LA-RIVA, I. *et al.* Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**, v.363, p. 1459-1463, 2019.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 68, n. 4, p. 369–392, 2004.

VASCONCELOS, A. M. **Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae)**. 2014. 188 f. Tese (Doutorado em Química) Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo, 2014.

VASCONCELOS, G. M. **Avaliação Integrada da qualidade da água do rio Uberabinha – MG com base na caracterização química dos sedimentos e de espécimes da ictiofauna.** 2012. 149 f. Tese (Doutorado Multi-Institucional em Química) Universidade Federal de Goiás, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e Universidade Federal de Uberlândia), Universidade Federal de Uberlândia, 2012.

VERONEZ, A. C. da S.; SALLA, R. V.; BARONI, V. D.; BARCAROLLI, I. F.; BIANCHINI, A.; dos REIS MARTINEZ, C. B.; CHIPPARI-GOMES, A. R. Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. **Aquatic Toxicology**, v. 174, p. 101–108, 2016.

WALKER C. H.; HOPKIN S.P.; SIBLY R. M.; PEAKALL D. B. Biochemical effects of pollutants. In: **Principles of ecotoxicology**, ed.2, Taylor e Francis, New York. 2001. Cap.7, p.119-132.

WHO. **Guidelines for Drinking-Water Quality, Fourth ed.** World Health Organisation, Geneva. 2011. Disponível em: <https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/>. Acesso em: 24 abr. 2020.

WRUBLESWSKI, J.; REICHERT, F. W.; GALON, L.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Acute and chronic toxicity of pesticides on tadpoles of *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae). **Ecotoxicology**, v. 27, n. 3, p. 360–368, 2018.

5. CAPÍTULO 2

**AVALIAÇÃO GENOCITOTÓXICA EM MODELO VEGETAL: EFEITOS DA
ÁGUA RESÍDUARIA DE SUINOCULTURA PROCESSADA POR
BIODIGESTOR EM MERISTEMAS DE CEBOLA (*Allium cepa*) E ALFACE
(*Lactuca sativa*)**

RESUMO

A agricultura em conjunto com a indústria são importantes fontes de poluentes que provocam um impacto negativo na qualidade do meio ambiente. Assim, a água residuária de suinocultura processada em biodigestor (ARS), que tem sido utilizada para fertirrigar lavouras, pode se tornar um poluente ambiental em função da quantidade de metais pesados presentes. O objetivo deste capítulo foi avaliar a toxicidade da ARS no crescimento e no ciclo celular de sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola). Para isto, bioensaios com sementes de cebola e alface foram realizados a partir da exposição das sementes dos referidos modelos à quatro concentrações de ARS por 72 horas, seguidas de análises macroscópicas e microscópicas. Os resultados apontaram que para *A. cepa*, houve inibição no crescimento da raiz, diminuição do índice mitótico e diferenças significativas para o surgimento de aderências cromossômicas, um tipo de alteração cromossômica, apontando então citotoxicidade e genotoxicidade para a ARS. Para *L. sativa* não foi possível observar nenhum efeito genotóxico ou citotóxico da ARS. Estes resultados apontam que *A. cepa* é um modelo de teste mais sensível que *L. sativa* para este tipo de resíduo, e que a ARS possui potencial toxicológico para provocar alterações cromossômicas e anormalidades nucleares que podem afetar o crescimento e desenvolvimento das plantas, possivelmente pela produção de espécies reativas de oxigênio que provocam um estresse oxidativo na planta, desregulando seu sistema de defesa antioxidante. Com isto, conclui-se que o teste de *Allium cepa* apresentou sensibilidade adequada para a avaliação da citogenotoxicidade da ARS, bem como também apresentou boa correlação com os testes desenvolvidos com modelos animais realizados no primeiro capítulo.

Palavras-Chave: Alterações cromossômicas; Citotóxico; Genotóxico; Ecotoxicologia.

ABSTRACT

Agricultural and industry are important sources of pollutants, which may cause negative impact in environment. The swine wastewater processed in biodigester (SWB), which has been used for crops fertigation, is a potential pollutant, depending the amount of heavy metals available in the waste. The aim of this chapter was to evaluate the toxicity of SWB in the growth and cell cycle of two model plants: *Lactuca sativa* and *Allium cepa*. Thereby, bioassays were performed by exposing seeds of the referred models to four concentrations of SWB for 72 hours, followed by macroscopic and microscopic evaluations. Regarding *A. cepa*, we observed growth root inhibition, decrease in mitotic index and significant differences in appearance of chromosomal adhesions, a type of chromosomal alteration, indicating cytotoxicity and genotoxicity of SWB; while for *L. sativa*, it was not possible to observe any genotoxic or cytotoxic effect of SWB. These results indicate that *A. cepa* is a more sensitive than *L. sativa* for this residue, and that SWB has toxicological potential that may cause chromosomal changes and nuclear abnormalities that can affect plant growth and development, possibly due to production of reactive oxygen species that cause oxidative stress in plants, unbalancing its antioxidant defense system. Thus, we concluded that the *A. cepa* test presented adequate sensitivity for the evaluation of cytotoxicity of SWB, as well as presented a good correlation with the tests developed with animal models performed in the first chapter.

Keywords: Chromosomal alteration; Citotoxic; Genotoxic; Ecotoxicology;

5.1 INTRODUÇÃO

A agricultura, em conjunto com a indústria, são importantes fontes de agentes poluentes que provocam um impacto negativo na qualidade do meio ambiente (ROSCULETE *et al.* 2018). Em granjas suínas, a maior parte das fezes é usada como fertilizante do solo devido à riqueza em nitrogênio, fósforo e matérias orgânicas, que auxiliam o crescimento das plantas, além de alterar as propriedades físicas e químicas do solo (DAO; SCHWARTZ, 2010). No entanto, a quantidade de metais pesados nas fezes, resultado da adição de sais minerais na alimentação, desperta preocupações a respeito dos potenciais riscos desse resíduo para o solo e a segurança alimentar na agricultura (FENG *et al.*, 2018; CANG *et al.* 2004).

Ao considerar as diferentes técnicas de avaliação de toxicidade, os bioensaios citogenéticos vegetais são uma importante ferramenta para identificar os efeitos citogenotóxicos. Estes bioensaios, realizados com ponta de raiz (meristema), são amplamente utilizados para avaliar os efeitos biológicos de substâncias simples ou compostas em organismos complexos e são considerados uma ferramenta importante na identificação dos efeitos de determinadas substâncias no ciclo celular e também a nível cromossômico (SOUSA *et al.* 2010, CAMPOS *et al.* 2008, DRAGOEVA *et al.* 2008; ANDRADE-VIEIRA *et al.* 2014).

Os bioensaios em modelos vegetais apresentam características desejáveis como rapidez no crescimento, baixo custo, alta sensibilidade e boa correlação com os modelos animais e estão sendo amplamente utilizados em estudos de prospecção de efeitos de poluentes ambientais (LEME; MARIN-MORALES, 2009). O teste com *Allium cepa* (cebola) tem sido comumente usado, com uma ampla aplicação (compostos químicos, metais pesados, resíduos industriais ou domésticos, água de rios, entre outros) e com resultados satisfatórios quando comparados com outros sistemas testes, seja com células eucarióticas ou procarióticas (FERETTI *et al.* 2007). Este modelo também é utilizado para avaliar a toxicidade por meio de análises macroscópicas, mediante a mensuração do comprimento das raízes (FISKESJO, 1985) e análises microscópicas por meio do índice mitótico, das aberrações cromossômicas, anormalidades nucleares e micronúcleo (LEME; MARIN-MORALES, 2009). A planta modelo *Lactuca sativa* (alface) destaca-se em ensaios de germinação e crescimento, pois, apresenta germinação rápida e uniforme (DOS SANTOS *et al.* 2018), além de mostrar sensibilidade e eficácia adequada para a análise dos parâmetros citogenéticos, o que a torna um modelo excelente para análises

macroscópicas e microscópicas (ANDRADE et al., 2010; ANDRADE-VIEIRA et al., 2014).

Em 2013, a produção de resíduo a partir de fezes de suínos foi cerca de 670 milhões de toneladas, representando 45% do total de resíduos da pecuária (QIAN et al., 2018). Portanto, verifica-se que o resíduo de suinocultura contribui com quase metade dos poluentes liberados no meio ambiente pela produção animal. Levando em consideração que são escassos estudos a respeito dos efeitos ecotoxicológicos desse resíduo, uma avaliação citogenética e genotóxica dos efeitos deste resíduo faz-se necessária e urgente, de forma a criar subsídios para futuras recomendações de uso na agricultura. Com isto, o objetivo deste capítulo foi de avaliar a toxicidade da água residuária de suinocultura processado pelo biodigestor (ARS) no crescimento e no ciclo celular de sementes de *L. sativa* e *A. cepa*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Modelos vegetais utilizados nos bioensaios

Para a realização dos testes e análises acerca do potencial citotóxico e genotóxico do resíduo de suinocultura em células vegetais, sementes de cebola (*Allium cepa* L.) e de alface (*Lactuca sativa* L.) foram utilizadas como sistema teste nos bioensaios realizados. As sementes foram adquiridas em revendas de distribuição de insumos (no município de Quirinópolis – Goiás), sendo escolhidas a alface cultivar ‘Venerada’ – Feltrin Sementes (ORD:532508) e a cebola cultivar ‘Roxa’ – Isla Pak (Lote:111955-007-52).

5.2.2 Resíduo de suinocultura

A ARS processada pelo biodigestor foi coletada em uma granja comercial no município de Rio verde – Goiás, Brasil, tendo sido mantida em um barril plástico de 200 litros, em temperatura ambiente, por aproximadamente 8 meses. Antes da realização dos experimentos foram realizadas análises da composição química do resíduo, incluindo os macros e micronutrientes, no laboratório Solotech Cerrado, situado em Rio Verde – Goiás, Brasil (tabela 1).

5.2.3 Delineamento dos bioensaios

Foram utilizadas quatro soluções da ARS (C1=100%, C2=75%, C3=50% e C4=25). Para a concentração de 100% foi utilizado o resíduo puro, já para a concentração de 75%, foi usado 750mL do resíduo e 250mL de água destilada, enquanto para a concentração de 50% utilizou-se 500mL de água destilada e 500mL de resíduo e por fim, na concentração de 25% foi utilizado 250mL do resíduo e 750mL de água destilada. As diluições foram feitas a partir do resíduo puro (100%) pois a ARS é utilizada para a fertirrigação sem nenhuma diluição, portanto, a intenção foi de verificar se as concentrações utilizadas nessa prática podem ou não ser tóxicas para as plantas.

O experimento de germinação de sementes de cebola foi montado em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), no qual as sementes germinaram, em cinco repetições e cada repetição consistia em uma placa de Petri com vinte e cinco sementes colocadas sobre papel de germinação. As placas foram mantidas em B.O.D. a 25°C. Para o controle negativo (CN) foi utilizado água destilada e para o controle positivo (CP) foi usado a Trifluralina a 0,84ppm, um herbicida já conhecido por provocar anormalidades em *A. cepa* (FERNANDES *et al.* 2007).

As sementes de alface foram germinadas sobre papel de germinação umedecido com 5mL das diluições da ARS, em placas de Petri por 72 horas, enquanto as sementes de cebola foram germinadas primeiramente em papel de germinação umedecido em 5ml de água destilada por 72 horas e, após a germinação, as plântulas foram expostas às concentrações do resíduo e aos controles por mais 72 horas. Esta diferença na exposição dos dois tipos de sementes deve-se ao fato de as sementes de cebola utilizadas neste trabalho demandarem maior tempo para o início da germinação e, também, ao fato de ter ocorrido contaminação das sementes por fungos durante o processo de germinação. Em decorrência disso, optou-se por germinar separadamente e selecionar as sementes de cebola não contaminadas por fungos.

Foram expostas 125 sementes de cebola e 150 de alface a cada concentração da ARS e dos controles. Essa maior quantidade de sementes de alface deve-se ao fato de elas serem mais frágeis e, portanto, mais susceptíveis à perda do meristema radicular, portanto 25 sementes de alface de cada tratamento não foram medidas com o intuito de preservar o meristema para as avaliações microscópicas.

Ao fim do período de exposição à ARS, as raízes foram fixadas em uma solução de álcool metílico e ácido acético (3:1) por três trocas de 10 minutos cada e armazenadas

em freezer (-20 °C) até o momento da confecção das lâminas para as análises citogenéticas.

5.2.4 Análises macroscópicas

As sementes foram medidas diariamente durante o período de exposição para se calcular o índice de crescimento e a porcentagem de germinação. Para isto, as sementes foram enumeradas através de um sistema numérico feito com o papel de germinação e diariamente as sementes eram colocadas em um papel cartão preto e fotografadas juntamente com uma régua para servir de referência (Fig.1). A medição foi realizada com auxílio dos softwares MyRoot v.5.0 e ImageJ v.1.52^a.

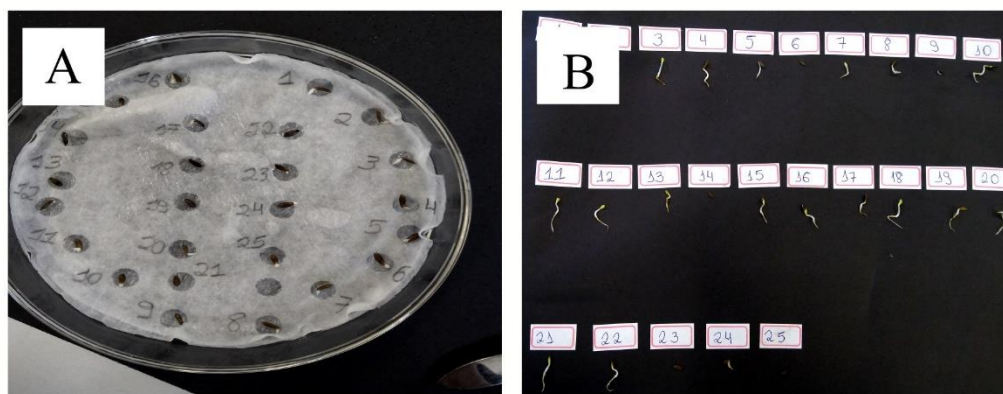


Figura 1. (A) Sistema de marcação numérica das sementes durante o experimento. (B) Fotografia das raízes a ser utilizada para a medição do comprimento.

Foram escolhidos 100 indivíduos de cada espécie que apresentaram dados confiáveis para serem utilizadas para o levantamento destes dados, sendo excluídos 25 daqueles que apresentaram fungos, quebras na raiz durante o manejo ou a não germinação durante todo o processo.

5.2.5 Análises microscópicas

Para avaliar a citogenotoxicidade do resíduo, as raízes, após fixadas, foram lavadas três vezes em água destilada, e hidrolisadas em HCl 1 M por 8 minutos (alface) ou por 16 minutos (cebola) em temperatura ambiente e em seguida, lavadas novamente por mais três vezes, também em água destilada. Para o preparo das lâminas, os meristemas radiculares foram dissociados, corados com três gotas de Orceína Acética (2%) por 10 minutos, cobertos com lamínula e esmagados.

Foram utilizados de três a oito indivíduos de réplicas diferentes para cada concentração e foram contabilizadas 5.000 células por tratamento, partir das quais foram mensurados os seguintes parâmetros: (i) índice mitótico (MI), calculado a partir da razão entre o número de células em divisão (Prófase, Metáfase, Anáfase e Telófase) e o número total de células observadas; (ii) a frequência de aberrações cromossômicas (pontes, fragmentos, quebras cromossômicas, perdas cromossômicas c-metáfases, aderências, entre outros), micronúcleos e anormalidades nucleares, conforme levantado por Leme e Marin-Morales (2009).

Exemplos de alterações cromossômicas e anormalidades nucleares encontradas nos indivíduos de *A. cepa* e *L. sativa* estão dispostas na figura 2.

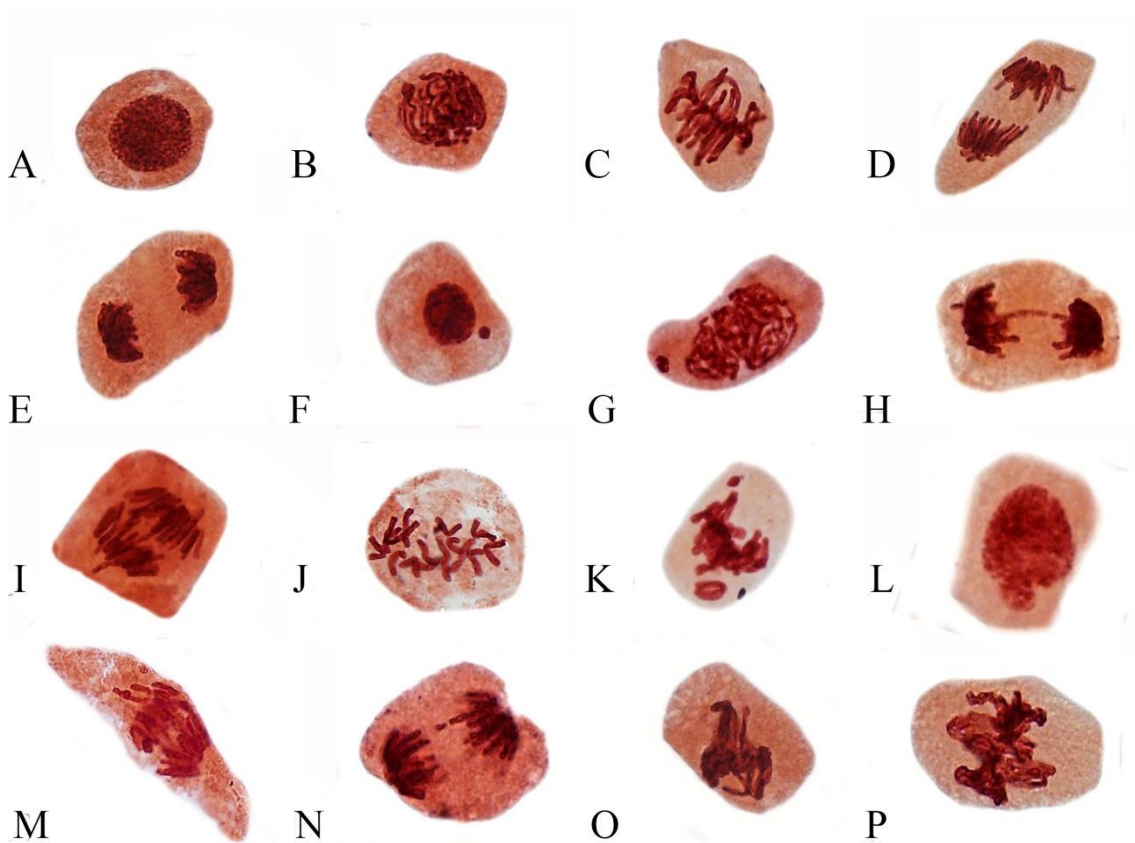


Figura 2. Alterações cromossômicas e anormalidades nucleares encontradas em células meristemáticas de cebola e de alface. Núcleo normal (A), prófase (B), metáfase (C), anáfase (D), telófase (E), micronúcleo na interfase (F), micronúcleo na prófase (G), ponte cromossômica na telófase (H), ponte cromossômica na anáfase (I), c-metáfase (J), quebra e perda cromossômica na metáfase (K), broto nuclear (L), perda cromossômica na anáfase (M), quebra cromossômica na anáfase (N) e aderências cromossômicas (O-P).

5.2.6 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas dos parâmetros macroscópicos e microscópicos obtidos a partir de sementes expostas ao resíduo de suinocultura, primeiramente foi feito o teste normalidade dos dados teste de Levene, ($p > 0.05$) e em seguida utilizada ANOVA One-Way quando os dados eram paramétricos e o teste Kruskal-Wallis quando não paramétricos. No entanto, em primeiro momento, quando os dados mostravam-se ser não paramétricos, eles eram submetidos ao Log ($X+1$) e testado a normalidade novamente. Os testes post hoc utilizados foram o Teste de Tukey e o teste de Student Newman Keuls.

As análises foram realizadas no Statística 7 e o teste de Student Newman Keuls no BioEstat v.5.0. Para os parâmetros macroscópicos, os testes foram aplicados considerando o comprimento das raízes diariamente e todos os dias juntos, sendo que nas raízes de cebola foi-se subtraído o valor inicial de germinação antes da exposição ao resíduo, ou seja, subtraiu-se a diferença do comprimento da cebola germinada com água destilada dos valores de comprimento da cebola expostas durante os três dias. Já para os parâmetros microscópicos, os testes foram aplicados considerando a frequência das alterações cromossômicas, anormalidades nucleares e micronúcleos, sendo considerado cada parâmetro separadamente. Em todos os casos, $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Análises químicas do resíduo

Os resultados referentes à quantificação dos macro e micronutrientes presentes na ARS estão dispostos na tabela 1. O resíduo avaliado, mesmo após 8 meses de coletado, apresentou valores para nitrogênio, cobre e zinco acima dos padrões previstos pelo CONAMA na resolução nº397/2008 que estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, como por exemplo, nitrogênio, cobre e zinco.

Tabela 1. Macronutrientes, micronutrientes e outros parâmetros do resíduo de suinocultura processado pelo biodigestor, juntamente com os valores permitidos pelo CONAMA 397/2008.

Macronutrientes, Micronutrientes e outros parâmetros	Valores	
	Resíduo	CONAMA
Nitrogênio	2,4 g/L	20,0 mg/L
Fosforo	0,05 g/L	-
Potássio	0,30 g/L	-

Calcio	0,03 g/L	-
Magnésio	0,04 g/L	-
Enxofre	0,03 g/L	-
Matéria Orgânica	0,08 g/L	-
Ferro	10,74 mg/L	15,0mg/L
Manganês	0,58 mg/L	1,0 mg/L
Cobre	2,16 mg/L	1,0 mg/L
Zinco	5,10 mg/L	5,0 mg/L
pH	8,77	-
Densidade	1000 g/L	-
Massa Seca	0,33%	-

5.3.2 Análises do crescimento das raízes de alface (*Lactuca sativa* L.)

Os dados do comprimento das raízes de *L. sativa* não atenderam os pressupostos do teste de Levene ($p > 0,05$), portanto, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para todos os dias de exposição. O teste estatístico para 24 horas de exposição foi significativo ($H_{(5, N=600)} = 157.3873$; $p = 0.000$; Figura 3) e o teste de Student-Newman-Keuls apontou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o CN e C1, CN e C2, CN e C3, C1 e C3, C1 e C4, C1 e CP, C2 e C4, C2 e CP e C3 e C4, C3 e CP, C4 e CP. Os valores de média e desvio-padrão estão dispostos na tabela 2.

A alteração no comprimento das raízes expostas por 48 horas ao resíduo de suinocultura foi significativa ($H_{(5, N=600)} = 145.5685$; $p = 0.000$; Figura 3), sendo que o teste post-hoc apontou significância ($p < 0,05$) entre CN e C1, CN e C2, CN e C4, CN e CP, C1 e C2, C1 e C3, C1 e C4, C1 e CP, C2 e C3, C2 e C4, C3 e C4, C3 e CP e C4 e CP. Para as raízes expostas por 72 horas também houve significância ($H_{(5, N=600)} = 179.5394$; $p = 0.000$; Figura 3), sendo que o teste post-hoc mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre CN e C2, CN e C3, CN e C4, C1 e C2, C1 e C3, C1 e C4, C1 e CP, C2 e C3, C2 e C4, C3 e C4, C3 e CP e C4 e CP.

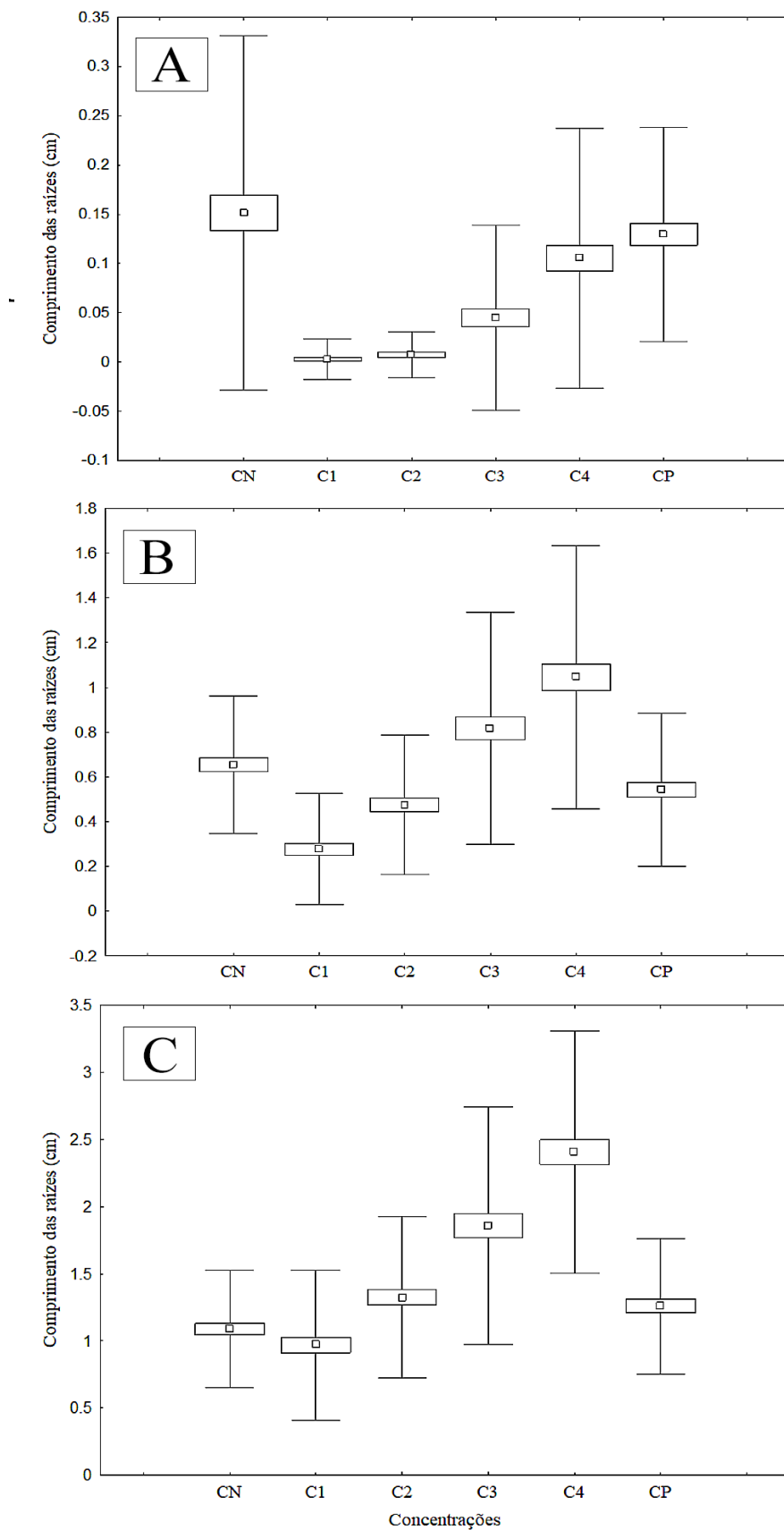


Figura 3. Comprimento das raízes de *L. sativa* após 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) de exposição às concentrações de ARS.

5.3.3 Análises do crescimento das raízes de cebola (*Allium cepa*)

Os dados do comprimento das raízes de *A. cepa* se mostraram heterogêneos, e por isso, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para as comparações dos dados referentes a todos os dias de exposição. Para as raízes com 24 horas de exposição, o teste apontou significância ($H_{(5, N=600)} = 146,4555$; $p = 0,000$; Figura 4) e o teste de Student Newman Keuls apontou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o CN e C1, CN e C2, CN e C3, CN e C4, CN e CP, C1 e C2, C1 e C3, C1 e C4, C1 e CP, C2 e C3, C2 e CP, C3 e C4 e C4 e CP. Os valores de média e desvio-padrão estão dispostos na tabela 2. Para as raízes expostas por 48 horas a ARS, houve significância ($H_{(5, N=600)} = 83,07075$; $p = 0,0000$; Figura 4), sendo que o teste post-hoc mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre CN e C1, CN e C3, CN e CP, C1 e C2, C1 e C4, C2 e C3, C2 e CP e C3 e C4, C3 e CP, C4 e CP. Por fim, as raízes expostas por 72 horas ao resíduo também apresentaram alterações de crescimento significativas ($H_{(5, N=600)} = 115,2461$; $p = 0,000$; Figura 4), sendo que o teste post-hoc mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre CN e C1, CN e C2, CN e C3, CN e CP, C1 e C2, C1 e C3, C1 e C4, C1 e CP, C2 e CP, C3 e CP e C4 e CP.

5.3.4 Índice mitótico dos meristemas de alface e cebola

O índice mitótico representa a frequência, em porcentagem, de células em divisão (Prófase, Metáfase, Anáfase e Telófase) a partir das 5.000 células analisadas de cada tratamento.

O índice mitótico dos indivíduos de *L. sativa* estão dispostos na tabela 3, juntamente com a porcentagem de células em divisão (mitose), alterações cromossômicas e alterações nucleares. Os dados de frequência de células em divisão dos indivíduos de alface foram submetidos a ANOVA e o teste não apontou diferenças significativas ($F_{(5, 24)} = 2,3711$, $p = 0,94220$).

Tabela 2. Valores de média e desvio-padrão do comprimento das raízes de *A. cepa* e *L. sativa* expostas a ARS.

Espécie/Horas de exposição	Tratamentos					
	C1 (n=100)	C2 (n=100)	C3 (n=100)	C4 (n=100)	CN (n=100)	CP (n=100)
<i>L. sativa</i> (24 horas)	0,003±0,020	0,007±0,023	0,045±0,093	0,105±0,132	0,151±0,180	0,130±0,108
<i>L. sativa</i> (48 horas)	0,276±0,248	0,476±0,311	0,817±0,519	1,046±0,588	0,654±0,308	0,542±0,343
<i>L. sativa</i> (72 horas)	0,968±0,555	1,325±0,604	1,857±0,885	2,404±0,900	1,087±0,435	1,258±0,506
<i>A. cepa</i> (24 horas)	0,110±0,131	0,322±0,158	0,286±0,235	0,357±0,227	0,412±0,209	0,268±0,170
<i>A. cepa</i> (48 horas)	0,512±0,312	0,697±0,323	0,601±0,376	0,910±0,688	0,805±0,394	0,427±0,226
<i>A. cepa</i> (72 horas)	0,934±0,534	1,208±0,526	1,193±0,662	1,394±0,776	1,393±0,583	0,622±0,311

Valores de média ± Desvio-padrão

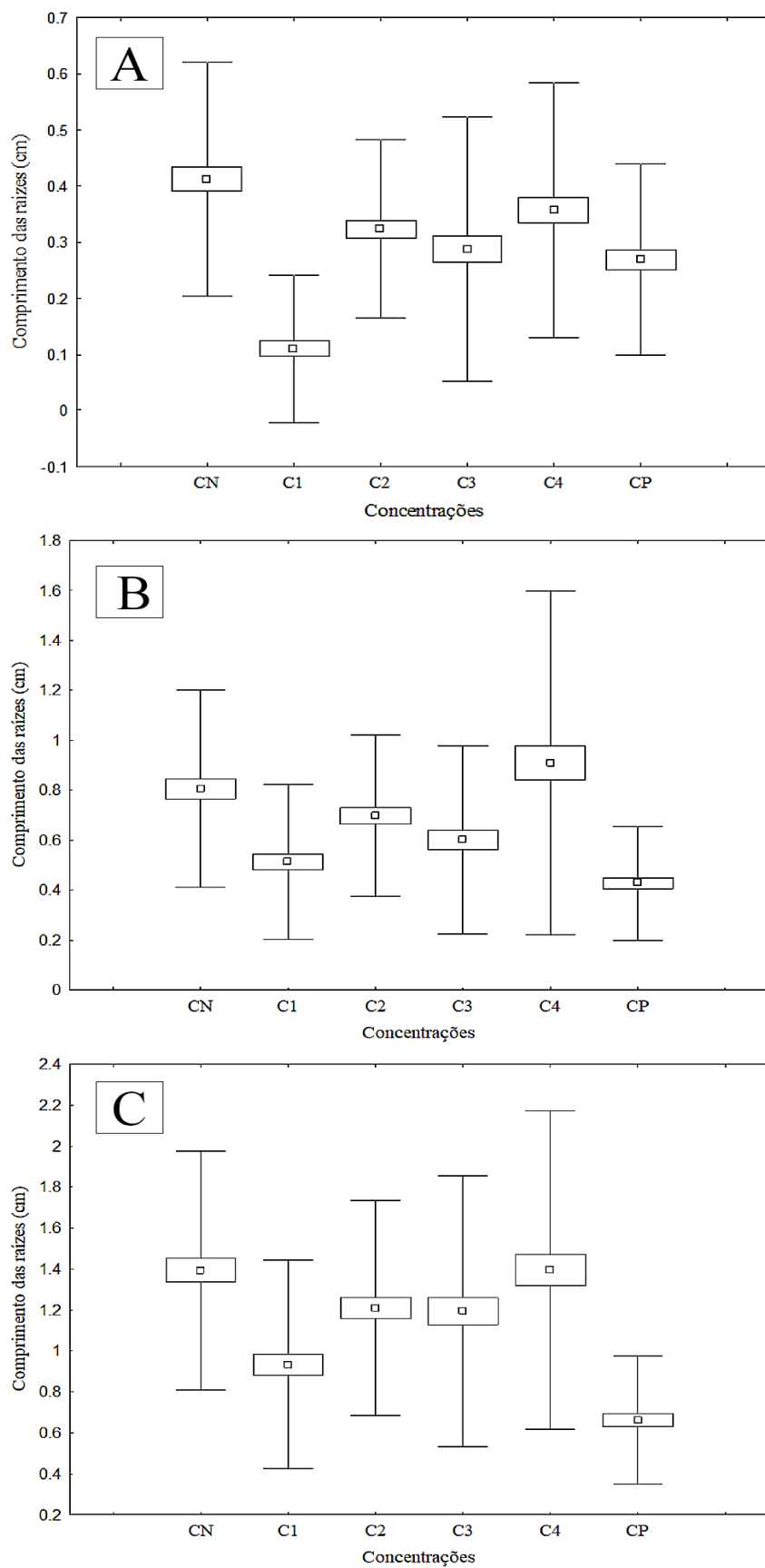


Figura 4. Comprimento das raízes de *A. cepa* com 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) de exposição as concentrações da ARS.

Tabela 3. Índice mitótico e porcentagem das diferentes fases do ciclo celular e alterações cromossômicas/anormalidades nucleares de *L. sativa*.

Concentração	I.M.	Ciclo celular					
		Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	Alter./Anorm.
C1	4,44%	95,1%	2,2%	1,1%	0,4%	0,8%	0,4%
C2	5,02%	94,6%	2,8%	0,9%	0,4%	1%	0,3%
C3	5,3%	94,5%	2,6%	1,4%	0,4%	0,9%	0,2%
C4	4,3%	95,5%	1,6%	1,2%	0,4%	1,1%	0,2%
CN	5,2%	94,6%	3,3%	0,7%	0,4%	0,8%	0,2%
CP	4,9%	94,9%	1,5%	1,4%	0,5%	1,5%	0,2%

I.M. – Índice mitótico

O índice mitótico dos indivíduos de *A. cepa* estão dispostos na tabela 4, juntamente com a porcentagem de células em divisão (mitose), alterações cromossômicas e alterações nucleares. A soma da frequência de células em divisão dos indivíduos de cebola foram submetidos a ANOVA que apontou significância ($F_{(5, 28)}=5,1173$, $p=,00186$, Figura 5) entre os indivíduos da C3 e CN ($p=0.000726$) e da C4 e CN ($p=0.020280$).

Tabela 4. Índice mitótico e porcentagem das diferentes fases do ciclo celular e alterações cromossômicas/anormalidades nucleares de *A. cepa*.

Concentração	I.M.	Ciclo celular					
		Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	Alter./Anorm.
C1	6,9%	92,3%	3,6%	0,9%	0,6%	1,8%	0,8%
C2	7,6%	91,9%	6%	0,3%	0,3%	1%	0,5%
C3	3%	96,7%	2,46%	0,08%	0,06%	0,4%	0,3%
C4	7,2%	92%	4,5%	0,8%	0,4%	1,5%	0,8%
CN	8,4%	91,2%	5%	0,9%	0,6%	1,9%	0,4%
CP	7,8%	91,6%	4,7%	0,6%	0,5%	2%	0,6%

I.M – Índice mitótico

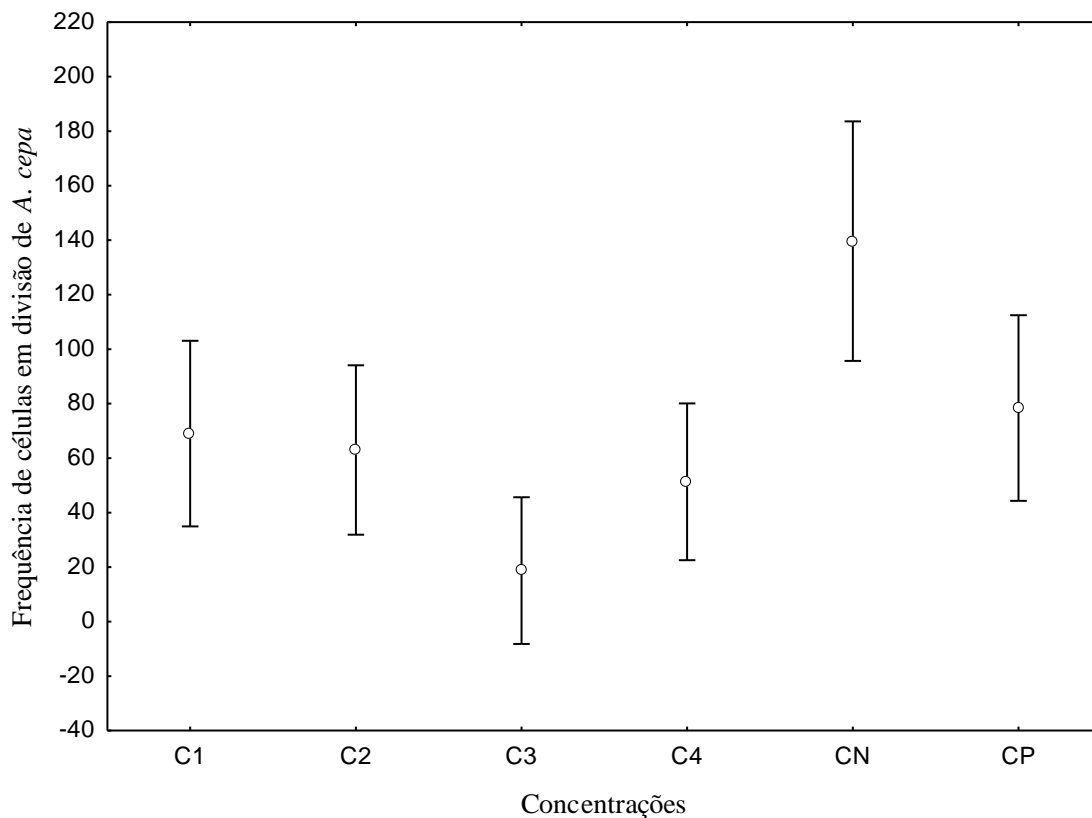


Figura 5. Frequência de células em divisão (Prófase, Metáfase, Anáfase e Telófase) de *A. cepa* submetidos ao teste de ANOVA.

5.3.5 Alterações cromossômicas, micronúcleos e anormalidades nucleares em alfaca

Nos indivíduos analisados de *L. sativa* foram encontradas aderência cromossômica, anáfase com ponte, c-metáfase, metáfase com quebra cromossômica, metáfase com perda cromossômica, micronúcleo no período interfásico e broto nuclear (Figura 2).

Os valores de média e desvio-padrão das anormalidades encontradas estão dispostos na tabela 5.

Alterações cromossômicas, como aderência cromossômica não foram significativas ($H_{(5, N=30)} = 10,63333$, $p = 0,0592$), assim como anáfase com ponte cromossômica ($F_{(5, 24)} = 4,9412$, $p = 0,77741$), c-metáfase ($H_{(5, N=30)} = 7,518519$, $p = 0,1848$), metáfase com quebra cromossômica ($H_{(5, N=30)} = 5,000000$, $p = 0,4159$) e metáfase com perda cromossômica ($H_{(5, N=30)} = 3,222222$, $p = 0,6658$).

Para as anormalidades nucleares, a frequência de micronúcleo em células interfásicas não foi significativa ($F_{(5, 24)}=2,1205$, $p=,09767$), assim como brotos nucleares ($H_{(5, N= 30)}=4,142857$, $p =0,5290$).

5.3.6 Alterações cromossômicas, micronúcleos e anormalidades nucleares em cebola

Nos indivíduos analisados de *A. cepa* foram encontradas anáfase e telófase com ponte cromossômica, c-metáfase, broto nuclear no período interfásico, aderência cromossômica, anáfase e metáfase com quebra cromossômica, anáfase com perda cromossômica e micronúcleo no período interfásico e de prófase (Figura 2).

Os valores de média e desvio-padrão das anormalidades encontradas estão dispostos na tabela 6.

Os resultados da frequência de alterações cromossômicas que não foram significativos ($p>0,05$) de acordo com os testes estatísticos, foram: (i) anáfase com ponte cromossômica ($F_{(5, 28)} =1,6813$, $p=0,17184$); (ii) c-metáfase ($F_{(5, 28)} =0,35623$, $p=0,87384$); (iii) telófase com ponte cromossômica ($H_{(5, N= 34)}=8,292571$ $p=0,1408$); (iv) anáfase com quebra cromossômica ($H_{(5, N= 34)} =3,948214$ $p=0,5569$); (v) metáfase com quebra cromossômica ($H_{(5, N= 34)} =1,9889$ $p=0,8507$); e (vi) anáfase com perda cromossômica ($H_{(5, N= 34)} =3,250000$ $p =0,6615$).

No entanto, a frequência de aderência cromossômica foi significativa ($H_{(5, N= 34)} =15,06008$ $p =0,0101$; Figura 6) de acordo com o teste, com as diferenças significativas entre C1 e C3, C1 e CN, C2 e C3, C2 e CN, CP e C3 e CP e CN.

Para as anormalidades nucleares encontradas, a frequência de broto nuclear no núcleo interfásico não foi significativa ($F_{(5, 28)} =0,27936$, $p=0,92052$), bem como a de micronúcleo no período de prófase ($H_{(5, N= 34)} =5,929524$ $p =0,3131$). No entanto, a presença de micronúcleo no período interfásico foi significativa ($F_{(5, 28)} =2,6142$, $p=0,04625$, Figura 6) com diferenças significativas entre a C1 e C2.

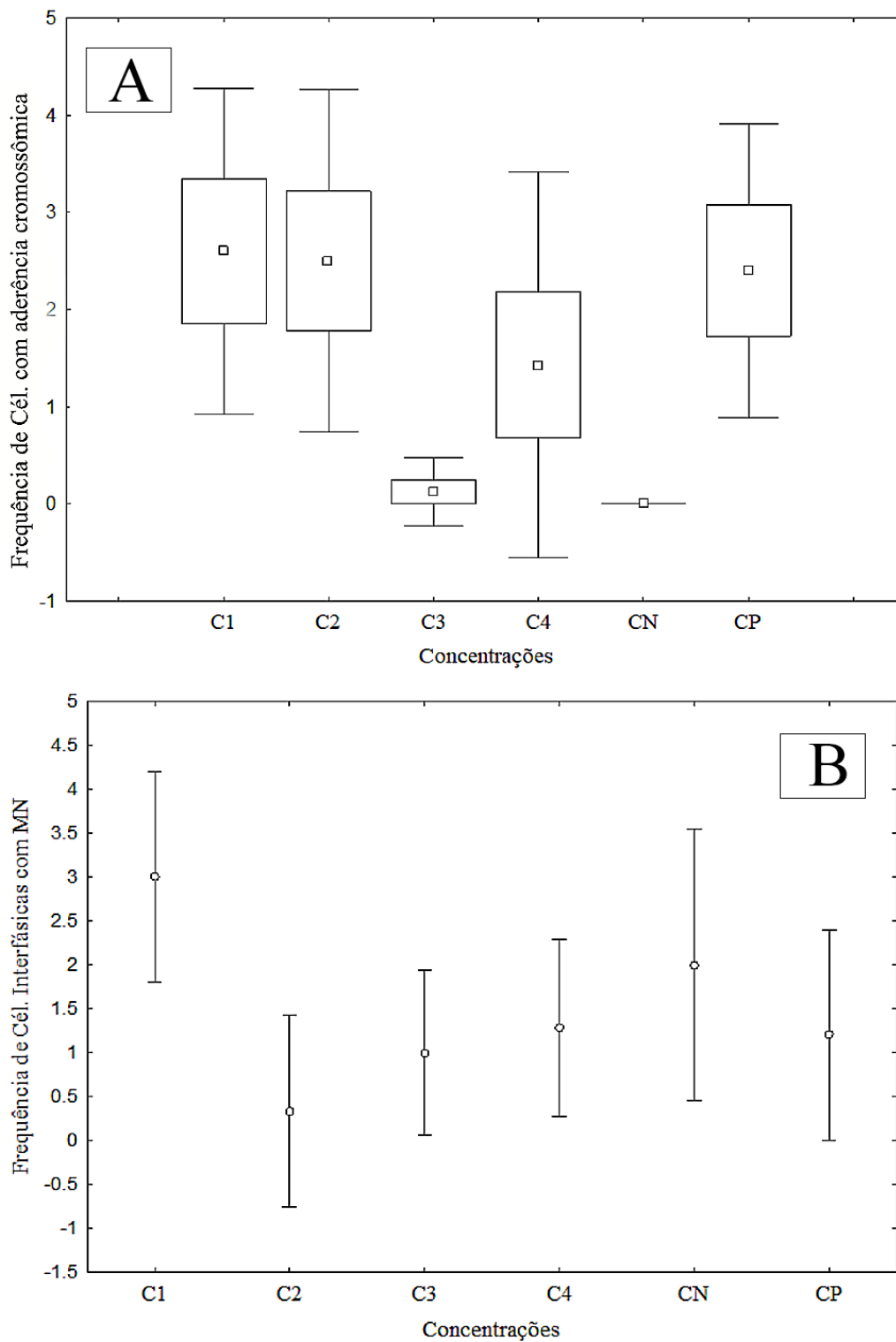


Figura 6. Gráficos de frequência de células com aderência cromossômica (A) e com micronúcleos na interfase (B) encontradas nos indivíduos de *A. cepa* expostos as concentrações de ARS.

Tabela 5. Valores de média e desvio-padrão das alterações cromossômicas e anormalidades nucleares encontradas em *L. sativa* expostas a ARS.

Alter. Cromossômicas / Anorm.Nucleares	Tratamentos					
	C1 (n=5)	C2 (n=5)	C3 (n=5)	C4 (n=5)	CN (n=5)	CP (n=5)
Anáfase com ponte	0,6±0,54	0,6±0,54	0,6±0,54	0,2±0,44	0,6±0,54	0,4±0,54
Aderência cromossômica	0,8±0,83	1,2±1,09	0,2±0,44	0,2±0,44	0±0	1,2±0,83
C-metáfase	0±0	0±0	0,2±0,44	0,4±0,54	0±0	0±0
Metáfase com quebra cromossômica	0±0	0±0	0,2±0,44	0±0	0±0	0±0
Metáfase com perda cromossômica	0±0	0,2±0,44	0,2±0,44	0±0	0,2±0,44	0±0
Interfase com micronúcleo	2,4±1,81	1,4±1,14	0,6±0,89	1±1,41	0,8±0,83	0,2±0,44
Interfase com broto nuclear	0,2±0,44	0±0	0±0	0,2±0,44	0±0	0±0

Valores de média ± desvio-padrão

Tabela 6. Valores de média e desvio-padrão das alterações cromossômicas e anormalidades nucleares encontradas em *A. cepa* expostas a ARS.

Alter. Cromossômicas / Anorm.Nucleares	Tratamentos					
	C1 (n=5)	C2 (n=6)	C3 (n=8)	C4 (n=7)	CN (n=3)	CP (n=5)
Anáfase com ponte	0,8±0,83	1±2	0,25±0,70	1,42±1,39	2,66±2,88	0,8±0,83
Aderência cromossômica	2,6±1,67	2,5±1,76	0,125±0,35	1,42±1,98	0±0	2,4±1,5
C-metáfase	0,4±0,54	0,16±0,40	0,125±0,35	0,142±0,37	0,33±0,57	0,4±0,89
Telófase com ponte	0,2±0,44	0±0	0±0	0,42±1,13	0,66±0,57	0,2±0,44
Anáfase com quebra cromossômica	0±0	0±0	0±0	0,14±0,37	0±0	0,2±0,44
Metáfase com quebra cromossômica	0,4±0,54	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Anáfase com perda cromossômica	0±0	0±0	0,125±0,35	0±0	0±0	0±0
Interfase com broto nuclear	0,4±0,89	0,33±0,51	0,125±0,35	0,28±0,75	0±0	0,2±0,44
Interfase com micronúcleo	3±1,87	0,33±0,51	1±1,06	1,28±1,38	2±2	1,2±1,09
Prófase com micronúcleo	0,2±0,44	0±0	0±0	0,28±0,48	0,33±0,57	0±0

Valores de média ± desvio-padrão

5.4 DISCUSSÃO

Os resultados referentes às análises de nutrientes do resíduo mostram que, mesmo após 8 meses, o resíduo possui níveis altos de metais pesados como o cobre e o zinco, sendo esses valores acima do estabelecido pelo CONAMA na resolução 397/2008. Com isso, pode-se inferir sobre o potencial da ARS para a poluição de efluentes ou de solos. Os metais pesados podem ser tóxicos para as plantas, animais e humanos, até mesmo em concentrações relativamente baixas (SHAHID *et al.*, 2014), como por exemplo o cobre, que possui concentração tóxica para plantas a partir de 0.02 mg/kg⁻¹ (YE; BAKER; WONG, 2003). No entanto, esta toxicidade geralmente está associada a concentrações maiores do que os diferentes organismos necessitam, ou outros parâmetros como o solo, o tempo de exposição, dispersão, e a presença ou ausência de outros elementos que podem agravar a toxicidade (ELEKES *et al.*, 2010). Com isto, os efeitos químicos, biológicos e fisiológicos da exposição das plantas a metais pesados são motivo de crescente preocupação, já que possuem potencial de se acumular e entrar na cadeia alimentar (SARMA *et al.* 2011; SHAHID *et al.* 2014).

Os metais pesados, além serem altamente persistentes, não são degradados facilmente por atividade microbiana (BIEL-MAESO *et al.*, 2019), são ubíquos e não-biodegradáveis (WU *et al.*, 2016). Nas plantas, as mudanças nas atividades fisiológicas são direta e indiretamente afetadas pelo acúmulo de metais pesados, que alteram as taxas metabólicas normais (GRATÃO *et al.* 2019; NATASHA *et al.* 2019). A contaminação nas plantas por metais pesados pode provocar um forte estresse oxidativo devido a um desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) em diferentes compartimentos celulares, levando a ruptura da membrana (peroxidação lipídica) e à desnaturação de proteínas e ácidos nucleicos, que pode afetar negativamente processos metabólicos importantes, como a fotossíntese (GRATÃO *et al.* 2019).

Após as 72 horas de exposição, percebe-se que as concentrações da ARS C4 e C3 são as que apresentaram maior influência no crescimento médio das raízes, inclusive havendo diferença significativa em relação ao CN em *L. sativa*. As sementes expostas a C1 foram as que tiveram o menor crescimento em *L. sativa*, sendo significativamente menores que as outras expostas a outras concentrações da ARS e em *A. cepa*, a C1 foi a segunda concentração que apresentou menor crescimento das raízes, embora não tenha havido diferença em relação às demais concentrações de ARS e até mesmo do CN.

O trabalho de Tiquia *et al.* (1996), que expôs sementes de seis espécies de plantas a extratos aquoso do resíduo de suinocultura extraídos de pilhas em compostagem, apontou que o crescimento de duas espécies foram significativamente inibidas no início da exposição quando o extrato estava mais concentrado, e também apontou fitotoxicidade (mediante os resultados dos testes de germinação e crescimento das raízes) durante os primeiros 14 dias de compostagem. O referido autor relaciona a toxicidade observada à presença de cobre, zinco e nitrogênio amoniacal, já que estes diminuíram com o passar dos dias de compostagem. O autor também revela que a taxa de germinação e crescimento das raízes alcançaram o grupo controle conforme os dias de compostagem iam se passando, ou seja, conforme os níveis de Cu, Zn e nitrogênio amoniacal iam abaixando o crescimento das raízes foram se igualando com o grupo controle.

Portanto, neste trabalho, o efeito do nitrogênio amoniacal pode ter influenciado na fitotoxicidade da ARS. No entanto, em áreas agrícolas, ao ocorrer a fertirrigação das lavouras com ARS, o nitrogênio amoniacal é oxidado pelas bactérias oxidadoras de amônia (como do gênero *Nitrosomonas*) em nitrito e posteriormente é consumido pelas bactérias oxidadoras de nitrito (como as do gênero *Nitrobacter*), produzindo nitrato (ZOPPAS *et al.* 2016; OLIVEIRA, 2012). Portanto, saber a demanda de N pelas culturas que receberão a fertirrigação é de extrema importância, pois do contrário, poderá resultar em perdas significativas de N por lixiviação, e se tornar um contaminante das águas superficiais e até do lençol freático (MINOGUE *et al.* 2012).

Testes expondo sementes de *Brassica Chinensis L.* a lodo de esgoto (composto semelhante a ARS por ser rico em cobre, nitrogênio, fósforo e zinco) e ao resíduo de suinocultura também mostraram que os índices de germinação e crescimento radicular aumentaram conforme as concentrações de metais diminuíram (MIAOMIAO *et al.* 2009). Portanto, esses resultados corroboram com os resultados obtidos no presente estudo, no qual concentrações menores de ARS, como a C3 e C4 utilizadas neste trabalho são melhores para a germinação e crescimento das plantas.

O trabalho de Gerber *et al.* (2017), que avaliaram a fitotoxicidade da água residuária de suinocultura processado pelo biodigestor e do resíduo *in natura*, (sem ser processado extraído de um abatedouro) em sementes de alface (*Lactuca sativa*) e pepino (*Cucumis sativus*) por 48 horas, mostrou que a porcentagem do crescimento das raízes e do índice de germinação nas sementes de ambos foram melhores com a ARS do que com o resíduo *in natura*, embora, somente para o alface os testes apontaram essa significância

estatística. O referido autor aponta fitotoxicidade tanto do resíduo *in natura* quanto da ARS ao considerar o índice de germinação abaixo de 80% e alerta que o ARS não pode ser usado para fins agrícolas na concentração em que se encontrava. Os resultados do trabalho supracitado apontam que a germinação das sementes de alface expostas ao resíduo *in natura* foi significativamente menor quando comparadas com o controle negativo. No entanto, quando se comparou a germinação de sementes de alface no resíduo tratado (ARS) com o grupo controle (expostos a água destilada), não houve diferença significativa na taxa de germinação. Com isso, os autores demonstraram que o resíduo de suinocultura pode ser prejudicial ou não, conforme a composição e concentração.

É importante ressaltar que no presente estudo, após 72 horas de exposição das raízes de alface a C1, não foi possível verificar diferenças significativas no crescimento quando comparada com o controle negativo. Além disso, as sementes expostas aos tratamentos C2, C3 e C4 apresentaram maior crescimento das raízes em comparação com o CN, indicando um possível efeito de hormese, que ocorre quando substâncias tóxicas, em doses menores, estimulam o desenvolvimento vegetal (CALABRESE; BALDWIN, 2002). Nesse sentido, a ARS em concentrações menores, como na C3 e C4 deste estudo promovem maior o crescimento das raízes. Nos indivíduos de *A. cepa* a C4 não apresentou diferenças estatísticas quando comparada com o CN, ou seja, para estes indivíduos a dose mais baixa e o CN provocam o crescimento de forma igual.

No entanto, para *A. cepa* a C1, C2 e C3 provocaram redução significativa no crescimento da raiz (em relação ao CN), o que mostra que a ARS inibe o crescimento radicular da cebola em doses maiores, indicando que o resíduo possa causar danos no DNA (genotoxicidade) e, possivelmente, afeta o processo mitótico, o que representa uma das principais ameaças ao crescimento radicular (QIN *et al.* 2015) .

Os diferentes resultados do crescimento entre *A. cepa* e *L. sativa* apontam que o ARS é mais fitotóxico para o crescimento de *A. cepa*. Arambašić *et al.* (1995), que testaram diferentes metais (Pb, Cu e Zn), fenol e sódio em 3 diferentes espécies (*Allium cepa*, *Lepidium sativum* e *Daphnia magna*) apontou que o Cu foi o promoveu maior inibição do crescimento das raízes de *A. cepa*, mostrando que esta espécie é sensível para testes de poluentes ambientais, principalmente com metais. Além de mostrar também que o Cu é um poluente mais tóxico que o zinco, pois inibiu mais o crescimento das raízes dos indivíduos testados.

O decréscimo significativo do índice mitótico em *A. cepa* indica citotoxicidade, como aponta Marin-Morales *et al.* (2009). Portanto, pode-se inferir que a ARS neste estudo provocou citotoxicidade para *A. cepa*. O IM significativamente inferior que o CN é indicativo de alterações derivadas de ações químicas que afetam o crescimento e o desenvolvimento do organismo exposto, e o IM significativamente maior que o CN aponta a uma proliferação celular desordenada, podendo levar à formação de tecidos tumorais (HOSHINA, 2002). No caso do presente estudo, para *L. sativa* não houve diferenças significativas entre os IM das concentrações utilizadas comparadas com o grupo controle. Mas, para *A. cepa*, C3 e C4 apresentaram um IM significativamente menor que o CN, mostrando que embora a C3 e C4 tenha apresentado melhor crescimento para *L. sativa* e não tenha se diferenciado do CN no crescimento das raízes de *A. cepa*, essas concentrações mesmo sendo em doses menores ainda são citotóxicas e prejudiciais para *A. cepa*. Já as sementes expostas a C1 e C2 podem ter sofrido o efeito inverso, no qual houve uma proliferação celular desordenada já que não houve diferenças significativas entre estas concentrações e o CN. Por fim, a exposição aguda pode não ter sido o suficiente para avaliar este parâmetro, necessitando de uma exposição prolongada para a avaliação melhor do índice mitótico.

Os biomarcadores de genotoxicidade utilizados no presente trabalho apontaram, para *A. cepa*, toxicidade em C1 e C2 em comparação com o CN para aderências cromossômicas. Esses resultados estão de acordo com os estudos de Fiskesjo (1998) com indivíduos de *A. cepa* expostos a diferentes metais (Cu, Ni, Cd, Be, Al, Mn, Li e Hg) mostram a presença marcante de aderências cromossômicas e poucas c-metáfases para cobre, bem como ocorreu neste estudo, além de apontar também o cobre como metal mais tóxico considerando o valor da concentração subletal.

O trabalho de Yildiz *et al.* (2009) com teste de *A. cepa* expostos duas diferentes concentrações de metais pesados (sulfato de cobre e cloreto de cobalto) também apontou a presença de aderências cromossômicas, pontes, perdas e quebras cromossômicas, assim como as encontradas neste presente estudo. Yildiz *et al.* (2009) mostraram, também, que o Cu apresentou maior frequência de alterações cromossômicas entre os dois metais, sendo que as duas doses de Cu foram significativamente genotóxicas quando comparado com o controle negativo e que existe um efeito de dose-dependência para os metais testados, assim como os testes estatísticos deste estudo apontam significância para C1 e C2 com aderências cromossômicas. As doses de Cu utilizadas por Yildiz *et al.* (2009)

foram de 1,5 mg/L e 3 mg/L e embora, esta última seja maior que as doses deste trabalho, a C1 e C2 deste trabalho são as que mais se aproximam destas doses e foram as concentrações em que se observou resultados significativos para aderência cromossômica.

As alterações cromossômicas são provocadas por alterações na estrutura cromossômica ou no número de cromossomos, sendo que alterações na estrutura podem ser causadas por quebras de DNA, inibição da síntese de DNA e/ou modificação na replicação do DNA, indicando um agente clastogênico (quebras cromossômicas e pontes) (SABEEN et al. 2019). Enquanto alterações numéricas são provocadas por segregação anormal dos cromossomos (aneuploidia e poliploidia), indicando um agente aneugênico (aderências, c-metáfases, atrasos e perdas cromossômicas) (SABEEN et al. 2019).

A aderência cromossômica é um reflexo de efeitos altamente tóxicos, geralmente irreversível e que provavelmente leva a morte celular (LIU et al. 1992). Ela pode também levar a formação de pontes cromossômicas por causa da não disjunção dos cromossomos com aderência durante a separação da anáfase (SABEEN et al. 2019).

A genotoxicidade induzida por metais pesados nas células vegetais é um fenômeno complexo, e os mecanismos que desencadeiam esse processo ainda não são bem conhecidos, embora se discuta que o dano induzido no DNA por metais pesados não ocorre de forma direta, mas pela produção desequilibrada de ERO levando a planta a um estresse oxidativo que provoca danos não só ao DNA, mas também a proteínas e lipídios.(SHAHID et al. 2014)

É importante ressaltar também que houve a presença de mais alterações cromossômicas do que anormalidades nucleares, o que indica que o resíduo possui alta genotoxicidade visto que alterações cromossômicas estão, geralmente, associadas com danos no DNA, enquanto anormalidades nucleares, como por exemplo, micronúcleo, geralmente, está associado com danos nos cromossomos e distúrbios no processo mitótico (FERETTI et al. 2007).

Resultados do trabalho de Marcato-Romain (2009) apontaram que a ARS, se comparado com o resíduo *in natura*, possui uma toxicidade aguda menor, confirmando toxicidade para a matéria orgânica em fezes *in natura*, mas que a genotoxicidade do ARS está associada com a presença de Cu e Zn. Portanto, a redução de Cu e Zn na

suplementação alimentar dos porcos seria uma maneira de controlar o impacto ambiental destes compostos (MARCATO et al. 2008).

5.5 CONCLUSÃO

A ARS em modelos vegetais provou-se ser genotóxica e citotóxica através da inibição do crescimento de *A. cepa*, assim como a diminuição do índice mitótico e a formação de alterações cromossômicas. O teste de *A. cepa* também se mostrou sensível para a avaliação da citogenotoxicidade da ARS.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 4, p. 626–631, 2010

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; BOTELHO, C. M.; LAVIOLA, B. G.; PALMIERI, M. J.; PRAÇA-FONTES, M. M. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 1, p. 373–382, 2014

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

BIEL-MAESO, M.; GONZALEZ-GONZALEZ, C.; LARA-MARTIN, P. A.; CORADA-FERNANDEZ, C. Sorption and degradation of contaminants of emerging concern in soils under aerobic and anaerobic conditions. **Science of The Total Environment**, v. 666, p. 662–671, 2019.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Applications of hormesis in toxicology, risk assessment and chemotherapeutics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 7, p. 331-337, 2002.

CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F.; ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; RODRIGUES, G. S. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis in Allelopathic Interactions. **In: Plant Bioassays**. Ed. Houston: Studium Press, 344 p. 2008

CANG, L.; WANG, Y. J.; ZHOU, D. M.; DONG, Y. H. Heavy metals pollution in poultry and livestock feeds and manures under intensive farming in Jiangsu Province, China. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 16, p. 371–374, 2004.

DAO, T. H.; SCHWARTZ, R. C. Mineralizable phosphorus, nitrogen, and carbon relationships in dairy manure at various carbon-to-phosphorus ratios. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3567–3574, 2010.

DOS SANTOS, F. E.; CARVALHO, M. S. S.; SILVEIRA, G. L.; CORREA, F. F.; CARDOSO, M. DAS G.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; VILELA, L. R. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of hydroalcoholic extracts from *Solanum muricatum* Ait. and *Solanum betaceum* Cav. (Solanaceae) in the plant model *Lactuca sativa*. **Environmental Science and Pollution Research**, v.26, n.4, 10.1007/s11356-017-1015-x. 2018.

DRAGOEVA, A. P.; NANOVA, Z. D.; KALCHEVA, V. K. Allelopathic activity of micropropagated *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* and its effect on mitotic activity. **Allelopath Journal**, v. 22 p. 131–142, 2008.

ELEKES, C. C.; DUMITRIU, I.; BUSUIOC, G.; ILIESCU, N. S. The appreciation of mineral element accumulation level in some herbaceous plants species by ICP–AES method. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, n. 6, p. 1230–1236, 2010.

FENG, Z.; ZHU, H.; DENG, Q.; HE, Y.; LI, J.; YIN, J.; GAO, F.; HUANG, R.; LI, T.; Environmental pollution induced by heavy metal(loid)s from pig farming. **Environmental Earth Sciences**, v. 77, p. 77-103, 2018.

FERETTI, D.; ZERBINI, I.; ZANI, C.; CERETTI, E.; MORETTI, M.; MONARCA, S. *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 6, p. 561–572, 2007.

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.

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

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

GERBER, M. D.; LUCIA, T.; CORREA, L.; NETO, J. E. P.; CORREA, É. K. Phytotoxicity of effluents from swine slaughterhouses using lettuce and cucumber seeds as bioindicators. **Science of The Total Environment**, v. 592, p. 86–90, 2017.

GRATÃO, P. L.; ALVES, L. R.; LIMA, L. W. Heavy Metal toxicity and plant productivity: role of metal scavengers. In: SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, A. K.; SUPRASANNA, P. (Orgs) **Plant-Metal Interactions**, 2019. Cap.3, p.49-60

LEME, D. M., MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v.682, n.1, p.71–81. 2009.

LIU, D. H.; JIANG, W. S.; LI, M. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. **Hereditas**, v. 117, p. 23–29. 1992.

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

MARCATO, C. E.; PINELLI, E.; POUÉCH, P.; WINTERTON, P.; GUIRESSE, M. Particle size and metal distributions in anaerobically digested pig slurry. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2340–2348, 2008.

MARCATO-ROMAIN, C. E.; PINELLI, E.; POURRUT, B.; SILVESTRE, J.; GUIRESSE, M. Assessment of the genotoxicity of Cu and Zn in raw and anaerobically digested slurry with the *Vicia faba* micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 672, n. 2, p. 113–118, 2009.

MIAOMIAO, H.; WENHONG, L.; XINQIANG, L.; DONGLEI, W.; GUANGMING, T. Effect of composting process on phytotoxicity and speciation of copper, zinc and lead in sewage sludge and swine manure. **Waste Management**, v. 29, n. 2, p. 590–597, 2009.

MINOGUE, P. J.; OSIECKA, A.; MACKOWIAK, C.; NOWAK, J. Leaching potential with diammonium phosphate and poultry litter fertilization of young pine plantations in the Florida Sandhills. **Southern Journal of Applied Forestry**, v. 36, p. 181-190, 2012.

NATASHA; SHAHID, M.; SALEEM, M.; ANWAR, H.; KHALID, S.; TARIQ, T. Z.; MURTAZA, B.; MUHAMMAD, A.; NAEEM, M. A. A multivariate analysis of comparative effects of heavy metals on cellular biomarkers of phytoremediation using *Brassica oleracea*. **International Journal of Phytoremediation**, v. 22, p. 1–11, 2019.

OLIVEIRA, A.C.G. **Bactérias heterotróficas e autotróficas envolvidas na remoção de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário em reator de leito móvel**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Edificações e Saneamento) Programa de Pós-graduação em Engenharia de Edificações e Saneamento do Centro de Tecnologia e Urbanismo, Universidade Estadual de Londrina, 2012.

QIAN, Y.; SONG, K.; HU, T.; YING, T. Environmental status of livestock and poultry sectors in China under current transformation stage. **Science of The Total Environment**, v. 622-623, p. 702–709, 2018.

ROSCULETE, C.; BONCIU, E.; ROSCULETE, E.; OLARU, L. Determination of the environmental pollution potential of some herbicides by the assessment of cytotoxic and genotoxic effects on *Allium cepa*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 1, 2018.

SABEEN, M.; MAHMOOD, Q.; BHATTI, Z.A., FARIDULLAH, M.I., BILAL, M.; HAYAT, T.; IRSHAD, U.; AKBAR, T.A.; ARSLAN, M.; SHAHID, N. *Allium cepa* assay based comparative study of selected vegetables and the chromosomal aberrations due to heavy metal accumulation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 10.1016/j.sjbs.2019.12.011. 2019.

SARMA, H.; DEKA, S.; DEKA, H.; SAIKIA, R. R. Accumulation of heavy metals in selected medicinal plants. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, p. 63–86. 2011.

SHAHID, M.; POURRUT, B.; DUMAT, C.; NADEEM, M.; ASLAM, M.; PINELLI, E. Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, p.1–44. 2014.

SOUSA, S. M.; SILVA, P. S.; VICCINI, L. F. Cytogenotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemon grass) aqueous extracts in vegetal test systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 2, p. 305–311, 2010.

TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environmental Pollution**, v. 93, n. 3, p. 249–256, 1996.

WONG, M. H. Effects of animal manure composts on tree (*Acacia confisa*) seedling growth. **Agricultural Wastes**, v. 13, p. 261-272, 1985.

WU, X.; COBBINA, S. J.; MAO, G.; XU, H.; ZHANG, Z.; YANG, L. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8244–8259, 2016.

YE, Z. H.; BAKER, A. J. M.; WONG, M. H. Problems in toxicities. In: WONG, H. M.; BRADSHAW, A. D. (Orgs.) **The restoration and management of derelict land**. 2003. cap. 7, p.66-79.

YILDIZ, M.; CİĞERCI, İ. H.; KONUK, M.; FIDAN, A.F.; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v. 75, n. 7, p. 934–938, 2009.

ZOPPAS, F. M.; BERNARDES, A. M.; MENEGUZZI, A. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 29-42, 2016.

6. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos contribuirão como uma importante ferramenta de avaliação dos possíveis riscos ambientais do resíduo acerca do potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico que até o momento eram desconhecidos, além de fornecer informações de concentrações viáveis para o uso do resíduo no meio ambiente como fertilizante, colaborando para possíveis futuras legislações de uso e manejo do resíduo de suinocultura processado pelo biodigestor.

Os resultados do primeiro capítulo em que a ARS se mostrou genotóxica para modelos animais com girinos, se comparados com os resultados do segundo capítulo, pode-se dizer que o teste *A. cepa* apresenta boa correlação com testes para aferir citogenotoxicidade em modelos animais.