

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**VITOR HUGO ENUMO DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E  
ESTRESSE OXIDATIVO DE EFLUENTES DE UMA INDÚSTRIA DE  
PAPEL E CELULOSE DE SANTA CATARINA EM *Allium cepa*.**

Florianópolis

2006

**VITOR HUGO ENUMO DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E  
ESTRESSE OXIDATIVO DE EFLUENTES DE UMA INDÚSTRIA DE  
PAPEL E CELULOSE DE SANTA CATARINA EM *Allium cepa*.**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como  
requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em  
Biotecnologia. Área de concentração: Ambiental.**

**Orientadores: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho**

**Prof. Dr. Carlos Henrique Lemos Soares**

Florianópolis

2006

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, meus grandes exemplos, pelo amor e por apoiarem meus sonhos.

Ao meu irmão e cunhada, por acreditarem na minha capacidade e por torcerem pelo meu sucesso.

Às minhas queridas sobrinhas, pela alegria que sempre me trazem.

Ao professor Danilo Wilhelm Filho, pela orientação e pela amizade.

Ao professor Carlos Henrique Lemos Soares, pela orientação, apoio, paciência e amizade.

À professora Veronica Eliza Pimenta Vicentini, por ter despertado em mim o interesse pela pesquisa científica e por ter-me ensinado muitas outras lições importantes ao longo desses anos.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida e por apoiar a pesquisa no Brasil .

À indústria Klabin/Celucat, por ceder os efluentes.

Às amigas Ivana, Anabelle, Sabrina e Liz, pelo auxílio e pelos momentos de descontração.

Às colegas do Laboratório de Ecofisiologia Respiratória, pelo auxílio nos testes de estresse oxidativo.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Mutagênese da UEM, em especial à Rosinete Gonçalves, pelo auxílio no teste citogenético.

Aos colegas do curso de mestrado em Biotecnologia, pela amizade e apoio.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para meu crescimento pessoal, mesmo que tornando a situação mais difícil, pois me fizeram aprender a lutar e vencer!

Keep The Faith  
Don't Let Nobody Turn You 'Round  
You Gotta Know When It's Good To Go  
To Get Your Dreams  
Up Off The Ground  
Keep The Faith,  
Because It's Just  
A Matter Of Time  
Before Your Confidence Will Win Out  
Believe In Yourself  
No Matter What It's Gon' Take  
You Can Be A Winner  
But You Got  
To Keep The Faith  
And When You Think Of Trust  
Does It Lead You Home  
To A Place That You Only Dream Of  
When You're All Alone  
And You Can Go  
By Feel 'Stead Of Circumstance  
But The Power's In Beliving  
So Give Yourself A Chance  
I Know That You Can Sail Across The Water  
Float Across The Sky, High  
Any Road That You Take  
Will Get You There  
If You Only Try  
So Keep The Faith

M.J.

## RESUMO

Este trabalho apresenta uma avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e do estresse oxidativo do efluente não-tratado e tratado de uma indústria de papel e celulose de Santa Catarina, utilizando células meristemáticas de *Allium cepa*. Para a avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade, as cebolas foram expostas por 0, 24, 72h e recuperação às concentrações de 0, 1, 12, 50 e 100% de ambos efluentes. Após o período de exposição, os meristemas apicais das raízes foram coletados para a avaliação do índice mitótico (IM), índice de fase (IF), frequência de aberrações (FCA) e avaliação de dano ao DNA (Teste Cometa). Já para a avaliação das defesas antioxidantes, os catafilos jovens foram coletados após 24h de exposição aos efluentes nas concentrações de 0,1 e 100% e recuperação, para a determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), lipoperoxidação (TBARS), da atividade das enzimas catalase (CAT) e glutathiona S-transferase (GST). As atividades proliferativas das células expostas ao efluente não-tratado, na concentração e 0,1% mostrou-se significativamente reduzida e nas outras aumentadas, em relação aos próprios controles. Já nas células expostas ao efluente tratado, o menor IM foi observado na concentração de 12%. A fase do ciclo mitótico mais atingida pelo efluente não-tratado foi a prófase e pelo efluente tratado, a metáfase. A FCA foi alta em todos os casos em que as raízes foram expostas por 24 e 72h aos efluentes, nas concentrações de 50 e 100%. As C-metáfases, pontes anafásicas e anáfases desorganizadas foram os tipos de aberrações encontrados. Durante as 24 horas de exposição, houve um aumento de aproximadamente 90%, em relação ao controle, nos níveis de TBARS. Após o período de recuperação, observou-se a redução de aproximadamente 96%, em relação aos períodos de exposição. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada nos níveis de GSH. A atividade da CAT foi alterada nos bulbos expostos por 24h à maior concentração (100%) dos dois efluentes. A atividade da GST apareceu elevada nas duas concentrações do efluente tratado, após 24h de exposição comparando-se ao grupo controle. Em relação ao dano ao DNA, observou-se que o efluente tratado, na concentração de 100%, foi o que apresentou classe de dano maior (classe 2). Os resultados indicam que as células expostas ao efluente não-tratado apresentaram um potencial citotóxico mais elevado do que as expostas ao efluente tratado, porém neste último observou-se uma maior genotoxicidade. Já em relação ao estresse oxidativo, ambos efluentes mostraram um aumento das defesas antioxidantes. Adicionalmente, os biomarcadores utilizados neste estudo constituem uma ferramenta bastante útil na avaliação da toxicidade e dos processos de tratamento empregados pelas indústrias papeleiras.

Palavras-chave: efluente de papel e celulose; biomarcadores; *Allium cepa*; citotoxicidade; genotoxicidade; estresse oxidativo.

## ABSTRACT

This study presents a cytotoxic, genotoxic potential and oxidative stress evaluation of treated and non-treated effluents from a paper mill factory in the state of Santa Catarina, making use of meristematic cells of *Allium cepa*. In order to evaluate cytotoxicity and genotoxicity, the onions were exposed for 0, 24, 72h and recuperation to the concentration of 0,1, 12, 50 e 100% of both effluents. After the exposition period, the meristems from the tip of the roots were collected to the evaluation of the mitotic index (MI), phase index (PI), aberration frequency (AF) and DNA damage evaluation (comet assay). By its time, to evaluate antioxidant defenses, young cataphiles were collected after 24 hours of exposition to the effluents in the concentration of 0,1 and 100% and recuperation, to determine reduced glutathione levels (GSH), lipoperoxidation (TBARS), catalase activities (CAT) and glutathione S-transferase (GST). The cells proliferative activities exposed to non-treated effluent, at 0,1 concentration showed themselves significantly reduced and increased in the others, related to the own controls. On the cells exposed to the treated effluent, by its turn, the shortest MI was observed at 12% concentration. The mitotic cycle phase most affected by the non-treated effluent was prophase and by the treated one was metaphase. The AF was high in all cases in which the roots were exposed for 24 and 72h to the effluents at the concentration of 50 and 100%. C-metaphase, anaphasic bridges and disorganized anaphase were the kind of aberrations found. During 24 hours of exposition, there was an increase of approximately 90%, related to the control, to the TBARS levels. After the recuperation period, it was observed the reduction of approximately 96%, related to the period of exposition. No statically significant difference was observed to the GSH levels. CAT activity was changed in the bulbs which were exposed for 24h at the greatest concentration (100%) of both effluents. GST activity seemed increased at both concentration of treated effluent, compared to the control group after 24h of exposition. About DNA damage, it was observed that the treated effluent, at 100% concentration, was the one that presented the wider damage (class 2). The results indicate that cells exposed to non-treated effluent presented higher cytotoxic potential than the ones exposed to the treated one, although this one presented more genotoxicity. On the other hand, both effluents showed antioxidant defenses increase related to the oxidative stress. Additionally, biomarkers used in this study are very useful tool (device) to evaluate toxicity and the treatment processes applied by the paper mill plants.

Key Words: paper mill effluent; biomarkers; *Allium cepa*; cytotoxicity; genotoxicity; oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Formação de espécies reativas de oxigênio durante a redução do oxigênio à água 26
- Figura 2:** Esquema das reações envolvendo as enzimas SOD e CAT na neutralização das EROs..... 29
- Figura 3:** Índices mitóticos médios (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente não-tratado (NT) por zero, 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo. ....52
- Figura 4:** Índices mitóticos médios (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente tratado (T) por zero, 24 e 72 horas e recuperação (24h). ....54
- Figura 5:** Índices de prófase (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente não-tratado (NT) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo..... 57
- Figura 6:** Índices de metáfase (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente não-tratado (NT) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo..... 57
- Figura 7:** Índices de anáfase (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente não-tratado (NT) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo..... 58
- Figura 8:** Índices de telófase (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente não-tratado (NT) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo..... 59
- Figura 9:** Índices de prófase (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente tratado (T) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h).....61
- Figura 10:** Índices de metáfase (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente tratado (T) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h).....62
- Figura 11:** Índices de anáfase (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente tratado (T) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h).....63
- Figura 12:** Índices de telófase (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente tratado (T) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h).....63
- Figura 13:** Frequências de células aberrantes (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente não tratado (NT) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h).....66
- Figura 14:** Frequências de células aberrantes (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente tratado (T) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h).....67



<b>Figura 15:</b> Índice de peroxidação lipídica (TBARS; nmolg <sup>-1</sup> ) em bulbos de <i>Allium cepa</i> expostos à água não clorada cloro (controle negativo – CO), e aos efluentes não-tratado (NT) e tratado (T), nas concentrações de 0,1 e 100%, após período de 24h e recuperação (24h).....	76
<b>Figura 16:</b> Concentração de GSH (μmolg <sup>-1</sup> ) em bulbos de <i>Allium cepa</i> expostos à água não clorada cloro (controle negativo – CO), e aos efluentes não-tratado (NT) e tratado (T), nas concentrações de 0,1 e 100%, após período de 24h e recuperação (24h).....	77
<b>Figura 17:</b> Atividade enzimática da CAT (mmol de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> consumido min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> ) em bulbos de <i>Allium cepa</i> expostos à água não clorada cloro (controle negativo – CO), e aos efluentes não-tratado (NT) e tratado (T), nas concentrações de 0,1 e 100%, após período de 24h e recuperação (24h).....	78
<b>Figura 18:</b> Atividade enzimática da GST (nmol de CDNB conjugado min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> ) em bulbos de <i>Allium cepa</i> expostos à água não clorada cloro (controle negativo – CO), e aos efluentes não-tratado (NT) e tratado (T), nas concentrações de 0,1 e 100%, após período de 24h e recuperação (24h).....	79
<b>Figura 19:</b> Frequência das diferentes classes de dano de cometas observados células meristemáticas de raiz de <i>Allium cepa</i> expostas à água sem cloro (CO), a 0,1 e 100% do efluente não-tratado e 0,1 e 100% do efluente tratado.....	80



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I:</b> Valores dos parâmetros físico-químicos do efluente da indústria de papel e celulose.....	39
<b>Tabela II:</b> Pontuação e exemplos de cada classe de cometa visualizada.....	49
<b>Tabela III:</b> Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células coletadas previamente (0h) à exposição ao efluente não-tratado (NT) e controle negativo (CO).....	70
<b>Tabela IV:</b> Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células expostas por 24h ao efluente não-tratado (NT) e controle negativo (CO).....	70
<b>Tabela V:</b> Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células expostas por 72h ao efluente não-tratado (NT) e controle negativo (CO).....	71
<b>Tabela VI:</b> Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células expostas à água desclorada por 24 (recuperação) após terem sido expostas ao efluente não-tratado (NT) e controle negativo (CO).....	71
<b>Tabela VII:</b> Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células coletadas previamente (0h) à exposição ao efluente tratado (T) e controle negativo (CO).....	73
<b>Tabela VIII:</b> Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células expostas por 24h ao efluente tratado (T) e controle negativo (CO).....	74
<b>Tabela IX:</b> Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células expostas por 72h ao efluente tratado (T) e controle negativo (CO).....	74
<b>Tabela X:</b> Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células expostas à água desclorada por 24 (recuperação) após terem sido expostas ao efluente não-tratado (NT) e controle negativo (CO).....	75
<b>Tabela XI:</b> Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células expostas à água desclorada por 24 (recuperação) após terem sido expostas ao efluente não-tratado (T) e controle negativo (CO).....	75

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>1.1 Degradação ambiental.....</b>	<b>01</b>
<b>1.2 A indústria de papel e celulose .....</b>	<b>03</b>
<b>1.2.1 Processos de obtenção de celulose e fabricação de papel.....</b>	<b>06</b>
<b>1.2.1.1 Fontes de celulose – Tipos de fibra .....</b>	<b>06</b>
<b>1.2.1.2 Etapas do processo .....</b>	<b>07</b>
<b>1.2.2 Efluente de indústria de papel e celulose.....</b>	<b>09</b>
<b>1.2.2.1 Composição química .....</b>	<b>09</b>
<b>1.2.2.2 Efeitos ambientais .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.2.3 Tratamento de efluentes.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3 Biomonitoramento .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.1 Citotoxicidade e genotoxicidade .....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.2 Estresse oxidativo.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4 Considerações sobre o sistema-teste utilizado .....</b>	<b>31</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 Objetivos gerais .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>36</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Objeto de pesquisa.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2 Efluente industrial .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.1 Variáveis do Efluente da Indústria de Papel e Celulose.....</b>	<b>39</b>
<b>3.3 Protocolo experimental I – Teste citogenético <i>Allium</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3.1 Cultivo e tratamento do organismo-teste .....</b>	<b>40</b>

3.3.2	Preparo das lâminas para análise microscópica .....	41
3.3.4	Análise das lâminas .....	42
3.4	Protocolo experimental II – Estresse oxidativo .....	43
3.4.1	Cultivo e tratamento do organismo-teste .....	43
3.4.2	Preparação das amostras para análise de biomarcadores de estresse oxidativo.....	44
3.4.2.1	Preparação dos homogenatos.....	45
3.4.2.2	Preparação do extrato ácido .....	45
3.4.3	Glutathiona reduzida (GSH) .....	46
3.4.3	Atividade da enzima catalase (CAT).....	46
3.4.4	Atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST).....	47
3.4.5	Avaliação da lipoperoxidação tecidual (TBARS) .....	47
3.5	Protocolo experimental III: avaliação de dano ao DNA (teste cometa).....	48
3.6	Análise estatística.....	50
4	RESULTADOS.....	51
4.1	Índices mitóticos (IM).....	51
4.1.1	Efluente não-tratado (NT) .....	51
4.1.2	Efluente tratado (T) .....	53
4.2	Índices de fases (IF) .....	54
4.2.1	Efluente não-tratado (NT) .....	55
4.2.2	Efluente tratado (T) .....	59
4.3	Frequência de células aberrantes.....	64
4.3.1	Efluente não-tratado (NT) .....	64
4.3.2	Efluente tratado (T) .....	65
4.4	Tipos de aberrações .....	68

4.4.1 Efluente não-tratado (NT) .....	68
4.4.2 Efluente tratado (T) .....	72
4.5 Estresse oxidativo .....	75
4.5.1 Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS).....	75
4.5.2 Glutathiona reduzida (GSH) .....	77
4.5.3 Atividade da enzima catalase (CAT).....	78
4.5.4 Atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST).....	79
4.6 Avaliação de dano ao DNA (Teste Cometa).....	80
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>81</b>
5.1 Organismo-teste .....	81
5.2 Análise do efeito citotóxico (Índice mitótico).....	82
5.3 Análise do efeito genotóxico .....	84
5.4 Índice de fases .....	85
5.5 Frequência de aberrações.....	86
5.6 Tipos de aberrações .....	87
5.8 Estresse oxidativo .....	89
5.9 Danos ao DNA.....	93
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>98</b>
<b>8 ANEXOS.....</b>	<b>119</b>

# **1 - INTRODUÇÃO**

## **1.1 DEGRADAÇÃO AMBIENTAL**

As condições ambientais que reinavam em nosso planeta há alguns bilhões de anos eram diversas das que conhecemos hoje. Permitiram o aparecimento da vida e sua evolução progressiva, sendo que os seres vivos, por sua presença, ajudaram a modificar pouco a pouco o meio. Estas modificações lentas e naturais, hoje são aceleradas devido à interferência do homem, que desencadeia processos de poluição e alterações em seu habitat (Lemos e Terra, 2003).

As atitudes comportamentais do homem, desde que se tornou parte dominante dos sistemas, têm tendência em sentido contrário à manutenção do equilíbrio ambiental. Ele é um esbanjador de energia, desestabiliza as condições de equilíbrio, aumentando suas exigências individuais. Não podendo criar as fontes que satisfazem suas necessidades fora do sistema ecológico, o homem impõe uma pressão cada vez maior sobre o ambiente. Os impactos exercidos pelo homem são de dois tipos: primeiro, o consumo de recursos naturais em ritmo mais acelerado do que aquele no qual eles podem ser renovados pelo sistema natural; segundo, pela geração de produtos residuais em quantidades maiores do que as que podem ser integradas ao ciclo natural de nutrientes. Além desses dois impactos, o homem chega até a introduzir materiais tóxicos no sistema ecológico que tolhem e destroem as forças naturais (AGENDA 21, 1996).

A ação antropogênica tem aumentado igualmente as oscilações do ambiente aquático, permitindo a liberação indiscriminada de agentes poluidores, como agrotóxicos, efluentes

industriais e municipais, substâncias eutrofizantes, etc. (Araújo et al., 2001). A contaminação dos vários ambientes por meio da interferência antrópica, resulta em conseqüências muitas vezes irreversíveis para os biomas que habitam estes ambientes. Para combater este problema, é necessário o conhecimento das causas e efeitos dos poluentes.

A principal característica dos ecossistemas aquáticos é a complexa interação entre os fatores físicos, químicos e biológicos, motivo pelo qual se torna necessário conhecer o relacionamento entre os componentes do sistema para compreender sua resposta a um xenobiótico (Lemos e Terra, 2003).

Com o aumento de estudos que documentam a existência de xenobióticos tóxicos por todo o mundo (Dean et al., 1996; Derosa et al., 1996), e com o aumento da introdução, no ambiente, de agentes químicos fabricados pelo homem, a população e as agências governamentais estão se tornando cada vez mais preocupadas com o impacto de contaminantes ambientais para as populações, principalmente a humana (Au e Ribeiro, 2003).

Existem muitas categorias de classificação das fontes de poluição ou das atividades humanas que alteram a qualidade da água. Dentre elas, temos as atividades industriais, a produção de energia, o transporte, a mineração, a contaminação de aquíferos por atividade agrícola e/ou a atividade humana. Já as substâncias poluidoras são classificadas em diferentes categorias como: ácidos e agentes acidificantes ( $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_n$ ); nutrientes ( $\text{NO}_3^-$ ;  $\text{PO}_4^-$ ); compostos orgânicos degradáveis; metais e metalóides, entre outros (Falkenmark e Allard, 1991).

Durante as últimas três décadas, tem aumentado o interesse da comunidade científica e das agências regulatórias em relação à detecção, conhecimento e controle sobre os agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e à sustentabilidade dos ecossistemas. O crescimento da população humana e de suas atividades associadas com a agricultura, industrialização e comércio são alguns fatores que contribuem para a degradação ambiental,



diminuição da biodiversidade e variabilidade genética, tendo como conseqüência extrema a extinção de muitas espécies. Os impactos causados por agentes tóxicos no ambiente e na saúde humana muitas vezes não podem ser observados e medidos diretamente. A informação obtida nas análises de risco nos permitem estimar e comparar estes impactos (Silva e Fonseca, 2003; Lemos e Terra, 2003).

## **1.2 A INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE**

A produção mundial de celulose está principalmente concentrada em seis países: EUA, Canadá, China, Finlândia, Japão e Suécia, que corresponde a cerca de 75% da produção mundial. O Brasil estava em sétimo lugar no ranking em 2000, embora sua produção seja 10 vezes menor que a dos EUA. A produção e o consumo mundial de papel vêm crescendo na última década a uma taxa média anual de 3,0%. As empresas que atuam no mercado internacional estão cada vez mais preocupadas com o processo produtivo e com o meio ambiente, que constituem exigências cada vez maiores do mercado (Bracelpa, 2000).

O setor emprega exclusivamente madeira extraída de florestas plantadas, conforme critérios de manejo sustentável. As áreas empregadas pela indústria para a plantação de *Pinus* e eucalipto são geralmente áreas já degradadas pelo uso da agricultura e pecuária intensiva.

A produção de papel está bastante concentrada nos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, que respondem por cerca de 83% do volume de papel fabricado no país (Bracelpa, 1998).

Santa Catarina ocupa uma posição privilegiada na produção de quase todos os tipos de papel e na produção de celulose. A Olinkraft Celulose e Papel iniciou suas atividades na Vila

Igaras, do município de Otacílio Costa, hoje com o nome de Klabin/Igaras Papéis e Embalagens. Para Rotta (2000), já na década de 60, foi a preocupação com a produção florestal que levou o Grupo Klabin a instalar uma fábrica em Santa Catarina, próxima a áreas de propriedades do Grupo, nas quais já praticavam reflorestamento. A fábrica na época foi denominada Papel e Celulose Catarinense S.A. (PCC), e iniciou suas atividades produtivas em 1969. Com o decorrer dos anos sua denominação foi alterada para Celucat S.A e atualmente para Klabin Fabricadora de Papel e Celulose S.A (KFPC), localizada no município de Correia Pinto (Leão, 2001) (ANEXO A).

A produção de papel está bastante concentrada nos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, que respondem por cerca de 83% do volume de papel fabricado no país (Bracelpa, 1998).

Santa Catarina ocupa a terceira posição de maior produtor de papel e celulose do país, destacando-se por ser o maior produtor nacional de fibra longa, sendo responsável por cerca de 48% da produção nacional deste produto (Leão, 2001).

As indústrias de papel e celulose estão instaladas há anos no Estado de Santa Catarina e são extremamente prejudiciais ao ambiente aquático, apesar do tratamento de seus efluentes, causando grande impacto no Estado (Wilhelm Filho et al., 1997).

Os efluentes de papel e celulose contêm cerca de 300 compostos químicos diferentes, muitos dos quais são mutagênicos e clastogênicos. A madeira, principal material usado nesse segmento industrial, é composta de fibras de celulose, carboidratos (amido e açúcares), bem como lignina, que atua como uma substância adesiva nas fibras de celulose (Thompson et al, 2001).

O processamento da madeira até a manufatura do papel requer muitas substâncias químicas, utilizadas principalmente para separar a celulose da matéria não celulósica (polpação) e para o branqueamento, quando for o caso, do papel. A adição de tintas,

preservativos e materiais de cobertura pode ocorrer em alguns pontos do processo (Houk, 1992).

Os efluentes de papel e celulose gerados causariam um considerável dano aos corpos receptores de água, se fossem despejados sem tratamento, pois os mesmos têm uma alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), compostos sulfurosos, furanos, dioxinas e derivados clorados, clorofenóis, cloroligninas, sólidos suspensos, ácidos graxos, taninos, resinas ácidas, etc. A lignina e derivados constituem uma das principais frações dos compostos responsáveis pela coloração escura e efeitos tóxicos dos mesmos. Dioxinas e furanos são elementos recalcitrantes, apresentando grande resistência à degradação biológica e química, que, associada à natureza hidrófoba dos mesmos, potencializa os efeitos tóxicos via bioacumulação (Sreekrishnan, 2001; Soares e Mosimann, 2000).

A produção de polpa branqueada é uma das mais problemáticas em termos de toxicidade ao meio ambiente, pois a remoção da lignina residual de polpa é realizada em vários estágios, utilizando vários agentes químicos, como o tratamento com cloro molecular ( $\text{Cl}_2$ ), que promovem reações de substituição e geram derivados clorados, como organoclorados.

Segundo Soares (1998) os processos convencionais de branqueamento geram efluentes com altos conteúdos de cloro, não sendo possível operar esta fase em um sistema fechado, como na fase de polpação. Este efluente, após tratamento, é liberado para o meio ambiente, constituindo um grande problema para as indústrias de papel e celulose.

## **1.2.1. Processos de obtenção de celulose e fabricação de papel**

### **1.2.1.1. Fontes de Celulose - Tipos de Fibra**

A madeira usada para a fabricação de papel é a mais importante matéria-prima de toda a cadeia produtiva. Ela vem de florestas bem planejadas, onde muitas árvores são plantadas, para garantir o desenvolvimento sustentado. Estudos feitos por técnicos e cientistas, ao longo de vários anos, demonstraram que a produção de celulose e papel é inviável a partir da madeira de florestas nativas, e que papéis fabricados a partir de florestas plantadas de eucalipto e *Pinus*, resultam em produtos com alta qualidade e produtividade (Cherubin, 1999)

A celulose é uma substância natural existente nos vegetais, de onde é extraída, podendo ser encontrada nas raízes, troncos, folhas, frutos e sementes. É um dos principais componentes das células vegetais que, por ter forma alongada e de pequeno diâmetro, é freqüentemente chamada de “fibra”. Os outros componentes também são encontrados, entre os principais, estão a lignina e a hemicelulose.

A preparação da pasta celulósica para papéis ou outros fins (pasta solúvel para a produção de celofane, rayon, etc.) consiste na separação da lignina das fibras dos demais componentes a qual atua como um cimento, ligando as células entre si, o que proporciona rigidez à madeira. A quase totalidade das pastas de celulose é obtida a partir da madeira, sendo uma pequena parte derivada de outras fontes como sisal, linho, algodão, bambu, bagaço da cana etc. Existem, portanto, muitas fontes diferentes e processos distintos de preparação de pastas celulósicas produzindo, conseqüentemente, pastas com características diversas (Cherubin, 1999).

Alguns tipos de madeira como pinho, araucária, abeto, entre outros, possuem fibras longas (3 a 5 mm), enquanto que as do eucalipto, álamo, carvalho, gomelina etc., possuem fibras mais curtas e finas (0,8 a 1,2 mm). As madeiras integrantes do primeiro grupo são denominadas coníferas ou *softwood* (madeira macia), enquanto que as do segundo, são conhecidas por folhosas ou *hardwood* (madeira dura) (Cherubin, 1999).

O terceiro grupo de celulose cujas fibras não são obtidas da madeira, consiste no algodão (semente), linho, juta, kenaf, cânhamo, rami, crotalária (caule), sisal, fórmio e pita. As fibras extraídas são muito longas e, por isso mesmo, denominadas “fibras têxteis”, amplamente utilizadas na indústria de tecelagem. Ainda dentro deste grupo, porém com fibras de menor comprimento, tem-se o bambu e o bagaço-de-cana.

#### **1.2.1.2. Etapas do processo**

A fabricação do papel envolve cinco passos básicos (Sreerkrishnan, 2001), e cada passo pode variar de acordo com a indústria e o tipo de processo adotado. Então, o efluente final aerado é uma combinação dos efluentes das várias etapas envolvidas nos seus processos unitários:

1. Picagem: converte as árvores em pequenas peças chamadas cavacos e remove a casca da planta. Neste passo, os materiais usados são todos naturais. Estes materiais resultam na transferência de poluentes como taninos e resinas ácidas para a água, por exemplo. Madeiras mais macias possuem uma quantidade maior de resinas ácidas que madeiras duras.
2. Polpação: transforma os cavacos em polpa de celulose. Este processo remove a maioria da lignina e hemicelulose presente no material bruto, resultando em uma polpa rica em celulose.

A polpação pode ser efetuada por diversos métodos, como polpação mecânica, semiquímica, Kraft, polpação por sulfito, etc. O material bruto e a natureza final do papel ou celulose requeridos é que indicam o melhor método a ser empregado. Nesta etapa acontece a transferência de ácidos graxos de cadeia longa e resinas para a água (licor de polpação), além de carboidratos e da própria lignina, ou na verdade, seus produtos de oxidação.

3. Branqueamento: é necessário para retirar a cor amarelada da polpa de celulose. Diversos agentes são utilizados para o branqueamento da polpa, incluindo o cloro, dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, ozônio, oxigênio, etc. Estes podem ser utilizados sozinhos ou em conjunto para um branqueamento mais eficiente. O cloro empregado no branqueamento acaba reagindo com as ligninas e outros, propiciando a formação de compostos clorados de alta toxicidade (Neto, 2002).

Todas as metodologias alternativas de branqueamento estão inseridas em uma das duas linhas tecnológicas que consolidam a “filosofia” atual de produção de polpas com menor impacto ambiental, sendo elas genericamente denominadas ECF, “Elemental Chlorine-Free”, ou seja, a produção de polpas branqueadas sem a utilização de cloro molecular e TCF, “Totally Chlorine-Free”, produção de polpas sem o uso de qualquer forma de cloro. Polpas ECF já são efetivamente produzidas, ao passo que a produção de polpas TCF ainda é minoritária, sendo que a produção mundial de ECF e TCF combinadas, foi estimada em 28 milhões de toneladas, das quais aproximadamente 85% são tipo ECF (Soares, 1998).

4. Lavagem: remove os reagentes de branqueamento da polpa. Geralmente um álcali (soda cáustica) é usado para extrair a cor e agentes de branqueamento da polpa. Este processo é conhecido como estágio de extração alcalina.

5. Papel e produtos de papel: é a fase final de produção pela mistura da polpa lavada com cargas apropriadas (argila, dióxido de titânio, carbonato de cálcio) e agentes para melhorar a qualidade e resistência do papel (amido, rosin) (Neto, 2002).

## **1.2.2 Efluente de indústria de papel e celulose**

A quantidade e a composição química dos efluentes varia em função das condições do branqueamento, do tipo de madeira utilizada, seqüência e concentração de agentes químicos empregados, entre outros fatores. A complexidade e diversidade de estruturas químicas presentes nestes efluentes ficam evidentes pelas reações do branqueamento, que consomem consideráveis quantidades de cloro e produz uma enorme variedade e quantidade de substâncias organocloradas (Soares, 2004).

### **1.2.2.1. Composição Química**

Dentre as centenas de substâncias químicas diferentes identificadas em efluentes da fase de branqueamento, a lignina de baixa massa molecular e seus produtos de degradação parcial, tais como clorolignina, clorofenóis, ácidos carboxílicos aromáticos, clorados e não clorados, constituem quantitativamente os principais componentes. Além destes também resinas ácidas, clorofórmio, metanol, açúcares, açúcares ácidos, ácidos carboxílicos não aromáticos e derivados clorados, dentre outros, estão presentes.

A distribuição de massas moleculares (MM) também é bastante heterogênea. As frações de alta-MM detêm o maior percentual do cloro total (organoclorados) presente nestes efluentes, além de serem as grandes responsáveis pela coloração escura dos mesmos.

Com relação aos efluentes de processos de branqueamento tipo ECF e TCF, o número de estudos sobre as características destes efluentes é bem reduzido, particularmente com relação à sua composição química. Os dados disponíveis indicam que o processo de produção

de polpas tipo ECF produz não apenas uma menor quantidade de clorofenóis totais, mas, particularmente, também menor quantidade de policlorofenóis, ou seja, fenóis com três ou mais átomos de cloro.

Do ponto de vista ambiental, este fato é bastante relevante, considerando que a toxicidade de clorofenóis parece aumentar com o número de átomos de cloro substituintes. Adicionalmente, os halogenados orgânicos medidos como AOX, gerados em processos tipo ECF, são mais facilmente eliminados durante tratamento biológico do que os gerados em processos convencionais. A coloração escura do efluente é bem menos intensa que a de processos convencionais (Soares, 1998).

#### **1.2.2.2. Efeitos Ambientais.**

Nas últimas 3 décadas, um grande volume da literatura científica tem documentado o impacto do efluente de papel e celulose na biota aquática. Um dos principais conceitos é o impacto potencial na fisiologia reprodutiva da biota, particularmente em peixes expostos a este tipo de efluente (Van den Heuvel, 2002).

Impactos sobre a reprodução têm sido observados em peixes, incluindo a redução no tamanho das gônadas (Munkitrick et al., 1992; Gagnon et al., 1994, 1995; Janz et al., 1997), alteração nas características sexuais, diminuição na biossíntese dos hormônios esteróides (McMaster et al., 1996; Borton et al., 1997; Zunino e Soares, 2004). Em outros estudos realizados por Soares e colaboradores (2000), observou-se um decréscimo progressivo de hematócrito e hemoglobina, aumento da glicose plasmática e alterações histopatológicas em tilápias expostas aos efluentes da indústria papeleira.



Os organoclorados presentes em efluentes de indústrias tipo Kraft, empregando cloro ou dióxido de cloro no processo de branqueamento, tornou-se uma questão preocupante devido à sua baixa degradação biológica, à sua toxicidade para espécies aquáticas, genotoxicidade, e potencial para acumular em uma variedade de organismos (Sponza, 2003).

Reconhecendo este risco potencial, a WHO, a USEPA, e o Ministério de Saúde e Bem Estar do Japão, iniciaram o controle sobre os níveis de organoclorados, como tem sido adotado por outros países. Foi percebido que a toxicidade não é restrita apenas aos ecossistemas aquáticos; na verdade, algumas substâncias tóxicas presentes nos efluentes de papel e celulose também fizeram ultimamente uma aparição em produtos de papel, tais como filtros de café, copos e pratos de papel e tecidos faciais (Sreekrishnan, 2001).

O mais recente desenvolvimento no processo tecnológico, particularmente a introdução do branqueamento “elemental chlorine free” (ECF) e o tratamento do efluente na indústria de papel e celulose finlandesa, tem significativamente diminuído os impactos ambientais nos ecossistemas receptores de água. Também no sul do Lago Saimaa, Finlândia, afetado pela indústria de papel e celulose desde 1897, a quantidade de nutrientes e compostos químicos descarregados pelo efluente da indústria diminuiu significativamente durante o ano de 1990. Os resultados daquela pesquisa foram relacionados com as análises bioquímicas e fisiológicas realizadas em comunidade de peixes expostos ao efluente antes da introdução do branqueamento tipo ECF na indústria. Além de uma baixa toxicidade, houve uma redução na eutrofização do lago (Karels, 2002).

Um estudo realizado no Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica da UFSC, avaliou o potencial da alga *Scenedesmus subspicatus* como bioindicador da toxicidade de efluentes de papel e celulose. Os resultados obtidos demonstraram que o efluente potencializou o crescimento da alga quando presentes em concentrações até 25%. Acima deste valor, o efeito foi reduzido proporcionalmente ao aumento da concentração de efluente. (Paiva, 2004).

### **1.2.2.3. Tratamento de efluentes**

Uma abordagem alternativa é tratar os efluentes a tal ponto que a água residuária gerada pode ser reutilizada dentro da própria indústria. De fato, o conceito de efluente líquido zero tem sido sugerido por indústrias que fazem certos tipos de papel.

O processo de tratamento principal utilizado na indústria de papel e celulose é geralmente de natureza biológica. Processos de tratamento terciários posteriores ou de remoção de cor são raros no momento, mas podem se tornar comuns no futuro se a legislação se tornar mais restrigente.

### **Clarificação primária**

Clarificação primária pode ser conseguida por sedimentação ou flotação. Dentro das indústrias de papel do Reino Unido, a sedimentação foi a opção preferida. Esta unidade remove uma alta quantidade de sólidos suspensos, em uma média maior que 80%. Flotação por ar dissolvido é um processo para a remoção de sólidos suspensos e tem sido utilizado em muitos processos de tratamento de efluentes, como um pré-tratamento, anterior ao tratamento biológico aeróbio (Fonseca et al., 2003).

## **Tratamento secundário**

### **Tratamento aeróbio**

Lagoa de aeração é sem dúvida o método mais utilizado. Este processo requer uma grande área, um tempo de retenção ou permanência em torno de 7 dias, e um custo de implantação relativamente alto, especialmente em função da energia gasta pelos aeradores mecânicos.

Como um processo aeróbio, o seu principal objetivo é a redução da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), exibindo taxas de 55-80%, além de estabilizar ou minimizar as variações das características dos efluentes, decorrentes do uso alternativo de diferentes tipos de madeira. Promove a remoção de substâncias organocloradas totais em cerca de 25%, sendo que, particularmente alguns organoclorados, como tri e dicloroacético e alguns clorofenóis, são reduzidos em até 90%. Como estas substâncias são eliminadas por volatilização, a eficiência do processo depende do clima do local, sendo que em épocas ou regiões de baixas temperaturas, esta é reduzida consideravelmente. Por outro lado, ocorre a concentração de substâncias de altas massas moleculares e a cor do efluente não é reduzida. Correntemente, aproximadamente 40 de 100 indústrias no Reino Unido usam tratamento biológico secundário. São numerosos os sistemas de tratamento, sendo o mais comum o processo de lodo ativado, onde pode ocorrer uma remoção eficiente das concentrações de DBO e DQO (demanda química e oxigênio) do efluente (de 0,07 a 0,21 Kg DBO/KG), valores estes, similares aos valores reportados por Saunamaki (1997) para indústria de papel na Finlândia.

Argumenta-se que o principal fator responsável pela remoção de substâncias cloradas é a adsorção destas substâncias, pela elevada quantidade de biomassa produzida por este processo, que, ao ser retirada do sistema, arrasta-as consigo. Evidentemente, este processo de lodo ativado gera um volume muito alto de resíduos sólidos, os quais devem ser tratados adequadamente para evitar que os organoclorados adsorvidos não sejam novamente disseminados no ambiente. Este processo também é ineficiente para remover as substâncias de alta massa molecular.

### **Tratamento anaeróbio**

Digestão anaeróbia é um processo freqüentemente empregado para o tratamento secundário de efluentes industriais, apesar do investimento nesta tecnologia estar aumentado, ela não é utilizada tão largamente quanto o processo de lodo ativado pela indústria de papel e celulose (Thompson, 2001).

Este processo tem muitas vantagens em comparação ao tratamento aeróbio, tais como baixa produção de lodo, baixo consumo químico, pouco requerimento de terra devido a exigência de poucos reatores e produção de energia em forma de metano. Dados de remoção de DQO para o tratamento de efluentes de indústrias mostram que a remoção de 80% pode ser alcançada e que o efluente tratado tem uma concentração de DQO de aproximadamente 800 mg/L. Esta concentração significa que alguma forma adicional de tratamento é requerida.

O alto teor de enxofre de efluente de papel e celulose indica que o tratamento anaeróbio não poderia constituir uma opção de tratamento devido à potencial produção de sulfeto de hidrogênio (Thompson, 2001).

Apesar da utilização do processo de lodo ativado ser o processo mais comum de tratamento, há várias desvantagens com este processo. A produção de lodo, com propriedades de sedimentação variáveis, é sensível para a toxicidade, sendo que a capacidade de remover substâncias tóxicas biodegradáveis é limitada.

### **Tratamento terciário**

O tratamento terciário tem sido empregado até o momento em poucos efluentes industriais, especialmente os processos de ultrafiltração e o uso de membranas. Este processo é realizado com separação sob pressão, baseado na permeabilidade seletiva da membrana, o qual pode servir como uma clarificação secundária como o passo de separação final de líquidos e sólidos.

Vários processos físico-químicos têm sido desenvolvidos para remover uma variedade de materiais tóxicos de efluente de papel e celulose e para reduzir parâmetros como cor e DQO. As indústrias incluem ozonização e adsorção, freqüentemente em combinação com a coagulação, a qual é usada como um estágio de pré-tratamento (Houk, 1992).

A indústria de Papel e Celulose Braviken, na Suécia, utilizou a opção de tratamento terciário, que mostrou uma concentração final de DQO menor que 100mg/L (Thoren et al., 1997).

Com base nos dados e considerações realizadas acima, pode-se dizer que, em que pese o grande esforço que tem sido feito em nível mundial, no sentido de otimizar as tecnologias existentes para a produção de polpas, visando eliminar ou minimizar a utilização de cloro e a conseqüente produção de compostos poluentes, ainda hoje, os efeitos de poluição decorrentes

da produção de polpas celulósicas, embora atenuados, continuam sendo um problema a ser estudado e debatido, inclusive em nível de legislação. Por outro lado, é oportuno dizer ainda que, a despeito da tendência observada em nível mundial, a utilização de cloro, especialmente  $\text{Cl}_2$ , continua sendo preponderante no Brasil.

### **1.3 BIOMONITORAMENTO**

A preocupação com o meio ambiente intensificou a procura por meios de monitoramento ambientais mais rápidos e eficientes. Ao focar apenas a análise química dos níveis de poluentes na água ou no sedimento, os métodos radiccionais forneciam pouco ou nenhum indício do efeito dos poluentes na fauna e flora, pois tais procedimentos não levam em conta as alterações sofridas pelo organismo em relação às mudanças químicas no meio (Goldfarb et al., 1998).

Os processos de avaliação de risco ambiental utilizam os bioindicadores na avaliação do risco ecológico e dos biomarcadores na avaliação do risco à saúde dos seres vivos; ambos são utilizados em conjunto para avaliar os riscos ecológicos em populações humanas e ecossistemas em diferentes níveis organizacionais. Entende-se como bioindicadores medidas que incluem todos os níveis de organização ecológica; desde uma espécie até as populações de um ecossistema. Já os biomarcadores incluem qualquer medida que reflita a interação entre um agente estressor e organismo (Hacon, 2003).

Sendo assim, estabeleceu-se o uso do termo biomarcador para qualquer resposta biológica que possa ser medida “dentro” do organismo (atividade enzimática) ou em seus

produtos (urina, fezes etc.); por outro lado, ficou estabelecido que o termo bioindicador seria definido como as informações tiradas de um organismo que revelam as condições ambientais medidas no seu habitat natural (Van Der Oost et al, 2003).

Atualmente, o termo biomarcador pode ser definido como “qualquer resposta biológica correspondente a uma exposição, *efeito, ou susceptibilidade dos indivíduos aos agentes químicos e/ou estressores ambientais*” (Hacon, 2003, Van Der Oost et al, 2003).

Estas medidas geram respostas funcionais, fisiológicas, bioquímicas em nível celular ou de interação molecular. Baseado nesta definição estabeleceu-se três classes de biomarcadores:

- *Biomarcadores de exposição* – capaz de detectar a presença de um xenobiótico, seu metabólito ou a interação do xenobiótico com algumas moléculas ou células alvo através das características farmacodinâmicas e físicoquímicas do composto no organismo (Schlenk, 1999, Van Der Oost et al,2003).

- *Biomarcadores de efeito* – incluem respostas observadas ao nível molecular (bioquímico, fisiológico e histológico) que podem ser relacionadas com o observado no nível ecológico (Schlenk, 1999).

- *Biomarcadores de susceptibilidade* – indicam a habilidade adquirida por certo organismo para responder a mudanças de exposição a um dado xenobiótico, seja por fatores genéticos (mutação) ou bioquímicos (alteram a susceptibilidade do organismo) (DEN BESTEN, 1998, Schlenk, 1999, Van Der Oost et al, 2003).

No contexto ambiental, os biomarcadores são indicadores sensíveis e capazes de demonstrar a presença de um xenobiótico no organismo. O biomarcador mais utilizado é o biomarcador de exposição, e os efeitos vão refletir a consequência da distribuição de um xenobiótico ou seu metabólito no organismo (Stegeman et al., 1992).

Muitos tipos de organismos são utilizados como bioindicadores para avaliar possíveis efeitos de riscos naturais ou de origem antropogênica. Em ambientes aquáticos, moluscos,

organismos bentônicos, esponjas, anfíbios e peixes têm sido utilizados como biomonitores de toxicidade de poluentes. Plantas, particularmente a *Allium cepa*, *Vicia faba* e *Tradescantia*, têm sido utilizadas para avaliação da poluição presente, tanto na água quanto na atmosfera. Espécies de mamíferos vivendo próximos ao homem também têm sido usados como bioindicadores (Silva et al., 2003c).

O conceito básico que sustenta a utilização de biomarcadores de poluição ambiental se baseia no fato de que os distúrbios causados por xenobióticos no meio ambiente levam inicialmente a uma perturbação comportamental, fisiológica, bioquímica ou estrutural em um determinado organismo. Se estas alterações forem observadas com uma certa antecedência, pode ser possível identificar problemas ambientais antes que o ecossistema aquático seja afetado como um todo (Jimenez e Stegeman, 1990).

O uso de bioensaios tem focado em maior extensão a toxicidade aguda. Desta forma, a toxicidade aguda representa, de acordo com os diversos autores levantados por White et al. (1996), o primeiro nível do impacto no ecossistema aquático. Os autores expõem que está bem estabelecido que muitas descargas industriais contêm uma gama de substâncias que podem não ter efeito agudo, mas que são capazes de reduzir, a longo prazo, a sobrevivência de um organismo via danos no genoma de células somáticas e germinativas. Tais danos genéticos têm sido relacionados a desordens genéticas hereditárias e ao câncer.

O risco de algumas descargas de águas residuais deve ser determinado, segundo White e Rasmussem (1996), pela sua carga, a qual pode ser vista como produto da potência genotóxica pela taxa de descarga.

Os testes de toxicidade apresentaram grandes avanços técnicos nas últimas décadas, quando aumentou significativamente o interesse da comunidade científica e dos governantes pelos efeitos causados por estes diferentes poluentes liberados nos ecossistemas naturais. Conseqüentemente, houve a padronização de espécies e o desenvolvimento de vários testes



padrões adotados mundialmente, com o objetivo de viabilizar eventuais comparações entre os diferentes poluentes, nos testes e nos próprios ecossistemas.

O uso de bioindicadores, como macrófitas aquáticas ou plantas terrestres, tem sido preferencial no biomonitoramento de poluição e estudos ecotoxicológicos. Danos nos cromossomos podem ser avaliados com o uso de fungos, plantas e células de mamíferos (Houk, 1992).

Ao revisar a literatura, Smaka-Kincl et al. (1996) enfatizaram que o nível de poluição, ou qualidade da água natural de superfície ou de profundidade e de águas de despejo, é determinada por análises físico/química, saprobiológica, radiológica e, mais recentemente, também por análises citogenética e genotóxica. Testes citogenéticos são adequados para a identificação de efeitos deletérios de substâncias particularmente conhecidas em várias concentrações sobre diferentes tempos de exposição e para a avaliação de sua influência nos organismos. Estes testes também permitem compreensão dos efeitos deletérios nos organismos-teste e são comumente usados em biomonitoramento da extensão da poluição, bem como para avaliação dos efeitos combinados de todas as substâncias tóxicas e mutagênicas sobre os organismos no ambiente natural. Testes biológicos para a toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para a avaliação de reações de organismos vivos à poluição ambiental complexa e para uma indicação dos efeitos sinérgicos potenciais de vários poluentes, enquanto análises físico/químicas identificam a presença de respectivas concentrações de diferentes poluentes.

Avaliar a exposição ambiental potencial a produtos químicos é de suprema importância para prevenir possíveis riscos por eles impostos à sobrevivência, desenvolvimento, reprodução e evolução dos organismos vivos. No entanto, as situações de aplicação e lançamento direto de substâncias químicas no ambiente (estressores químicos ambientais ou poluição química ambiental) também são dignas de preocupação, pelas mesmas razões já

citadas, além da possibilidade da participação de organismos contaminados na cadeia alimentar onde o homem seja um possível consumidor (Bueno, 1997).

Alguns efeitos provocados pela ação de estressores químicos sobre as populações, tais como alteração da produção primária, aumento da frequência de doenças e redução da diversidade, foram discutidos por Gray (1989). Este autor salientou que métodos que possibilitem a detecção dos efeitos de estressores químicos ambientais devem ser os selecionados na avaliação de áreas supostamente contaminadas, afim de evitar o agravamento da contaminação e suas conseqüências indesejáveis.

### **1.3.1 CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE**

Todos os organismos vivos estão em interação com o meio ambiente. Assim, o seu genoma fica exposto às interferências que esse meio sofre. A interação entre o meio e o organismo resulta em modificações que, quando positivas, refletem na adaptação do organismo quanto à melhor exploração desse meio, o que decorre também na própria modificação do ambiente pelo organismo (Minissi e Lombi, 1997; Pascalicchio, 2002).

As lesões no DNA podem ser induzidas por agentes químicos, provenientes do meio ambiente ou resultantes de reações químicas que ocorrem nas próprias células, ou ainda por radiações, tais como a luz ultravioleta (UV) e raios-X. Estas modificações na estrutura do DNA são prejudiciais às células, uma vez que podem prejudicar processos vitais, tais como a duplicação do DNA e a transcrição gênica. Elas também podem causar mutações e aberrações cromossômicas, fenômenos estes que podem levar ao desenvolvimento de processos

cancerosos e morte celular. Pelo fato de causarem lesões no material genético e potencialmente gerarem tumores em seres vivos, esses agentes são normalmente conhecidos como genotóxicos ou carcinogênicos. A presença de produtos químicos carcinógenos no meio ambiente vem sofrendo um crescente aumento, devido à atividade humana, tanto rural e industrial, quanto urbana. A detecção destes produtos e seus prováveis efeitos nos organismos é importante no estudo do impacto que eles podem trazer às populações animal, vegetal e humana (Costa e Menk, 2000).

Mutação é toda alteração do material genético de uma célula que não resulta de segregação ou recombinação. O processo quando não é letal para a célula pode propagar-se pelo organismo em crescimento caracterizando uma mutação somática, ou transmitir-se às gerações posteriores caracterizando uma mutação germinativa. As que ocorrem nas células somáticas acarretam maior prejuízo para os próprios indivíduos que as sofrem. Nos adultos, se atingirem células em divisão, podem causar tumores e outras lesões degenerativas e eventualmente, dependendo do tipo de dano, poderão acarretar a diminuição da fertilidade, e, se atingirem as células germinativas primordiais, que originarão os gametas do indivíduo, as mutações poderão ser transmitidas às futuras gerações (Borges-Osório e Robinson, 1993; Larini, 1999).

Os estudos dos processos pelos quais as células são mutadas, tanto espontaneamente como por agentes ambientais, datam do início do século XX. A importância desses eventos para a saúde e bem-estar da espécie humana tornou-se evidente com a descoberta de que danos genéticos podiam ser induzidos por raios-X, gás mostarda e vários outros agentes físicos e químicos. Os resultados dessas pesquisas coincidiram com uma época na qual a comunidade científica procurava entender quais os grupos de agentes, presentes no ambiente, que poderiam causar danos genéticos, e se essas alterações poderiam, eventualmente, causar efeitos adversos à saúde humana. Além disso, foram levantadas questões a respeito das

relações entre mutágenos e carcinógenos, bem como as relacionadas aos efeitos mutagênicos em células germinativas. Para entender esses desafios, começaram então a ser desenvolvidos uma série de bioensaios toxicogenéticos, desde os mais simples aos mais sofisticados (Ribeiro et al., 2003).

A mutagênese ambiental alcançou uma atenção mais ampla quando a pesquisa em mutagênese tornou-se um assunto altamente relevante, com a publicação da revista *Mutation Research*, em 1964, e quando os geneticistas que trabalhavam com os efeitos da radiação ionizante e de agentes químicos fundaram, em 1969, a Sociedade Americana de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, além de outras Sociedades espalhadas pelo mundo. No Brasil, a SBMCTA – Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental – foi criada em 1989. As atividades dessas Organizações e o crescimento rápido e extensivo da literatura científica relacionada à mutagênese ambiental, despertaram os governos para o perigo em potencial dos agentes mutagênicos para a população humana e para a biosfera. A necessidade de ir em frente no reconhecimento e na regulação de agentes mutagênicos ambientais foi considerada urgente, em função do acúmulo de dados que sugerem que a mutagenicidade é um prognóstico razoável para a carcinogenicidade. Assim, no início dos anos 80, os órgãos de saúde pública e as agências ambientais, em vários países industrializados, acrescentaram a mutagenicidade à lista de das propriedades tóxicas a serem avaliadas (Ribeiro et al., 2003).

Os agentes mutagênicos são substâncias que induzem alterações na molécula de DNA, que podem ser corrigidas pelo próprio mecanismo de reparo das células. Alterações não reparadas, ou reparadas erroneamente, originam mutações de ponto e/ou cromossômicas (Connor e Ferguson, 1993). As alterações cromossômicas, tais como quebras e “gaps”, são normalmente visualizadas em cromossomos metafásicos. As quebras podem ser simples ou

aos pares, e as pontes cromossômicas podem ser simples ou duplas (Natarajan e Obe, 1982; Pavlica et al., 2000; Matsumoto et al., 2004).

A maioria das substâncias químicas com potencial genotóxico é capaz de alterar o material genético em todas as fases do ciclo celular, porém, para se fixarem como alterações cromossômicas, necessitam de mecanismo de replicação do DNA, acontecido após a ocorrência dessas alterações (Obe et al., 1982).

Existem 3 níveis de mutações, as mutações gênicas, as aberrações cromossômicas estruturais como as deleções, duplicações, inversões e translocações e aberrações cromossômicas em número, como as aneuploidias e euploidias, que contribuem para o grande número de abortos, morte pré-natal e nascimento de indivíduos com anormalidades estruturais, fisiológicas e mentais (Kirsch-Volders et al., 2002). As aberrações cromossômicas estão intimamente relacionadas a doenças como neoplasia, na qual se verifica uma correlação positiva entre a frequência de aberrações cromossômicas nos linfócitos e o desenvolvimento do câncer e, com cerca de 50% dos abortos espontâneos, os quais apresentam algum tipo de aberração cromossômica (Natarajan, 2002).

Uma das conseqüências biológicas da exposição às radiações ionizantes ou aos agentes químicos genotóxicos é a indução de aberrações cromossômicas, que são consideradas importantes biomarcadores de exposição (Natarajan, 2002; Obe et al., 2002). Estas representam a parte visível de um grande espectro de alterações no DNA, resultantes da atuação de diferentes mecanismos de reparação das quebras nas cadeias do DNA (Obe et al., 2002). As quebras nas cadeias duplas do DNA são as lesões primárias fundamentais para a formação de aberrações cromossômicas; estas podem ser induzidas, ou podem ocorrer espontaneamente, sendo que os mecanismos de reparação dessas lesões em células eucarióticas envolveram o desenvolvimento de uma variedade de tipos de mecanismos, levando na maioria das vezes, à reunião não homóloga do DNA lesado, causando aberrações

cromossômicas (Pfeiffer et al., 2000). Em virtude disso, torna-se importante o desenvolvimento de ensaios biológicos que permitam a detecção de substâncias clastogênicas e aneugênicas (Kirsch-Volders et al., 2002). Assim, houve a validação do teste do micronúcleo (MN), desenvolvido com o bloqueio da citocinese e a formação de células binucleadas, com a finalidade de identificar as células que se dividiram apenas uma vez (Fenech, 2000; Kirsch-Volders et al., 2002).

Os agentes mutagênicos são substâncias que induzem alterações na molécula do DNA, que podem ser corrigidas pelo próprio mecanismo de reparo das células. Alterações não reparadas, ou reparadas erroneamente, originam mutações de ponto e/ou cromossômicas (Connor e Ferguson, 1993). As alterações cromossômicas, tais como as quebras, são normalmente visualizadas em cromossomos metafásicos. Na anáfase, os tipos aberrantes encontrados são geralmente pontes cromossômicas, sendo estas simples ou duplas (Natarajan e Obe, 1982; Pavlica et al., 2000; Matsumoto et al., 2003).

Os testes citogenéticos permitem a compreensão dos efeitos de algumas substâncias sobre os organismos-teste e mostram ser eficientes quando utilizados no biomonitoramento da extensão da poluição.

Os testes citogenéticos utilizam células cultivadas ou retiradas de animais ou indivíduos submetidos a uma exposição experimental, profissional, terapêutica ou acidental a agentes xenobióticos. São detectados dois tipos de substâncias mutagênicas: as que produzem aberrações cromossômicas estruturais, substâncias clastogênicas, e as que interferem na formação do fuso mitótico, provocando alterações na distribuição dos cromossomos durante a divisão celular e causando aneuploidias (Rabello-Gay et al., 1991).

Muitas técnicas foram desenvolvidas para avaliar o potencial mutagênico de agentes poluidores, tais como: análise de aberrações cromossômicas; análise de DNA *fingerprinting*;

análise da frequência de quebras na molécula de DNA; ensaio do cometa; quantificação dos adutos de DNA e teste de micronúcleo (McCarthy et al., 1989; Depledge, 1996).

O teste Cometa é uma técnica amplamente utilizada na detecção de danos ao DNA em células isoladas e pode ser empregada virtualmente em qualquer tipo de célula eucariótica. A aplicação do teste Cometa, juntamente com outros biomarcadores, tem sido utilizada no monitoramento de ambientes contaminados por poluentes potencialmente genotóxicos (Devaux et al., 1998).

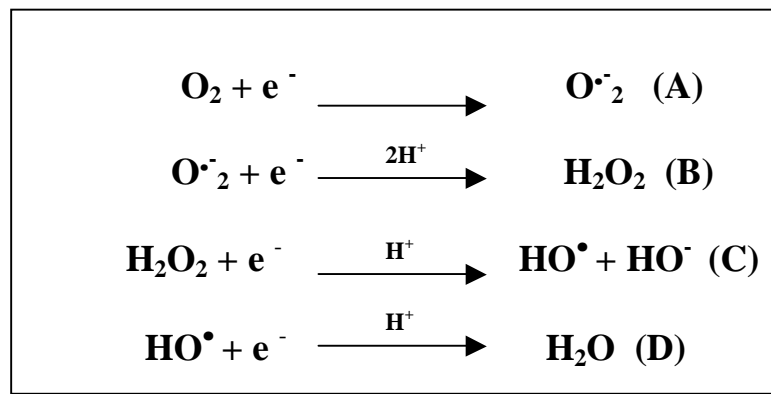
### **1.3.2. ESTRESSE OXIDATIVO**

Muitos dos poluentes que são despejados nos mananciais hídricos podem potencialmente induzir estresse oxidativo em organismos aquáticos incluindo os peixes (Bainy et al., 1996; Wilhelm Filho et al., 2001). Embora a poluição aquática seja responsável pela produção do estresse oxidativo, através do ciclo redox dos poluentes, mesmo sem poluição ou biotransformação dos xenobióticos, há uma constante produção de espécies reativas de oxigênio nos sistemas vivos (Kappus, 1987).

O oxigênio molecular é essencial a vida dos organismos aeróbios, isto inclui a quase totalidade dos organismos superiores. Sua função predominante nos eucariontes é servir como último aceptor de elétrons na respiração mitocondrial, quando será finalmente reduzido à água durante o complexo processo de respiração celular. A redução completa do oxigênio à água

requer 4 elétrons, e essa redução produz seqüencialmente do começo ao fim 3 produtos de redução (Di Giulio et al., 1995).

Os produtos da redução do oxigênio molecular mostrados na Figura 3 são o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $HO^{\bullet}$ ). Dessas espécies ativadas de oxigênio, especialmente o  $HO^{\bullet}$  é muito reativo e potencialmente deletério para os sistemas biológicos, e, juntamente com o  $O_2^{\bullet-}$  são radicais livres de oxigênio. Embora o  $H_2O_2$  não seja um radical livre ele também é um produto reativo, e via reação de Haber-Weiss pode reagir com o  $O_2^{\bullet-}$  servindo como um importante precursor de  $HO^{\bullet}$  (Di Giulio et al., 1995).



**Figura 1.** Formação de espécies reativas de oxigênio durante a redução do oxigênio à água. Adaptada de Winston (1991).

Injúrias no tecido vegetal e processos oxidativos normais da célula são provavelmente, responsáveis pela geração de  $O_2^{\bullet-}$ . Durante o transporte de elétrons nos cloroplastos e mitocôndrias, muitos desses elétrons são perdidos, e então captados pelo  $O_2$  formando  $O_2^{\bullet-}$  (Córdoba-Pedregosa et al., 2003).

De um modo geral, a exposição em longo prazo de um organismo a um poluente resulta primeiramente no acúmulo desse xenobiótico nos órgãos e tecidos e, secundariamente, mantida a exposição, alterações moleculares irreversíveis podem ocorrer devido à contínua



ação deletéria. Um dos efeitos provocados pelos metais pesados é sua capacidade de catalisar reações oxidativas, levando à geração de Espécies Reativas de Oxigênio, as EROs (Yu, 1994).

As EROs podem reagir com biomoléculas tais como proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e carboidratos (Meagher e Fitzgerald, 2000). Dentre os processos de oxidação induzidos por radicais livres, a lipoperoxidação (LPO) ou peroxidação lipídica, é, provavelmente, o processo mais extensivamente investigado. A presença abundante de fosfolipídios de membranas faz desses compostos alvos endógenos facilmente acessíveis ao ataque dos radicais livres formados, especialmente as EROs. Principalmente os ácidos graxos poliinsaturados são o grupo de lipídeos mais facilmente susceptíveis às reações com os radicais livres. A LPO pode levar à formação de radicais livres em cadeia (Zwart et al., 1999).

As conseqüências mais comuns da LPO envolvem a perturbação da função das membranas das células e organelas essenciais. Isto inclui o processo de transporte, a manutenção do gradiente de metabólitos e íons e a transdução de sinais mediada por receptores (Meagher e Fitzgerald, 2000).

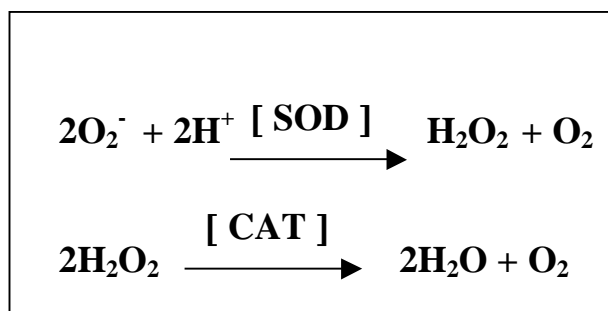
Durante o ataque das EROs ao DNA poderia haver oxidação das bases do DNA e quebras de fita simples e dupla na molécula (Zwart et al., 1999). Nas duas últimas décadas houve um grande desenvolvimento na pesquisa de novas metodologias para a determinação de danos ao DNA. Rydberg e Johanson, em 1978, foram os primeiros a quantificar o dano ao DNA em células lisadas misturadas à agarose em meio alcalino. Posteriormente, em 1984, Ostling e Johanson aumentaram a sensibilidade de detecção do dano em células isoladas ao desenvolverem uma técnica de eletroforese em microgel, que ficou conhecida como teste Cometa. Modificações dessa técnica permitiram a detecção de quebras de fita dupla devido à condição neutra da eletroforese e, subseqüentemente, foi possível a detecção de quebras de fita simples usando uma condição alcalina para a eletroforese (Rojas et al., 1999).

A aplicação do teste Cometa nos programas de biomonitoramento ambiental ganhou forças devido a algumas vantagens do uso dessa técnica tais como simplicidade, sensibilidade, rápida resposta e necessidade de uma quantidade pequena de células. Pelo fato de que qualquer célula eucariótica pode ser avaliada através desse teste, diferentes organismos sentinelas expostos (peixes, mexilhões e anfíbios) estão sendo empregados no monitoramento de ambientes aquáticos contaminados por poluentes potencialmente genotóxicos (Cotelle e Férard, 1999).

A despeito dos danos oxidativos que podem ocorrer nas membranas celulares e no material genético como resultado da formação de radicais livres, nos sistemas vivos existe uma variedade de defesas antioxidantes, enzimáticas e não enzimáticas, que controlam a formação excessiva das EROs. Das defesas enzimáticas merecem destaque as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), enquanto que os compostos tais como,  $\alpha$ -tocoferol (principal componente da vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ascorbato (vitamina C), e a GSH (glutathione reduzida) fazem parte do sistema de defesa não enzimático celular (Peng et al., 2000).

A SOD é uma metaloenzima considerada uma das mais importantes defesas antioxidantes na neutralização das EROs, pois são responsáveis pela conversão do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$  (Figura 2). Existem três tipos distintos de SODs, cada qual possuindo um metal específico no sítio ativo. A SOD que contém manganês (MnSOD) é encontrada em bactéria e certas organelas (mitocôndria e cloroplastos) de organismos superiores. A SOD que possui cobre e zinco no seu sítio ativo (CuZnSOD), está presente principalmente no citosol de eucariontes e cloroplastos de plantas superiores. E, finalmente, a SOD que contém ferro (FeSOD) é encontrada em bactérias e algumas plantas superiores (Rabinowitch e Fridovich, 1983).

Dois tipos de enzimas podem remover o peróxido de hidrogênio da célula, são elas a CAT e a GPx (Figura 2). A maioria das células aeróbias possui CAT, com exceção de algumas bactérias. Nos animais, essa enzima está presente na maioria dos órgãos, mas concentra-se principalmente, no fígado e nos eritrócitos. Ela é composta de quatro subunidades protéicas, cada uma contendo um grupo heme [Fe(III)-protoporfirina] ligado ao sítio ativo. A cada subunidade da enzima existe uma molécula de NADPH ligada, que tem por função ajudar na estabilização da estrutura enzimática (Halliwell e Gutteridge, 1989). As plantas possuem várias isoformas de catalase, as quais estão presentes nos peroxissomas e glioxissomas. São as principais enzimas de detoxificação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plantas e podem dismutar diretamente o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou oxidar substratos, tais como metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico. As catalases podem ser divididas em três classes: catalases da classe 1, removem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido durante a fotorespiração em tecidos fotossintéticos; catalases da classe 2 são produzidas em tecidos vasculares e podem exercer uma função de lignificação mas, sua exata função biológica permanece desconhecida; e na classe 3 estão as catalases presentes abundantemente em sementes e plantas jovens, e cuja atividade está relacionada à remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido durante a degradação dos ácidos graxos no glioxissoma. As catalases funcionam então como canal de limpeza do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> celular (Breusegem et al. 2001).



**Figura 2.** Esquema das reações envolvendo as enzimas SOD e CAT na neutralização das EROs. Adaptada de Di Giulio et al. (1995).

Embora as glutathione S-transferases (GST) atuem também diretamente contra as EROs, elas são uma das mais importantes enzimas da fase II de biotransformação. Esta superfamília de enzimas, presente principalmente no citosol, catalisa reações de conjugação de uma variedade de xenobióticos, bem como de substratos endógenos com a glutathione (López et al., 2002).

Estas enzimas estão envolvidas no transporte de compostos lipofílicos endógenos e exógenos resultantes da fase I do metabolismo. Elas são capazes de formar ligações covalentes com epóxidos ativos derivados das reações da fase I de biotransformação, impedindo que os mesmos se liguem ao DNA ou a outras biomoléculas (Di Giulio et al., 1995).

As GSTs têm sido extensivamente estudadas em organismos superiores, especialmente em mamíferos. Durante os últimos anos, tem crescido o interesse de pesquisar essas isoformas em organismos aquáticos, com o objetivo de serem utilizadas como biomarcadores específicos de certos agentes químicos (Oost et al., 1996).

Durante o processo de combate do estresse oxidativo ocorre a redução do peróxido de hidrogênio bem como de peróxidos orgânicos. Esse processo envolve a concomitante oxidação da GSH para a glutathione oxidada (GSSG), a qual pode ser reduzida pela glutathione reductase oxidando o NADPH (Hasspieler et al., 1994).

A GSH, um tripeptídeo composto de glutamato, cisteína e glicina, é o principal tiol celular não protéico associado com uma variedade de funções celulares, tais como integridade do citoesqueleto, síntese de proteína e de DNA, transporte de aminoácidos, “scavenger” de radicais livres, transdução de sinais, cofator de enzimas essenciais e defesa contra moléculas oxidantes e xenobióticos potencialmente perigosos (Peña et al., 2000).

#### 1.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O SISTEMA-TESTE UTILIZADO

O uso de plantas superiores em sistemas de testes para monitorar a presença de compostos tóxicos no ambiente aquático está sendo empregado satisfatoriamente. Plantas do gênero *Allium* têm sido utilizadas na avaliação da toxicidade de efluentes e de muitos compostos (Arambasic et al., 1995; Smaka-Kincl et al., 1996; Rank e Nielsen, 1998).

A *Allium cepa* L. é uma das espécies vegetais mais utilizada em testes de toxicidade e genotoxicidade, principalmente em questões de monitoramento de efluentes industriais e acúmulo de metais pesados (Bailey et al, 2000; Fernandes et al., 2002; Hoshina et al., 2002; Rigonato e Jordão, 2002; Moraes et al., 2002).

Dentre os vegetais superiores, *Allium cepa* é indicado como um eficiente organismo-teste de citotoxicidade e genotoxicidade (Fiskesjo, 1985), devido às características que possui como seu crescimento rápido de suas raízes, grande número de células em divisão, sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, sua disponibilidade durante todo o ano, seu fácil manuseio, e por possuir cromossomos em número reduzido ( $2n=16$ ) e de grande tamanho.

O uso de *Allium cepa* como material teste foi originalmente introduzido por Levan (1949), e a partir daí é utilizado para avaliar e classificar a toxicidade de químicos presentes no meio ambiente (Fiskesjo, 1985). Essa espécie tem sido utilizada como material vegetal teste indicador de mutagênese por diversos autores como: Khors et al. (1997); Smaka-Kincl et al. (1996); Rank e Nielsen (1997, 1998); Kovalchuck et al. (1998); Vicentini et al. (1999); Camparoto et al. (2002); Cantagalli e Vicentini (2002); Fernandes et al. (2002); Hoshina et al. (2002); Moraes, et al. (2002); Machado et al. (2003); Toledo et al. (2003); Eilers, et al.

(2003) e Ventura e Marin-Morales (2003). Testes com *Allium cepa* são adequados por oferecer parâmetros macroscópicos como turgescência, mudança de cor, formato, textura, espessura, comprimento da raiz e parâmetros microscópicos como anáfases prematuras, aderências cromossômicas, pontes e fragmentação cromossômica, C-mitoses e micronúcleos, os quais são indicadores de eventuais mutações no conteúdo genético celular (Quinzani-Jordão, 1987).

Da mesma forma, o uso de plantas superiores em sistemas de testes para o monitorar a presença de compostos tóxicos no ambiente aquático está sendo empregado satisfatoriamente. Plantas do gênero *Allium* têm sido utilizadas na avaliação da toxicidade de efluentes e muitos compostos tóxicos e o parâmetro empregado mais comumente para estabelecer a relação entre a concentração e a toxicidade do efluente é a inibição do crescimento de raiz (Arambasic et al., 1995; Smaka-Kincl et al., 1996; Rank e Nielsen, 1998).

Com o aumento do uso documentado de materiais vegetais em genotoxicologia e avaliação de riscos, o interesse por sistemas-teste botânicos tem sido fortalecido em meio à comunidade científica e autoridades políticas, pois proporcionam mais conhecimento da genotoxicidade e especialmente das aberrações mitóticas em eucariontes (Fiskesjö, 1993). O mesmo autor, em 1994, fez as seguintes considerações sobre a importância e a utilidade de sistemas-teste vegetais na avaliação de riscos:

- a) Embora haja diferenças entre os metabolismos de plantas e animais, há também similaridades, tais como o importante sistema de oxidase.
- b) A ativação de pró-mutágenos em plantas tem alta relevância, uma vez que seres humanos consomem plantas tratadas com agentes químicos.

Atualmente, uma das principais fontes de poluição dos ecossistemas aquáticos de água doce são os resíduos de efluentes industriais e urbanos. *Allium cepa* tem sido indicado como um importante e eficiente-organismo teste para os estudos de monitoramento ambiental,

principalmente no monitoramento de recursos hídricos de ambientes com potencialidade de contaminação (Hoshina et al., 2002).

Testes biológicos de toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para a avaliação das reações de organismos vivos à poluição ambiental. O teste de *Allium*, por ser um sistema eucarioto, pode conferir um maior grau de proximidade na comparação com os prováveis efeitos causados na biota exposta a substâncias tóxicas. Esse teste pode ser utilizado sem que a amostra a ser avaliada passe por um processo de esterilização, purificação e condensação, permitindo assim, que seja feita uma análise da amostra total (Rigonato e Jordão, 2002). O *Allium cepa* é um excelente material para testes citológicos que buscam melhor compreender a ação de químicos no ambiente (Fernandes et al., 2002).

Geralmente, muitas substâncias que poluem água, ar e solo podem potencialmente exercer algum efeito mutagênico/clastogênico sobre os seres vivos, o qual pode ser delimitado por métodos biológicos. Assim, para identificar a toxicidade crônica induzida por baixas concentrações desses agentes na água, é preciso escolher a ferramenta de monitoramento mais adequada. Nesse sentido, bioensaios vegetais são muito úteis, pois tem a capacidade de detectar baixo nível de clastogenicidade, tanto em períodos curtos de exposição *in situ* quanto em condições experimentais (Fang, 1981).

Os efeitos dos poluentes sobre as plantas podem ocorrer em diversos níveis, sendo que muitas dessas reações podem ser utilizadas como critérios de avaliação das mudanças ambientais em estudos de biomonitoramento. Estas plantas, usadas para tal finalidade, são denominadas bioindicadoras. Macroscopicamente, podem ser observadas necroses, cloroses e descolorações em folhas ou outras partes da planta, além da queda de folhas e diminuição no seu crescimento. Em nível de ultra-estrutura, observam-se alterações na estrutura fina dos componentes celulares, como o desarranjo de organelas e paredes celulares. Efeitos fisiológicos e bioquímicos são também detectáveis, tais como alterações nas trocas gasosas,

bem como em outras etapas do processo fotossintético e atividades enzimáticas. Pode, ainda, ocorrer a formação de EROs, que têm alto poder oxidativo e são extremamente tóxicas, e finalmente, o acúmulo do poluente nos tecidos vegetais. Os poluentes podem ser potencialmente mutagênicos, provocando um aumento na taxa de ocorrência de mutações e outros efeitos genotóxicos, em comparação ao nível espontâneo. (Manning e Feder, 1980).

Várias espécies vegetais podem ser utilizadas como bioindicadoras da presença de substâncias poluentes. Estas substâncias vêm causando grandes distúrbios ambientais há muito tempo, especialmente nos países das regiões temperadas. Nesses países, o emprego sistemático de plantas para tal finalidade remonta ao início da década de 20, quando as alterações na composição em espécies e o grau de agressões observadas nas plantas que integravam o ecossistema, forneciam índices do impacto de poluições. Desde então, essa abordagem tem sido sistematicamente utilizada nesses países, empregando-se espécies nativas locais ou de interesse agrícola (Grant, 1999).

A utilização de plantas como bioindicadoras da qualidade da água, ar e solo, com vistas ao prognóstico de riscos à saúde humana, apresenta uma série de vantagens, destacando-se as seguintes:

- As plantas superiores são organismos eucarióticos cuja complexidade genética (em termos de quantidade total de DNA por núcleo, genes estruturais, organelas, morfologia cromossômica, etc.) é similar à do homem; são multicelulares com complexa estrutura orgânica; possuem desenvolvimento embrionário onde, também, ocorrem determinação, competência e hereditariedade celular (Constantin, 1982).
- A manutenção de plantas é de fácil execução e acesso, quando comparada à criação e manutenção de animais.
- Possuem ciclos de vidas curtos, podendo ser empregadas em curto período.



- As plantas podem ser expostas a uma gama de condições ambientais, sendo possível realizar experimento *in situ* e testes *in vivo*.
- Apresenta baixa ocorrência de resultados falso-negativos, sendo, por exemplo, apropriada para avaliações de risco à exposição a agentes mutagênicos químicos e físicos.
- Os vegetais não são tão mais sensíveis do que os humanos a ponto de não poderem ser utilizados como bioindicadores, para avaliação da situação de risco imposta pela poluição urbana e industrial à população humana.

O uso de bioindicadores vegetais de genotoxicidade representa uma alternativa simples, eficiente, rápida e de baixo custo para avaliar o potencial genotóxico de agentes contaminantes ambientais, permitindo inclusive, a difusão de técnicas de biomonitoramento *in situ* e testes *in vivo* em locais que disponham de condições básicas de investigação. Além disto, os bioensaios vegetais permitem avaliar a genotoxicidade de substâncias químicas a misturas complexas, o que é de suma importância na avaliação da poluição ambiental (Grant, 1999).

Plantas do gênero *Allium* têm sido utilizadas na avaliação da toxicidade de efluentes e muitos compostos (Arambasic et al., 1995; Smaka-Kincl et al., 1996; Rank e Nielsen, 1998). Marcano e colaboradores (2004) avaliaram a citotoxicidade da hidrazida maleica em raízes de *Allium cepa*; Chauhan e Gupta (2005) verificaram os efeitos citogenéticos e ultraestruturais de herbicidas à base de uréia no mesmo tecido vegetal. Em relação a metais pesados, Fatima e Ahmad (2005), estudaram a ação de algumas enzimas antioxidantes na detecção destes metais em águas de despejo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar os potenciais citotóxico, genotóxico e o estresse oxidativo de efluentes (tratado e não-tratado), de uma indústria de papel e celulose, originados de um processo de branqueamento convencional, no município de Correia Pinto, SC, usando como sistema-teste células meristemáticas de *Allium cepa* L. expostas aos efluentes.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Verificar o potencial citotóxico dos efluentes tratado e não-tratado por meio dos índices mitóticos e índices de fases em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*.
2. Avaliar o potencial genotóxico dos efluentes tratado e não-tratado por meio da frequência e tipos de aberrações cromossômicas e danos ao DNA em raízes de *Allium cepa*.
3. Avaliar a toxicidade dos efluentes tratado e não-tratado por meio da medida da atividade das enzimas CAT, GST, dos níveis de GSH e da medida do dano a lipídios (TBARS) em catáfilos jovens de *Allium cepa*.

4. Verificar a possível inter-relação entre os níveis de antioxidantes e os demais efeitos estudados.
  
5. Consolidar o uso de *Allium cepa* como bioindicador a ser utilizado na avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo, após a exposição aos efluentes tratado e não-tratado da indústria de papel e celulose.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. OBJETO DE PESQUISA**

Foi escolhida a empresa de papel e celulose Klabin/Celucat localizada às margens do rio Canoas no município de Correia Pinto (SC), para constituir o objeto de estudo, sobre a qualidade dos efluentes gerados pela mesma (Anexo A).

#### **3.2. EFLUENTE INDUSTRIAL**

Foi analisado o efluente final do processo de produção de polpas (*Pinus*) branqueadas por processo convencional – utilização de cloro molecular - (efluente não-tratado) e o efluente tratado (por lagoa de aeração), da indústria correspondente, previamente filtrado e estocado a 4°C, até sua utilização.

A indústria em estudo produz polpa celulósica e papel utilizando *Pinus*/eucalipto (60/40), sendo que a polpa é branqueada por processo convencional tipo O, C, E, D, E, onde O = deslignificação com O<sub>2</sub>, C = tratamento com Cl<sub>2</sub>, E = tratamento com NaOH, D= tratamento com ClO<sub>2</sub>. O efluente gerado no processo é previamente tratado pela indústria, antes do seu descarte no rio. O tratamento utilizado é através de lagoa aerada, com injeção de oxigênio puro.

### 3.2.1. Variáveis do Efluente da Indústria de Papel e Celulose

Paiva (2004) analisou os seguintes parâmetros físico-químicos das amostras dos efluentes fornecidos pela Indústria de Papel e Celulose Klabin/Celucat, com o objetivo de estimar as possíveis alterações no corpo receptor: fenol, por duas metodologias diferentes, 4-AAP e Folin, fósforo, nitrito, nitrato, sulfeto, condutividade e pH.

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos para as características físico-químicas:

TABELA 1 - . VALORES DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE (PAIVA, 2004)

Parâmetros/ Local de coleta	EFLUENTE TRATADO	EFLUENTE NÃO TRATADO
Sódio (ppm)	227,5	337,5
DBO (mg/L)	530	890
DQO (mg/L)	760	1420
Sulfeto (mg/L)	1,03	2,55
Fenol AAP (mg/L)	2,72	11,54
Fenol Folin (mg/L)	4,35	10,20
Fósforo (mg/L)	1,36	1,81
Nitrito (mg/L)	0,13	0,21
Nitrato (mg/L)	2,22	9,13
Condutividade (µS/cm)	0.968	1.225
PH	6.8	8.1

O alto teor de sulfeto apresentado pelo efluente é decorrente do processo Kraft de polpação, cozimento da madeira com sulfato em meio alcalino. O sulfeto é considerado um elemento de potencial toxicidade previsto na Resolução nº 20/86 do CONAMA. A quantidade

de soda e outros sais utilizados neste processo e no processo de branqueamento é também bastante elevada, explicando assim a alta condutividade do efluente.

O teor de fenóis também foi alto em função dos derivados de lignina presentes no mesmo. Os polifenóis produzidos por vegetais encontram-se em abundância na madeira.

### **3.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL I – TESTE CITOGENÉTICO COM *ALLIUM***

#### **3.3.1. CULTIVO E TRATAMENTO DO ORGANISMO-TESTE**

O material-teste usado foi o meristema de ponta de raiz de *Allium cepa* L. (cebola comum). Para obtê-lo, os bulbos de *Allium cepa* L., obtidos de fonte comercial, de tamanho uniforme, foram colocados para germinar em água não clorada, no escuro, à temperatura constante de  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Somente as bases dos bulbos permaneceram imersas na água, a qual foi renovada a cada 24h. Depois de 2 a 3 dias, as raízes germinadas alcançaram o comprimento de 15 a 20mm, quando a proliferação celular atinge uma cinética de equilíbrio dinâmico (Diéz et al., 1970).

Antes dos bulbos serem expostos aos tratamentos, 3 a 5 raízes por bulbo foram coletadas para servirem como controle 0h. Fez-se este tipo de controle para se saber qual o índice mitótico normal do bulbo em particular ou do grupo de bulbos. Os bulbos foram então transferidos para frascos de 50mL de volume, onde receberem os seguintes tratamentos durante a germinação das raízes: a) exposição a amostra de efluente não tratado, nas concentrações 0,1, 12, 50 e 100%; b) exposição a amostra de efluente tratado, nas

concentrações 0,1, 12, 50 e 100%; c) exposição à água não clorada, que serviu como controle negativo do ensaio. Cada tratamento foi aplicado a uma série de 5 bulbos, que foram mantidos nas mesmas condições anteriores de cultivo.

Convém ressaltar a importância do cultivo inicial do sistema-teste em água não clorada como forma de evitar uma atribuição indevida das causas de possíveis inibições de crescimento das raízes às substâncias-teste utilizadas, podendo estas causas serem devido a características dos próprios bulbos.

Após 24 horas de tratamento (tratamento agudo), 3 a 5 raízes por bulbo foram selecionadas aleatoriamente e coletadas. O sistema-teste retornou, então, às mesmas condições anteriores, onde permaneceu até que completasse 72h de tratamento (tratamento sub-crônico) e mais 3 a 5 raízes foram coletadas. No período de estudo, efetuou-se a renovação de todas as amostras-teste a cada 24 horas. Após a coleta, os bulbos foram colocados novamente em água desclorada e após 24h (período de recuperação), as raízes restantes foram coletadas.

As raízes coletadas foram fixadas em Carnoy I (álcool etílico-ácido acético, 3:1), a 4°C, por pelo menos uma noite.

### **3.3.2. PREPARO DAS LÂMINAS PARA ANÁLISE MICROSCÓPICA**

- Foram retiradas de 3 a 5 raízes do total de raízes fixadas por bulbo e colocadas para lavagem e recuperação da hidratação normal.
- Posteriormente, as raízes foram submetidas à hidrólise ácida (HCl 1N a 60°C, em estufa) por aproximadamente 10 minutos.

- Realizada a hidrólise ácida, as raízes foram lavadas novamente para a primeira etapa da coloração, onde foram imersas em Reativo de Schiff e mantidas no escuro por 30 minutos.
- Após a coloração, as raízes foram lavadas, as coifas retiradas e separadas as regiões meristemáticas, as quais foram individualmente apoiadas sobre a lâmina, coberta com uma gota de Orceína acética 1% e esmagadas entre lâmina e lamínula.
- As lâminas foram mantidas em um microambiente úmido resfriado, por pelo menos 24h e, então, as lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido.
- Feita a retirada da lamínula, as lâminas foram postas para secar na temperatura ambiente e, após, foram tornadas permanentes utilizando Bálsamo do Canadá.

### **3.3.3. ANÁLISE DAS LÂMINAS**

As cebolas ( $2n=16$ ) possuem cromossomos de tamanho grande, dos tipos meta e submetacêntrico. A análise das lâminas foi feita em microscópio óptico comum, com objetiva de 40x.

Foram observadas de 3 a 5 raízes por bulbo, tanto após as primeiras 24h como após as 72h de tratamento com as amostras-teste, sem deixar de mencionar também a observação do mesmo número de raízes antes de serem expostas aos efluentes (0h) e após o período de recuperação (24h) em água não clorada, além do controle negativo.

Pelo menos 1000 células foram analisadas por raiz, em cada caso, totalizando 5000 células por grupo. Os parâmetros microscópicos analisados foram os índices mitóticos e de fases, para avaliação dos potenciais citotóxico e alterações morfológicas (aberrações



mitóticas), como indicador de potencial genotóxico das amostras em questão. Eles foram definidos da seguinte forma:

- a) Índice Mitótico (IM - %) – número de células em divisão/número de células observadas X 100.
- b) Índice de Fases (IF - %) – número de células em uma determinada fase mitótica/número de células em mitose X 100.
- c) Aberrações Mitóticas – as frequências de células aberrantes obtidas a partir do tratamento com águas ambientais foram comparadas com as frequências de aberrações obtidas nas células do controle negativo.

Os valores médios utilizados para o cálculo das fórmulas anteriormente mencionadas encontram-se nos anexos B. Ainda, foram calculadas as frequências relativas das seguintes aberrações (%): C-metáfases, metáfases e anáfases desorganizadas e pontes cromossômicas.

### **3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL II – ESTRESSE OXIDATIVO**

#### **3.4.1 CULTIVO E TRATAMENTO DO ORGANISMO TESTE**

O material-teste usado foi o catáfilo jovem (catáfilos menores, região mais interna do bulbo) de *Allium cepa* L. Para obtê-los, os bulbos de *Allium cepa* L. foram colocados para germinar em água não clorada, no escuro, à temperatura constante de  $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Somente as bases dos bulbos permaneceram imersas na água, que foi renovada a cada 24h.

Os bulbos foram então transferidos para frascos de 50mL de volume, para receberem os seguintes tratamentos: a) exposição à amostra de efluente não tratado, nas concentrações 0,1 e 100%; b) exposição à amostra de efluente tratado, nas concentrações 0,1 e 100%; c) exposição à água não clorada, que serviu como controle negativo do ensaio. Cada tratamento foi aplicado a uma série de 3 bulbos, que foram mantidos nas mesmas condições anteriores de cultivo.

Após 24 horas de tratamento, os catáfilos jovens foram coletados de bulbos selecionados aleatoriamente e coletados. Após a coleta do grupo de tratamento 24 horas, outros bulbos também expostos aos efluentes foram colocados novamente em água desclorada e após 24h (período de recuperação), os catáfilos restantes foram coletados.

### **3.4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO**

Os catáfilos coletados foram cortados em pequenos pedaços com o auxílio de um bisturi e 100mg foram utilizadas para produzir o homogenato e a mesma massa para o extrato ácido.

### **3.4.2.1 Preparação dos homogenatos**

Os homogenatos dos bulbos foram obtidos em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 contendo 0,1% de Triton X-100 e 150 mM de NaCl (1:19 p/v). A homogeneização foi realizada a 4 °C, durante 30 segundos em homogeneizador, seguida de centrifugação a 5000g durante 5 minutos. O sobrenadante foi mantido a – 20°C até sua utilização para análise das enzimas GST (Glutathione S-Transferase), CAT (Catalase), e do TBARS (Tio Barbituric Acid Reactive Substances – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

### **3.4.2.2 Preparação do extrato ácido**

Após a trituração de amostras dos bulbos em tampão, foram imediatamente precipitadas com ácido tricloroacético 12% (1:9 p/v) e homogeneizadas durante 30 segundos em homogeneizador, seguidos de centrifugação a 5000g durante 5 minutos. Imediatamente após, foi feita a determinação da GSH (glutathione reduzida) no sobrenadante.

### 3.4.3 Glutathiona reduzida (GSH)

Amostras dos bulbos em tampão foram precipitadas com TCA 12% nas diluições 1:9 (p/v) homogeneizadas, seguidas de centrifugação a 5000g durante 5 minutos. A concentração de pequenos tióis foi avaliada nos sobrenadantes imediatamente após a obtenção dos extratos ácidos (Beutler et al., 1963; Fatima e Ahmad, 2005). A adição de 0,2 mL de DTNB 2,5 mM nas cubetas contendo 1,9 mL de tampão fosfato de potássio pH 8,0 e 0,1 ml do extrato ácido permitiu, após cerca de 2 minutos, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB), de cor amarela, mensurável em 412nm. As análises foram feitas em duplicatas e os valores expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$ .

### 3.4.4 Atividade da enzima catalase (CAT)

Para análise da atividade desta enzima, quantificou-se a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), em 240nm, pela enzima presente na amostra (Aebi, 1984; Fatima e Ahmad, 2005). Para esse ensaio, utilizou-se a solução de peróxido de hidrogênio 10mM em tampão fosfato de potássio 50mM pH 7,0 preparada e titulada no dia da análise. Em uma cubeta de quartzo, foram colocados 2mL da solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 20  $\mu\text{l}$  de amostra. Após homogeneização, a velocidade de decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi medida durante 20 segundos. As amostras foram analisadas em duplicatas, sendo os valores expressos em  $\text{mmol de H}_2\text{O}_2 \text{ consumido min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ .

### 3.4.5 Atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST)

A atividade da GST foi medida espectrofotometricamente em 340nm (Keen et al., 1976; Fatima e Ahmad, 2005). A amostra foi adicionada em um meio contendo 10 $\mu$ L de CDNB 0,1M, 10 $\mu$ L de GSH 0,1 M e 970  $\mu$ l de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, sendo que na cubeta de referência o volume de amostra foi substituído por tampão. As análises foram feitas em duplicatas e os valores da atividade da enzima expressos em nmol de CDNB conjugado  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ .

#### **3.4.6 Avaliação da lipoperoxidação tecidual (TBARS)**

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada em triplicatas, pela detecção espectrofotométrica em 535nm dos derivados de seus produtos de oxidação, por meio de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído ou MDA, produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (Bird e Draper, 1984). Os homogenatos foram precipitados com ácido tricloroacético (TCA) a 12% e agitados vigorosamente por 5 segundos. Em seguida foram incubados em tampão Tris-HCL 60 mM 7,4 (0,1 mM DPTA) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73% durante 60 minutos a 100°C. Após este período, o material foi resfriado durante 30 minutos a 5°C e centrifugado (5min a 10000g), e a absorbância da cor rósea, medida em 535nm, sendo os valores expressos em  $\text{nmol g}^{-1}$ .

#### **3.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL III: AVALIAÇÃO DE DANO AO DNA (TESTE COMETA)**

O material-teste usado foi o meristema de ponta de raiz de *Allium cepa* L. Para obtê-lo, os bulbos de *Allium cepa* L. foram colocados para germinar em água não clorada, no escuro, à temperatura constante de  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Somente as bases dos bulbos permaneceram imersas na água, que foi renovada a cada 24h. Depois de 2 a 3 dias, as raízes germinadas alcançaram um comprimento de 15 a 20mm.

Antes dos bulbos serem expostos aos tratamentos, 3 a 5 raízes foram coletadas para servirem como controle 0h. Os bulbos foram então transferidos para frascos de 50mL de volume, para receberem os seguintes tratamentos: a) amostra de efluente não tratado, nas concentrações 0,1 e 100%; b) amostra de efluente tratado, nas concentrações 0,1 e 100%; c) água não clorada, que serviu como controle negativo do ensaio. Cada tratamento foi aplicado a uma série de 2 bulbos, mantidos nas mesmas condições anteriores de cultivo.


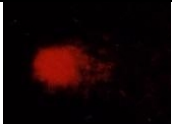


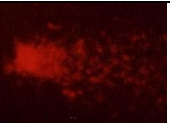
Após 24 horas de tratamento, 3 a 5 raízes por bulbo foram selecionadas aleatoriamente e coletadas.

A fragmentação do DNA foi avaliada usando eletroforese horizontal e microscopia de fluorescência utilizando o teste Cometa (Singh et al., 1988; De la Torre, 1997). As regiões apicais das raízes foram cortadas e maceradas sob refrigeração em placa de Petry contendo 95  $\mu\text{l}$  de solução de extração de núcleo. As células assim isoladas (30  $\mu\text{l}$ ) foram então embebidas em 75  $\mu\text{l}$  de agarose de baixo ponto de fusão (LMPA; 0,75 %) a  $37^\circ\text{C}$ . Esta mistura (células / LPMA) foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (NMPA, 1 %). As lâminas foram mergulhadas em solução de lise gelada contendo 2,5 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 10 % DMSO e 10 mM Tris pH 10, por, no mínimo, 2 horas. Após este período, as lâminas foram incubadas por 25 minutos em tampão alcalino gelado (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 13), e o DNA

liberado foi submetido a uma eletroforese horizontal sob voltagem de 30V e uma corrente elétrica de 300 mA por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M (pH 7,5) e coradas com brometo de etídeo (2 µg/ml). A visualização foi feita em um microscópio de fluorescência com filtro de excitação de 515 a 560 nM.

A análise de imagens foi feita segundo Collins (1995), onde, para cada animal, foram analisadas aleatoriamente imagens de 100 células (50 células de cada lâmina, em duplicata) e o tamanho dos cometas (região nuclear + cauda) foi medido em unidades arbitrárias. Os cometas foram classificados em classes, de acordo com o tamanho da cauda, variando de cometas sem cauda (com ausência de dano, classe 1), até cometas que apresentaram cauda longa (dano máximo, classe 5). A fim de expressar o dano visualizado nas lâminas em valores numéricos, cada classe recebeu uma pontuação, conforme demonstrado na Tabela 6.

**Tabela 2.** Pontuação e exemplos de cada classe de cometa visualizada.

	<b>Classe 1</b>	<b>Classe 2</b>	<b>Classe 3</b>	<b>Classe 4</b>	<b>Classe 5</b>
<b>Pontuação</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Tipo de cometa.					

Para cada cebola foi calculada uma pontuação de acordo com o número de cometas visualizados em cada classe, segundo a equação abaixo:

- Índice de dano ao DNA = [(Nº de cometas classe 1 x 0) + (Nº de cometas classe 2 x 1) + (Nº de cometas classe 3 x 2) + (Nº de cometas classe 4 x 3) + (Nº de cometas classe 5 x 4)].

Conseqüentemente, obteve-se uma única pontuação para cada grupo estudado. Assim, o

índice de dano de cada grupo podia variar de 0 (ausência de dano) a 400 (presença de dano máximo).

### **3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados das análises microscópicas dos efeitos citotóxicos e genotóxicos e das análises espectrofotométricas do estresse oxidativo, foram comparados aos efeitos observados no controle negativo. Para tanto, os testes estatísticos utilizados foram:

- One-way ANOVA = efeito citotóxico (IM)
- Teste t de Student = efeito citotóxico (IF) e estresse oxidativo
- Qui-quadrado = efeito genotóxico (Frequência de aberrações e danos ao DNA).

Para todos, o nível de significância mínimo considerado foi de 5% (Anexo B).

## **4 RESULTADOS**



## **4.1 ÍNDICES MITÓTICOS (IM)**

Os valores de índice mitótico obtidos para ambos os efluentes estão descritos no anexo B. Conforme pode ser observado, os valores de IM para os controles dos respectivos grupos (0 h), CO, 0,1%, 12%, 50% e 100%, foram significativamente discrepantes. Desta maneira, este fato introduz nas análises um componente alheio ao efeito que se deseja pesquisar, o qual é função das diferenças próprias ou individuais entre as cebolas. Visando excluir este componente, optou-se por normalizar os dados segundo o critério que considera os valores respectivos de 0h, de cada grupo (conjunto de valores relativos a uma determinada concentração), como sendo a unidade (valor = 1). Assim, para cada grupo, os valores de IM para os tempos de 24, 72 e recuperação são relativos ao tempo zero.

### **4.1.1 EFLUENTE NÃO-TRATADO (NT)**

O possível potencial citotóxico dos efluentes pode ser refletido na redução da atividade proliferativa de meristemas de raízes expostas a tais amostras. Esta redução torna-se evidente quando comparada a um controle negativo. Por isso, a análise dos índices mitóticos destas células representa um parâmetro confiável para a verificação do potencial citotóxico em questão.

Os IM obtidos dos meristemas de raízes expostas ao efluente não-tratado e água não clorada (controle negativo), em todos os períodos de exposição, estão representados na Figura

3. Os dados constantes dessa figura e seu tratamento estatístico demonstram que foi detectada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os IM de células coletadas dos bulbos expostos ao efluente não-tratado em todas as concentrações (0,1, 12, 50 e 100%) e tempos de exposição de 24 e 72h - em relação aos IM das células coletadas previamente à exposição ao efluente (controle 0h). Para a menor concentração (0,1%), houve uma redução significativa dos IM, em relação ao respectivo controle 0h, nos períodos de 24, 72h e recuperação. Já nas outras concentrações (12, 50 e 100%), evidenciou-se um aumento significativo dos IM, em relação ao próprio controle 0h, em todos os períodos de exposição.

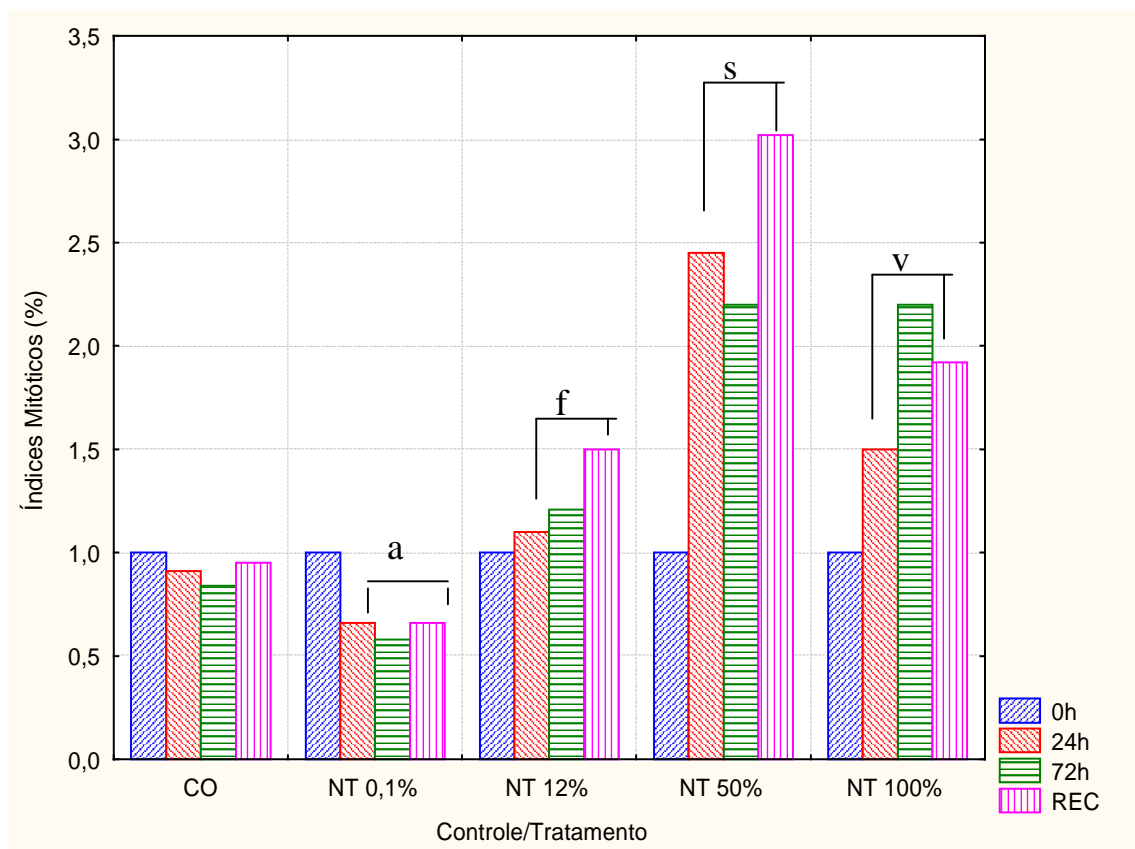


FIGURA 3 – Índices mitóticos médios (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente não-tratado (NT) por zero, 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo. As letras a, f,

s e v representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) dos tempos de exposição da concentração 0,1, 12, 50 e 100%, respectivamente em relação ao respectivo grupo controle (0h) de cada grupo.

#### **4.1.2 EFLUENTE TRATADO (T)**

A comparação, em termos percentuais, entre a atividade proliferativa de células meristemáticas de raízes expostas ao efluente tratado (T) e aquelas tratadas com água não clorada (controle negativo), está representada na Figura 4, e suas respectivas frequências encontram-se em anexo (ANEXO B).

Apenas os índices mitóticos observados para as células tratadas com a concentração 12%, por 24 e 72h, apresentaram uma redução estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle do próprio grupo (0h).

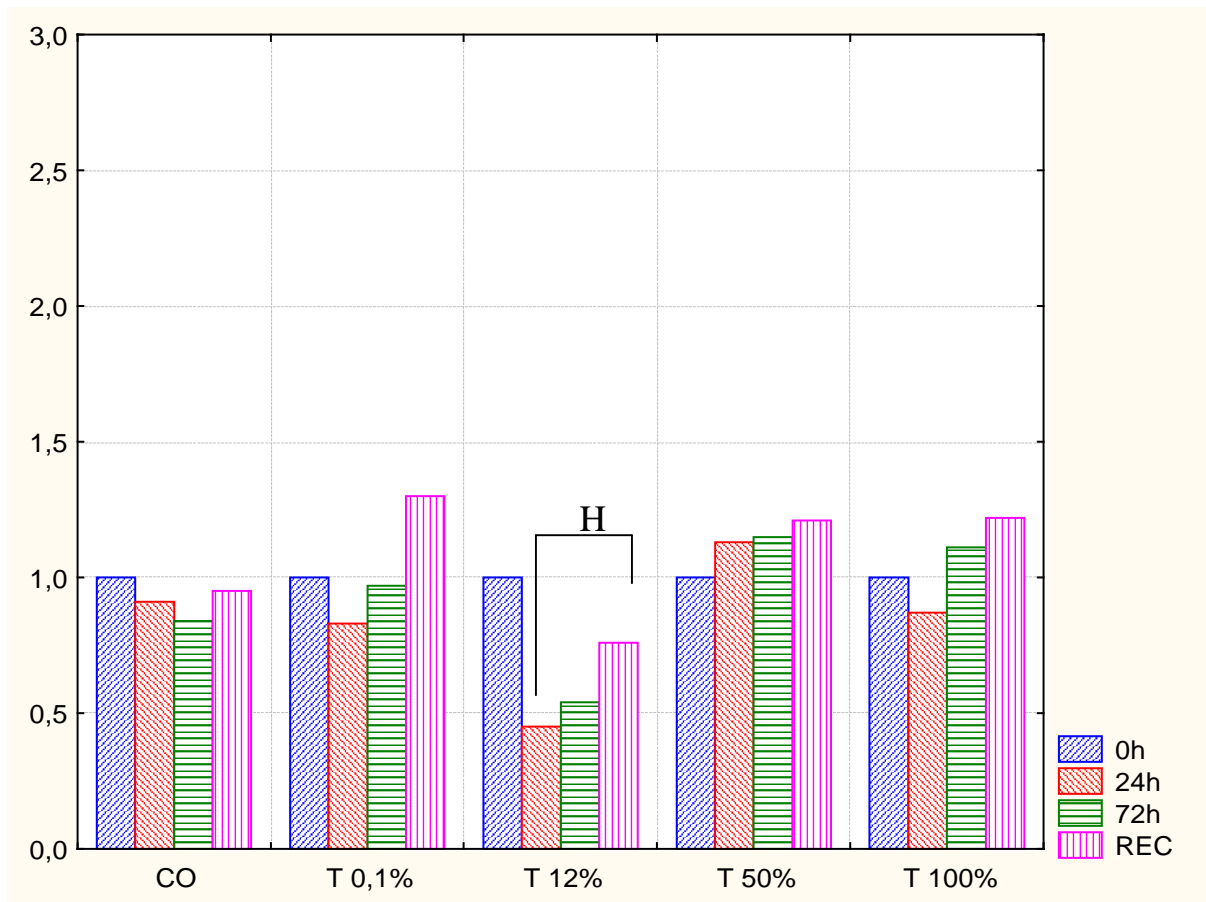


FIGURA 4 – Índices mitóticos médios (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente tratado (T) por zero, 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo. (H) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) dos tempos de exposição da concentração 12%, em relação ao próprio grupo controle (0h).

## 4.2 ÍNDICES DE FASES

A atividade proliferativa das células meristemáticas foi avaliada ainda através de uma análise comparativa entre os dados constantes nas figuras seguintes (5-12), referentes aos

índices de fases da divisão mitótica das células expostas ao efluente não-tratado (NT) e tratado (T) e aquelas do controle negativo.

#### **4.2.1 EFLUENTE NÃO TRATADO (NT)**

##### **Índice de Prófase**

Os dados contidos na Figura 5 indicam que houve alteração (redução) significativa ( $p < 0,05$ ) nos índices de prófase após exposição aguda (24h) ao efluente não-tratado na concentração 0,1%. Bulbos expostos a concentração de 12% deste efluente foram os que mais apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Foram observadas diferenças significativas entre o período de 24h de exposição em relação ao controle negativo 24 e quando se comparou os períodos de exposição de 24 e 72 horas. As células tratadas com a concentração 50% por 24h apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao controle 24h. Para a maior concentração (100%), não houve alteração estatisticamente significativa.

##### **Índice de Metáfase**

Observa-se na Figura 6 que somente ocorreu alteração (aumento) significativa nos índices metafásicos após exposição aguda (24h) ao efluente não tratado na concentração

12%. Nas outras concentrações (0,1, 50 e 100%) e em seus períodos de exposição (24 e 72h), não houve diferenças significativas.

### **Índice de Anáfase**

Observa-se na Figura 7 que a exposição por 72h à concentração de 50% revelou uma diferença (aumento) significativa quando comparada ao controle 72 horas. Na concentração 100% observou-se um aumento significativo do índice metafásico das células meristemáticas expostas por 24h ao efluente não-tratado em relação ao controle do mesmo período (24h). Para as duas menores concentrações (0,1 e 12%) não foi observada nenhuma alteração significativa.

### **Índice de Telófase**

Observa-se na Figura 8 que, para todas as concentração e tempos de exposição, não foram detectadas alterações significativas.

Observa-se, de um modo geral, que a fase do ciclo mitótico mais atingida pelo efluente não-tratado foi a prófase, seguida da anáfase, metáfase e telófase.

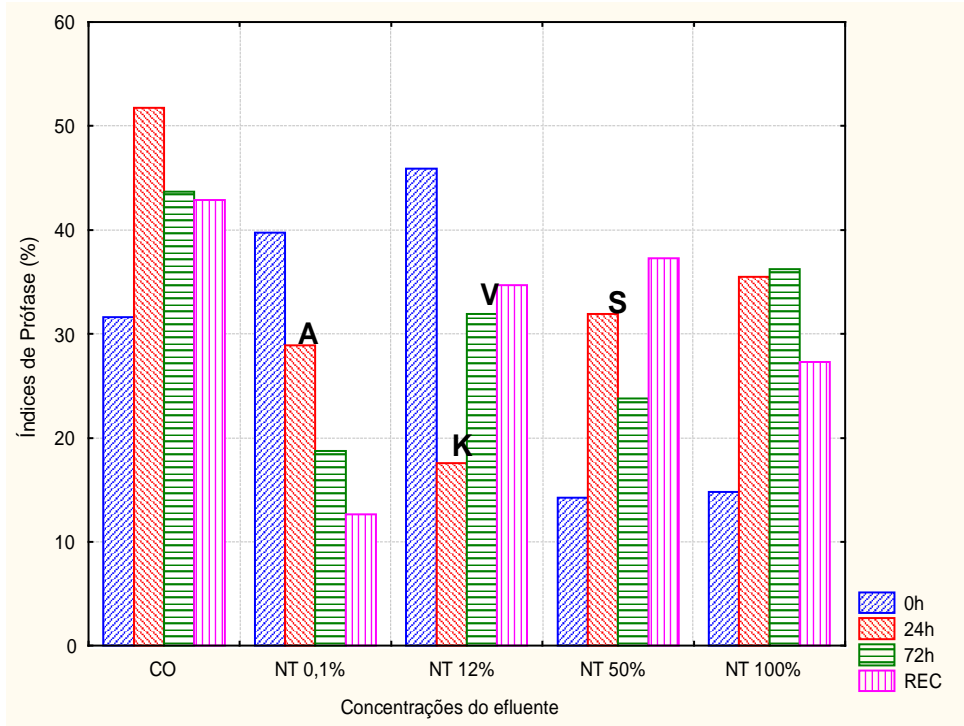


FIGURA 5– Índices de prófase (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente não-tratado (NT) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo. (A, K e S) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao CO 24h; (V) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao NT 12% 24h.

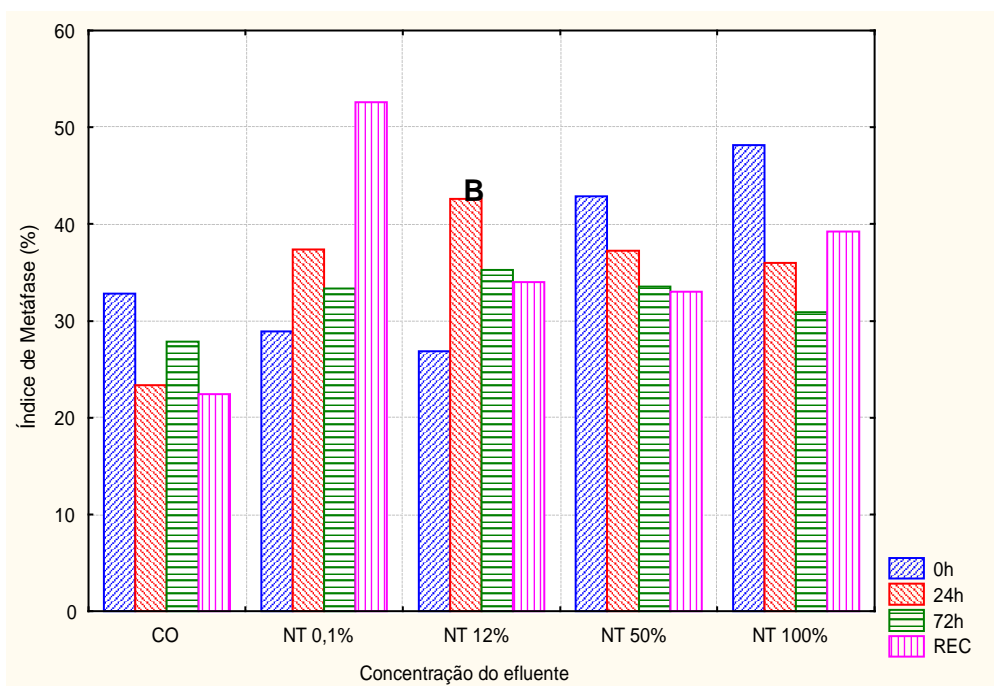


FIGURA 6– Índices metáfase (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente não-tratado (NT) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo. (B) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao CO 24h.

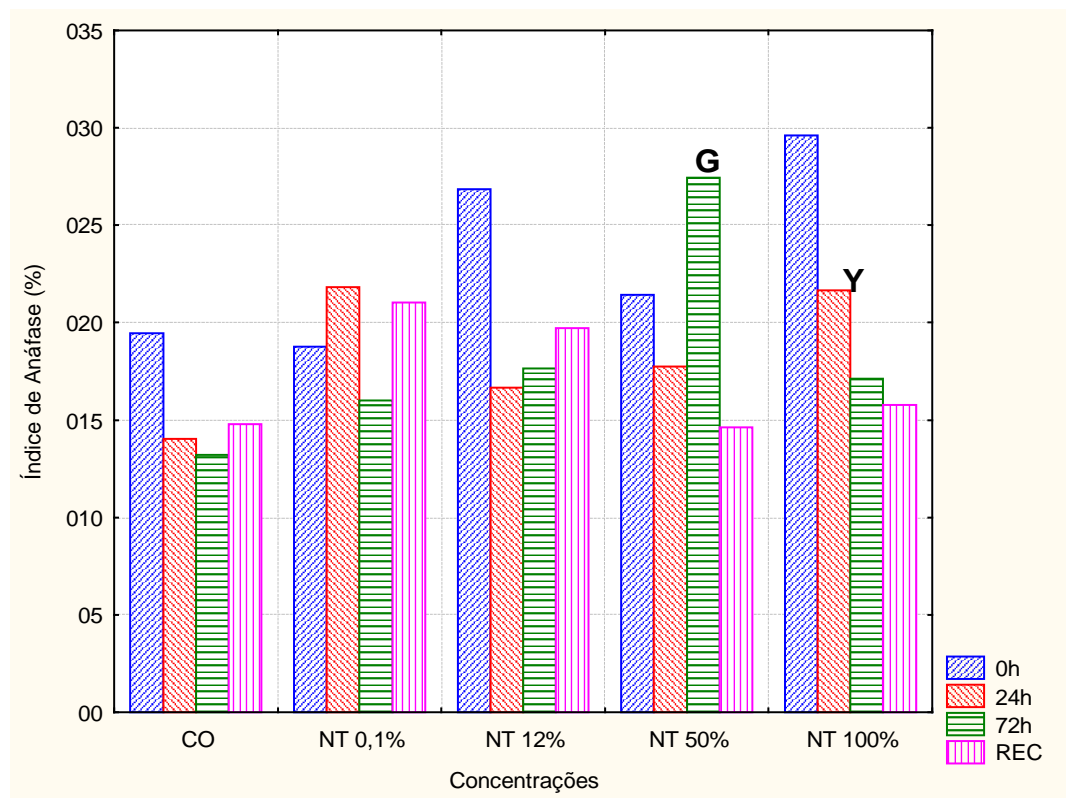


FIGURA 7 – Índices de anáfase (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente não-tratado (NT) por 0; 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo. (G) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao CO 72h; (Y) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao CO 24h.



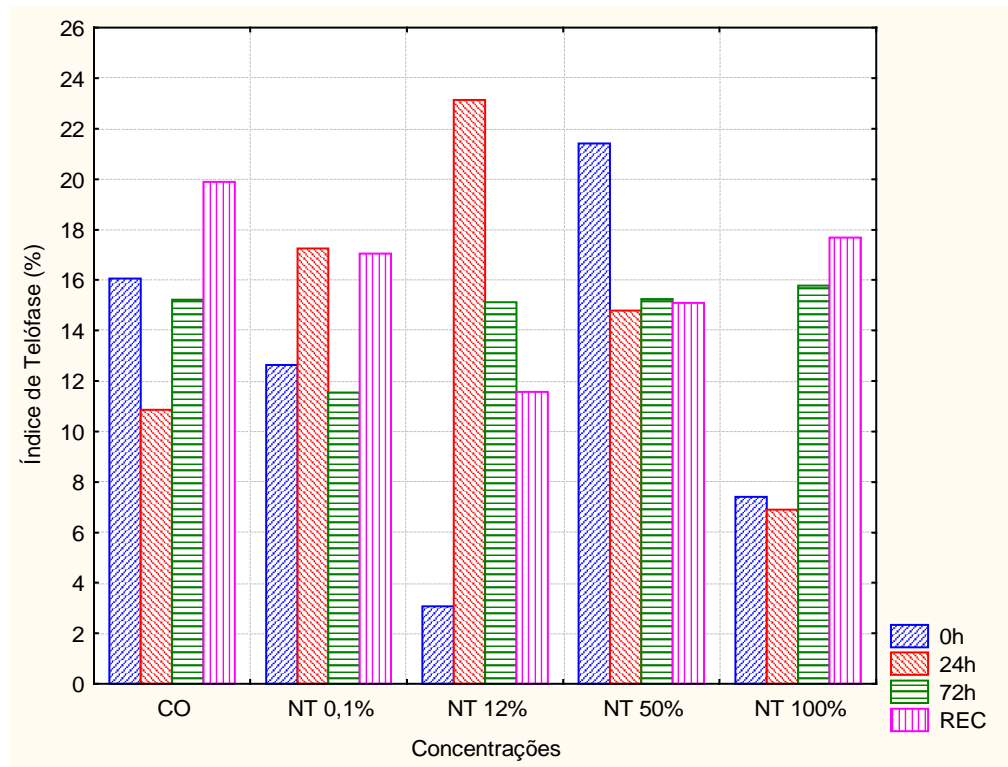


FIGURA 8 – Índices de telófase (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente não-tratado (NT) por 0; 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo

#### 4.2.2 EFLUENTE TRATADO (T)

As Figuras 9, 10, 11 e 12 apresentam a análise comparativa dos índices mitóticos das células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* expostas ao efluente tratado (T) e as células de bulbos mantidos em água não clorada (controle negativo).

### **Índice de Prófase**

A Figura 9 evidencia que as células expostas às concentrações 0,1, 12, 50 e 100% do efluente tratado, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos seus índices profásicos.

### **Índice de Metáfase**

Nos índices de metáfase, vistos na Figura 10, nas células meristemáticas expostas por 72h ao efluente tratado 0,1%, houve uma redução estatisticamente significativa em relação às mesmas células expostas por período agudo (24h), o que também foi observado na maior concentração (100%). Na concentração 12%, as células expostas por 24h aumentaram significativamente seus índices metafásicos em relação ao controle 24h. A concentração de 50% não apresentou alteração significativa.

### **Índice de Anáfase**

Em relação aos índices anafásicos, não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), tanto em comparação às concentrações quanto aos períodos de exposição. Figura 11.

### **Índice de Telófase**

Com relação aos índices de telófase, na Figura 12, nenhuma alteração estatisticamente significativa foi observada, tanto em relação às concentrações quanto aos períodos de exposição.

Observa-se, de um modo geral, que a única fase do ciclo mitótico atingida pelo efluente tratado foi a metáfase. Esta fase foi mais atingida após 24 horas de exposição, tanto em relação ao controle 24h quanto a 72h de exposição ao efluente tratado.

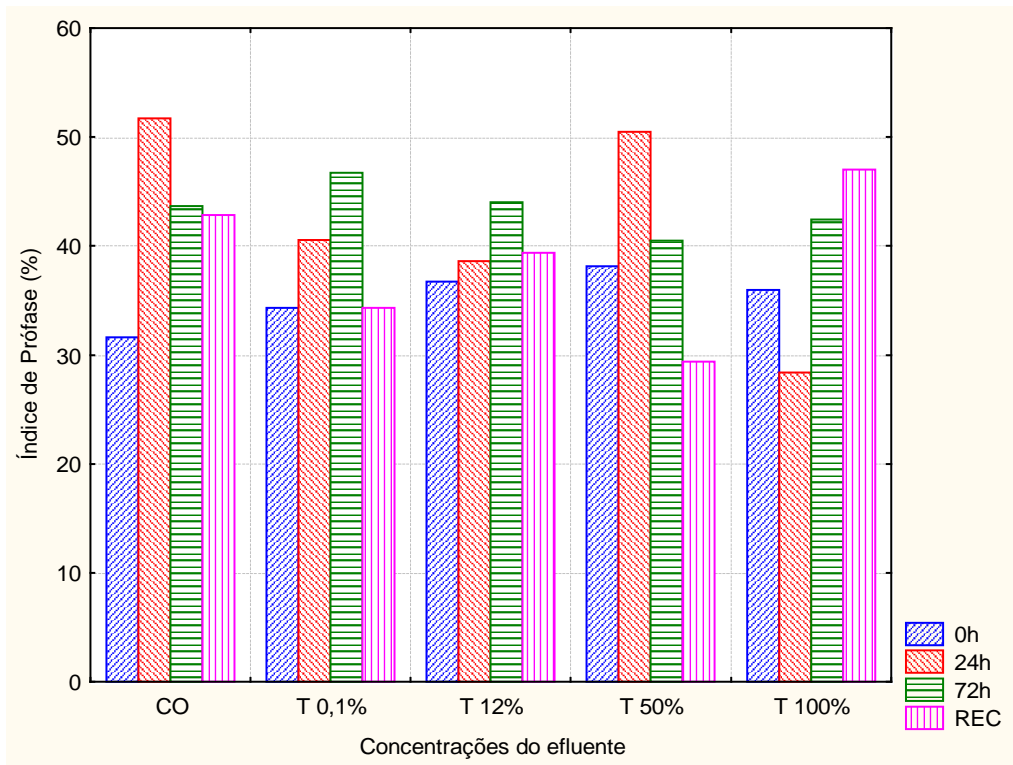


FIGURA 9– Índices de prófase (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente tratado (T) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo. REC – recuperação.

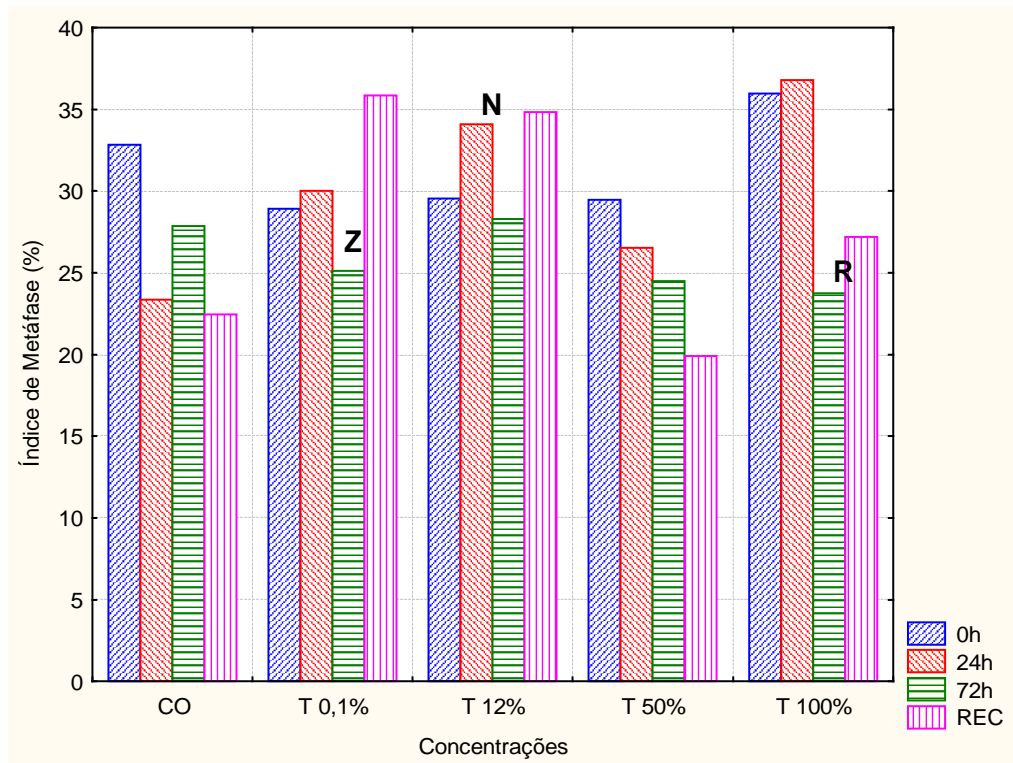


FIGURA 10 – Índices de metáfase (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente tratado (T) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo. REC – recuperação. (N) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao CO 24h; (R) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao T 100% 24h; (Z) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao T 0,1% 24h.

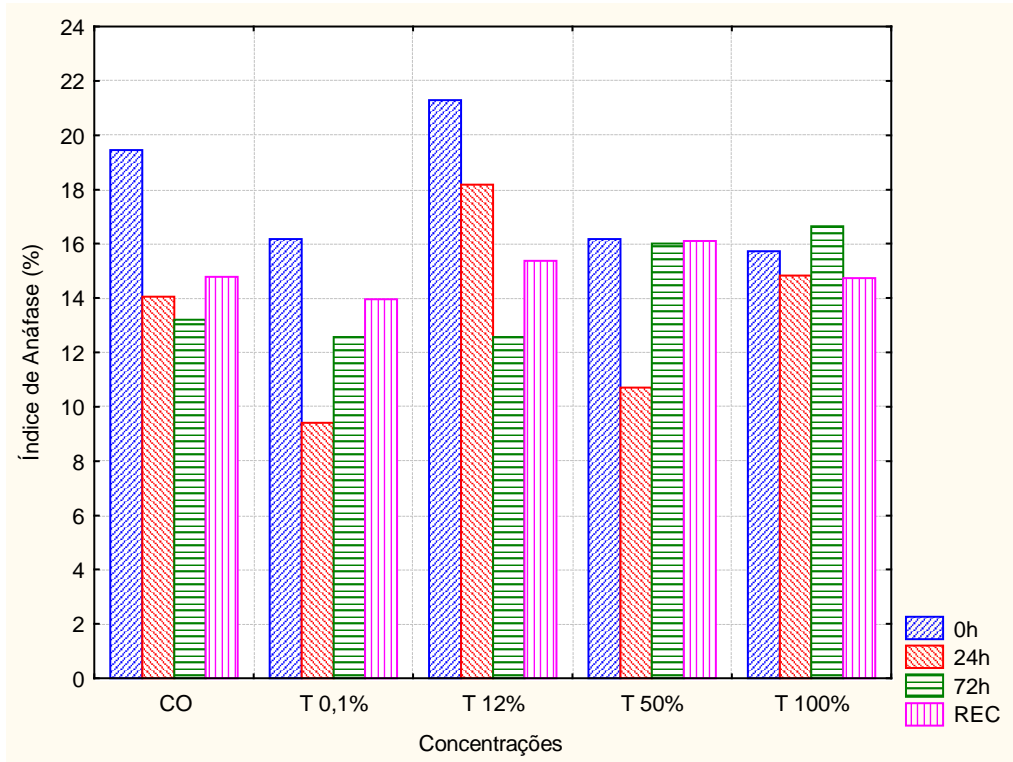


FIGURA 11 – Índices de anáfase (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente tratado (T) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo. REC – recuperação.

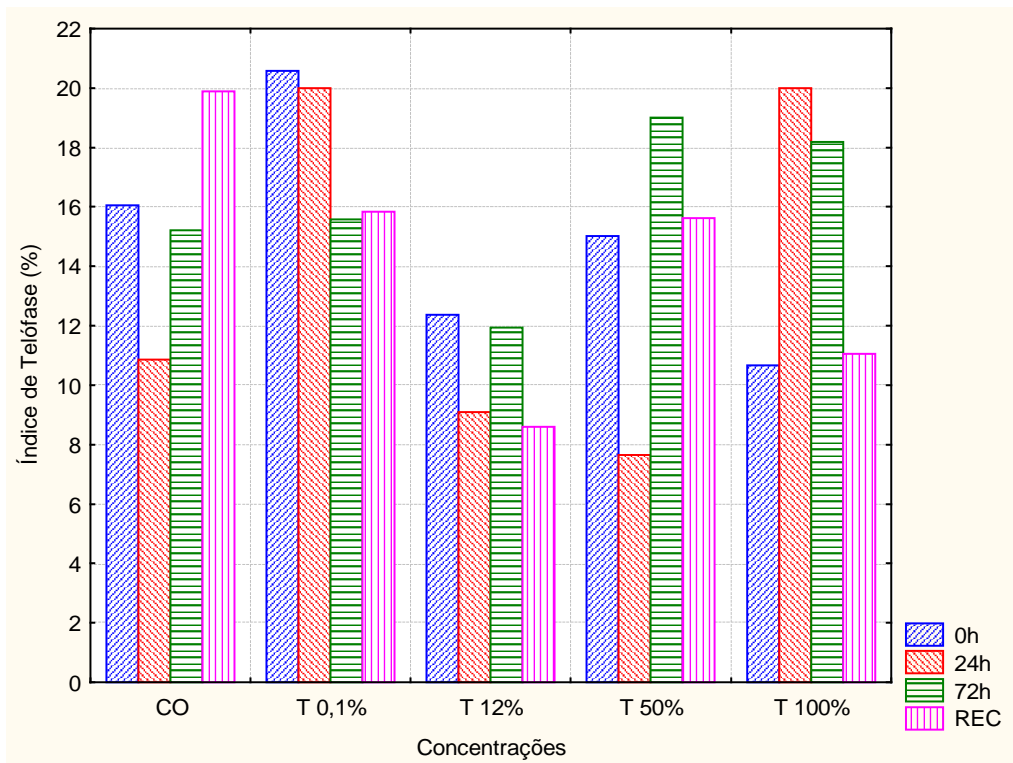


FIGURA 12 – Índices de telófase (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente tratado (T) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo. REC – recuperação.

### **4.3 . FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS ABERRANTES**

Para a avaliação do potencial genotóxico dos efluentes não-tratado e tratado da indústria de papel e celulose, foram consideradas as frequências de células aberrantes (FA) e os tipos de aberrações produzidos, consideradas aqui os seguintes tipos: C-metáfase, ponte anafásica, anáfase desorganizada, células binucleadas, micronúcleos, adesão cromossômica, entre outras.

#### **4.3.1. EFLUENTE NÃO-TRATADO (NT)**

Na Figura 13 estão representadas as FA em raízes submetidas à exposição do efluente não-tratado (NT) e de água não clorada (controle negativo), após 0, 24, 72h e recuperação (24h).

As frequências de células com aberrações (soma de todos os tipos), apresentaram diferenças estatisticamente significativas, ao nível de 5%, quando comparamos as células expostas ao efluente nas maiores concentrações (50% e 100%) por 24h versus controle 24h e período 0h.

Em relação à exposição crônica, somente a concentração de 100% apresentou resultados significantes, quando comparados aos resultados encontrados para o controle 72h e período 0h.

#### **4.3.2. EFLUENTE TRATADO (T)**

Os resultados das frequências de aberrações (FA) das células expostas ao efluente tratado (T) encontram-se na Figura 14, onde se observa que há um padrão próximo ao encontrado para as células expostas ao efluente não-tratado (Figura 13), para o qual somente as duas maiores concentrações apresentaram aberrações.

No período de exposição agudo (24h) ao efluente tratado na concentração de 50%, houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle 24h e ao período 0h; já na maior concentração (100%), esta diferença apresentou-se quando comparada ao controle 24h. Em relação à exposição crônica (72h), as células expostas à concentração de 50% apresentaram diferenças significativas em relação ao período 0h do mesmo grupo. Para a concentração de 100%, foi considerada significativa a diferença quando relacionada com o controle 72h e período 0h. As células expostas à maior concentração e depois submetidas à recuperação apresentaram frequência de aberrações significativas quando comparadas ao grupo controle recuperação.

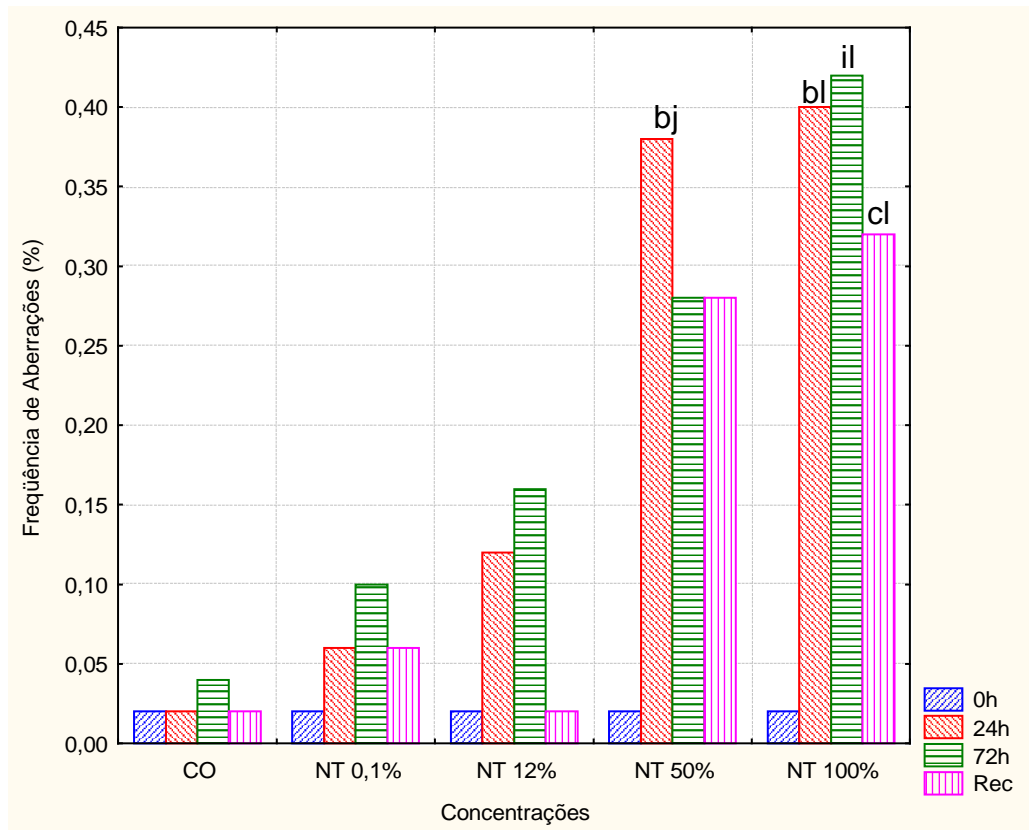


Figura 13 – Frequências de células aberrantes (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente não tratado (NT) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo. REC – recuperação. (b) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao CO 24h; (c) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao CO R; (i) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao CO 72h; (j) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao NT 50% 0h; (l) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao NT 100% 0h.



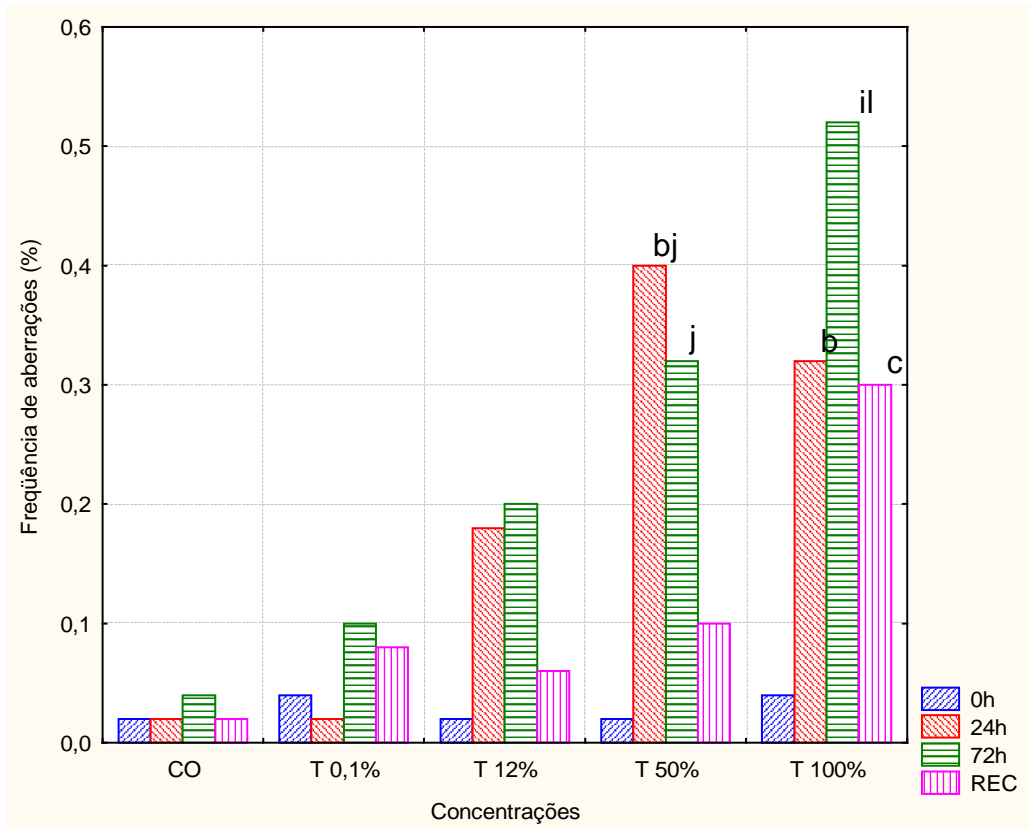


Figura 14 – Frequências de células aberrantes (%) em raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente tratado (T) por 0, 24 e 72 horas e recuperação (24h). CO – controle negativo. REC – recuperação. (b) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao CO 24h; (c) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao CO R; (i) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao CO 72h; (j) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao T 50% 0h; (l) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao T 100% 0h.

#### **4.4. TIPOS DE ABERRAÇÕES**

Para avaliar a que classes de manifestações citológicas pertencem os efeitos produzidos pelos efluentes, não-tratado e tratado, de papel e celulose testados, as aberrações foram classificadas e quantificadas.

O único tipo de aberração encontrada no grupo controle foi a ponte anafásica, na frequência de 0,02% nos controle 0; 24h e recuperação e 0,04% no controle 72h, conforme indica a Tabela II.

##### **4.4.1. EFLUENTE NÃO TRATADO (NT)**

O tipo de aberração encontrada nas células coletadas previamente à exposição com o efluente não-tratado foi o mesmo dos controles negativos, sendo as frequências de 0,02% de pontes anafásicas em todas as concentrações (Tabela II).

Os tipos de aberrações resultantes do tratamento agudo (24h) das raízes com amostra do efluente não-tratado (Tabela III), na concentração de 0,1% foram: Ponte anafásica (0,04%) e C-metáfase (0,02%). Nas células de raízes expostas à concentração de 12%, os tipos de aberrações foram: C-metáfase (0,08%) e Ponte anafásica (0,04%). Na concentração de 50%, as alterações encontradas foram: C-metáfase (0,28%), Ponte anafásica (0,06%) e anáfase desorganizada (0,04%). Já nas células expostas à maior

concentração (100%) do efluente, as aberrações observadas foram: C-metáfase (0,34%) e ponte anafásica (0,06%).

Após exposição crônica (72h), as alterações vistas em células expostas à menor concentração (0,1%) foram: C-metáfase (0,04%), ponte anafásica (0,04%) e anáfase desorganizada (0,02%). Os tipos de aberrações predominantes após a exposição à concentração de 12% foram: C-metáfase (0,10%) e ponte anafásica (0,06%). Na concentração de 50%, as mais comuns foram as pontes anafásicas (0,24%) e C-metáfases (0,04%). Já na concentração de 100%, as C-metáfases (0,26%) e as pontes anafásicas (0,18%) foram as observadas.

Os tipos de alterações predominantes nas células coletadas previamente à exposição ao efluente (recuperação), na concentração de 0,1%, foram as pontes anafásicas, com a frequência de 0,06%. Os tipos vistos na concentração de 12% também foram as pontes anafásicas (0,04%). Já na concentração de 50%, as alterações foram as pontes anafásicas e as C-metáfases, com a frequência de 0,16% e 0,12%, respectivamente. Esses mesmos tipos também foram encontrados nas células expostas ao efluente 100% concentrado, ambas na frequência de 12%.

As alterações já mencionadas, relativas a cada período de exposição e à concentração do efluente não-tratado, encontram-se nas Tabelas II, III, IV e V. As ilustrações das aberrações observadas encontram-se anexadas no final deste trabalho (Anexo A).

TABELA III – Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células coletadas previamente (0h) à exposição ao efluente não-tratado (NT) e controle negativo (CO).

Concentrações/ Aberrações	CO	NT 0,1%	NT 12%	NT 50%	NT 100%
C-metáfase	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ponte anaf.	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Anáf. desorg.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TOTAL (%)	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Total céls Aberr.	01	01	01	01	01

TABELA IV – Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células expostas por 24h ao efluente não-tratado (NT) e controle negativo (CO).

Concentrações/ Aberrações	CO	NT 0,1%	NT 12%	NT 50%	NT 100%
C-metáfase	0,00	0,02	0,08	0,28	0,34
Ponte anaf.	0,02	0,04	0,04	0,06	0,06
Anáf. desorg.	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
TOTAL (%)	0,02	0,06	0,12	0,38	0,46
Total céls Aberr.	01	03	06	19	20

TABELA V – Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células expostas por 72h ao efluente não-tratado (NT) e controle negativo (CO).

<b>Concentrações/ Aberrações</b>	<b>CO</b>	<b>NT 0,1%</b>	<b>NT 12%</b>	<b>NT 50%</b>	<b>NT 100%</b>
C-metáfase	0,00	0,04	0,10	0,04	0,26
Ponte anaf.	0,04	0,04	0,06	0,24	0,18
Anáf. desorg.	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00
TOTAL (%)	0,04	0,10	0,16	0,28	0,44
Total céls Aberr.	02	05	08	14	22

TABELA VI – Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células expostas à água desclorada por 24 (recuperação) após terem sido expostas ao efluente não-tratado (NT) e controle negativo (CO).

<b>Concentrações/ Aberrações</b>	<b>CO</b>	<b>NT 0,1%</b>	<b>NT 12%</b>	<b>NT 50%</b>	<b>NT 100%</b>
C-metáfase	0,00	0,00	0,0	0,12	0,16
Ponte anaf.	0,02	0,06	0,02	0,16	0,16
Anáf. desorg.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TOTAL (%)	0,02	0,06	0,02	0,18	0,32
Total céls Aberr.	01	03	01	14	16

#### 4.4.2. EFLUENTE TRATADO (T)

As aberrações relativas a cada período de exposição e à concentração do efluente tratado encontram-se nas Tabelas VI, VII, VIII e IX.

As alterações encontradas, nas células coletadas antes de serem expostas ao efluente tratado, na concentração de 0,1,% foram: pontes anafásicas (0,06%). Já nas concentrações de 12, 50 e 100%, a única alteração encontrada foi a ponte anafásica, na mesma frequência (0,02%).

Após exposição aguda (24h), as alterações encontradas foram: C-metáfase (0,02%) na concentração de 0,1%; pontes anafásicas (0,10%) e C-metáfases (0,08%) na concentração de 12%; C-metáfases (0,22%), pontes anafásicas (0,16%) e anáfases desorganizadas (0,02%) na concentração 50% concentrada e essas últimas alterações também foram encontradas nas células expostas à maior concentração (100%), porém na frequência de 0,22%, 0,08 e 0,02%, respectivamente.

Os tipos de aberrações encontrados nas células expostas cronicamente (72h) ao efluente tratado, na concentração de 0,1% foram: pontes anafásicas (0,06%) e C-metáfases (0,04%). Na concentração de 12%, foram: C-metáfases (0,16%) e pontes anafásicas (0,04%). Já na concentração de 50%, as aberrações encontradas foram as pontes anafásicas, C-metáfases e anáfases desorganizadas, na frequência de 0,18%, 0,12% e 0,02%, respectivamente. As células expostas à concentração 100% concentrada apresentaram as seguintes aberrações: C-metáfase (0,34%), ponte anafásica (0,14%) e anáfase desorganizada (0,04%).

Os tipos de alterações obtidas nas células coletadas previamente à exposição ao efluente (recuperação) foram: C-metáfases e pontes anafásicas, na mesma frequência (0,04%) na menor concentração (0,1%). O único tipo de aberração visto na concentração 12% concentrada foi a C-metáfase (0,06%). As células anteriormente expostas à concentração de 50% e após 24h em água não clorada apresentaram as C-metáfases (0,08%) e pontes anafásicas (0,02%) como alterações. Já na maior concentração (100%), as aberrações encontradas foram: C-metáfases (0,16%) e ponte anafásica (0,14%).

TABELA VII– Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células coletadas previamente (0h) à exposição ao efluente tratado (T) e controle negativo (CO).

<b>Concentrações/ Aberrações</b>	<b>CO</b>	<b>T 0,1%</b>	<b>T 12%</b>	<b>T 50%</b>	<b>T 100%</b>
C-metáfase	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
Ponte anaf.	0,02	0,06	0,02	0,02	0,02
Anáf. desorg.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TOTAL (%)	0,02	0,06	0,02	0,02	0,02
Total céls Aberr.	01	03	01	01	01

TABELA VIII – Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células expostas por 24h ao efluente tratado (T) e controle negativo (CO).

<b>Concentrações/ Aberrações</b>	<b>CO</b>	<b>T 0,1%</b>	<b>T12%</b>	<b>T 50%</b>	<b>T 100%</b>
C-metáfase	0,00	0,02	0,08	0,22	0,22
Ponte anaf.	0,02	0,00	0,10	0,16	0,08
Anáf. desorg.	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02
TOTAL (%)	0,02	0,02	0,18	0,40	0,32
Total céls Aberr.	01	01	09	20	16

TABELA IX – Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células expostas por 72h ao efluente tratado (T) e controle negativo (CO).

<b>Concentrações/ Aberrações</b>	<b>CO</b>	<b>T 0,1%</b>	<b>T12%</b>	<b>T 50%</b>	<b>T 100%</b>
C-metáfase	0,00	0,04	0,16	0,12	0,34
Ponte anaf.	0,04	0,06	0,04	0,18	0,14
Anáf. desorg.	0,00	0,00	0,00	0,02	0,04
TOTAL (%)	0,04	0,10	0,20	0,32	0,52
Total céls Aberr.	02	05	10	16	26



TABELA XI – Frequências relativas dos tipos de aberrações (%) em células expostas à água desclorada por 24 (recuperação) após terem sido expostas ao efluente não-tratado (T) e controle negativo (CO).

<b>Concentrações/ Aberrações</b>	<b>CO</b>	<b>T 0,1%</b>	<b>T12%</b>	<b>T 50%</b>	<b>T 100%</b>
C-metáfase	0,00	0,04	0,06	0,08	0,16
Ponte anaf.	0,02	0,04	0,00	0,02	0,14
Anáf. desorg.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TOTAL (%)	0,02	0,08	0,06	0,10	0,30
Total céls Aberr.	01	04	03	05	15

#### 4.5. ESTRESSE OXIDATIVO

##### 4.5.1. AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS)

Durante as 24 horas de exposição aos efluentes, não-tratado (NT) e tratado (T), para ambas as concentrações 0,1 e 100%, houve um aumento acentuado, em relação ao controle de 88,3; 87,3; 87 e 88,3%, respectivamente, nos níveis de TBARS (Figura 15).

Após serem expostas aos efluentes, as cebolas foram mantidas por mais 24 horas em água não clorada (período de recuperação, onde se observou a redução, em relação aos períodos de exposição de 96,7% em relação ao efluente não-tratado 0,1%, 94,3%, em relação ao mesmo efluente na concentração de 100%, 96,4%, quando comparado ao efluente tratado na menor concentração e 97,4% em relação ao mesmo efluente na maior concentração.

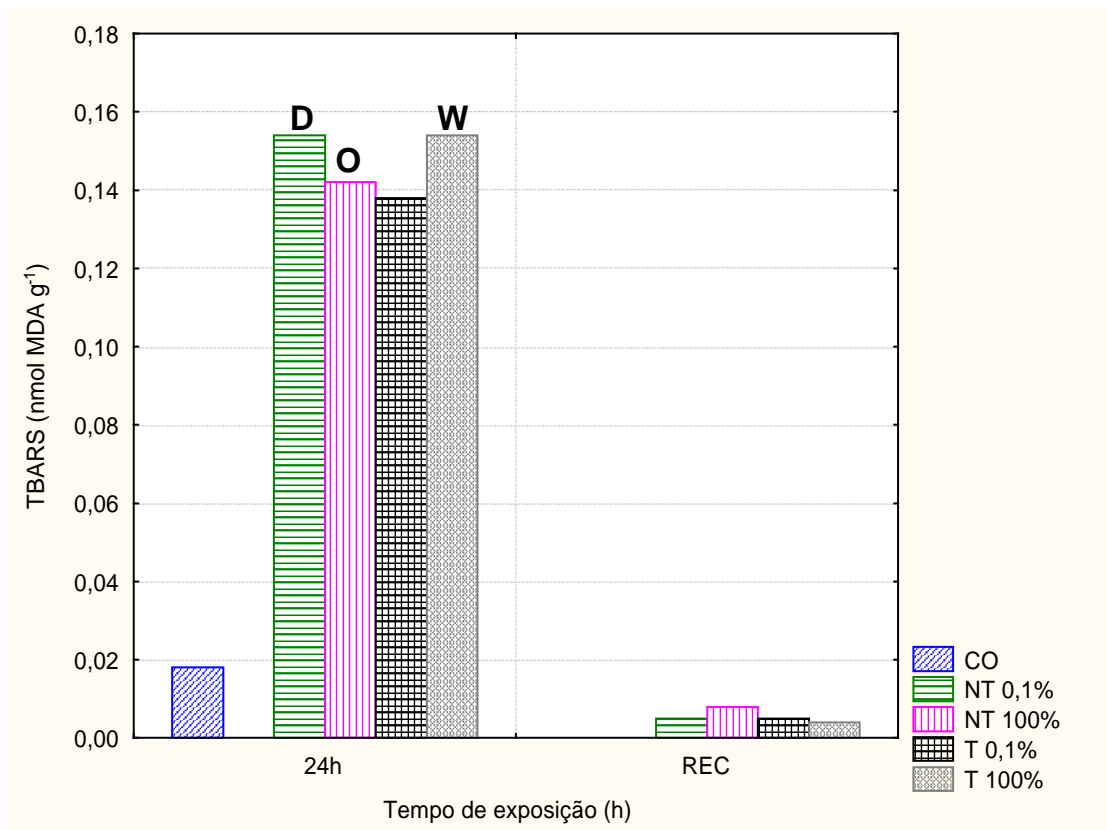


Figura 15 - Índice de peroxidação lipídica (TBARS;  $\text{nmol g}^{-1}$ ) em bulbos de *Allium cepa* expostos à água não clorada cloro (controle negativo – CO), e aos efluentes não-tratado (NT) e tratado (T), nas concentrações de 0,1 e 100%, após período de 24h e recuperação (24h). (D, O, W) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao Controle.

#### 4.5.2. GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

Apesar de se observar, na Figura 16, uma clara curva concentração-dependente, estatisticamente, esses valores dos níveis de GSH, após 24h de exposição aos efluentes não-tratado e tratado e também no período de recuperação, não foram significativos.

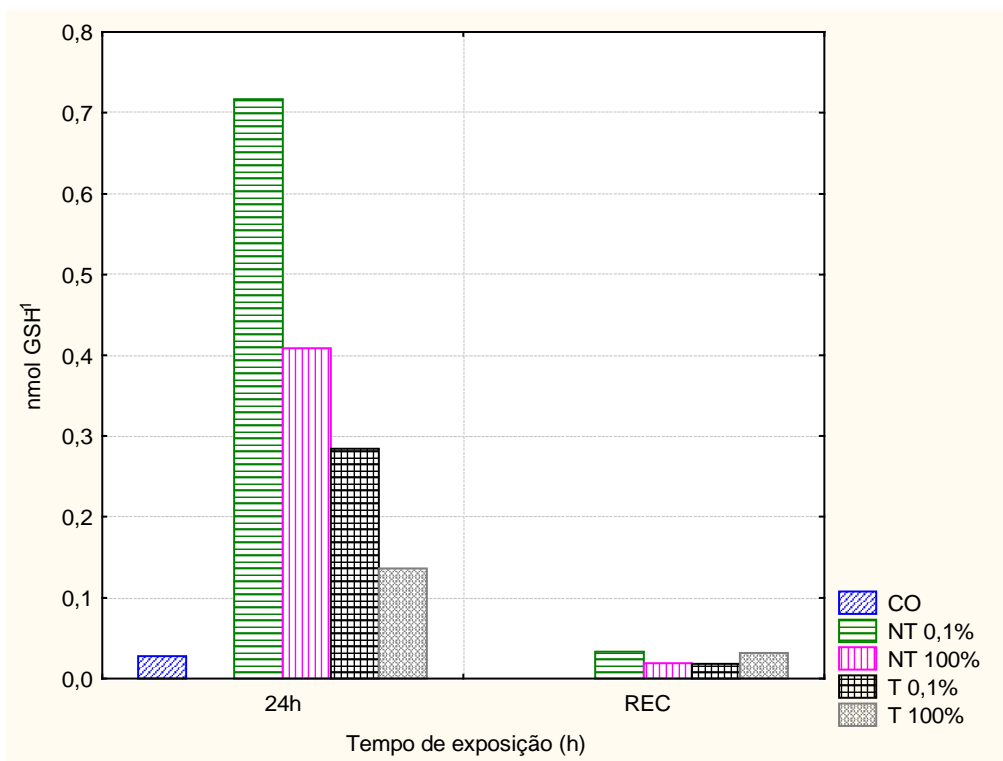
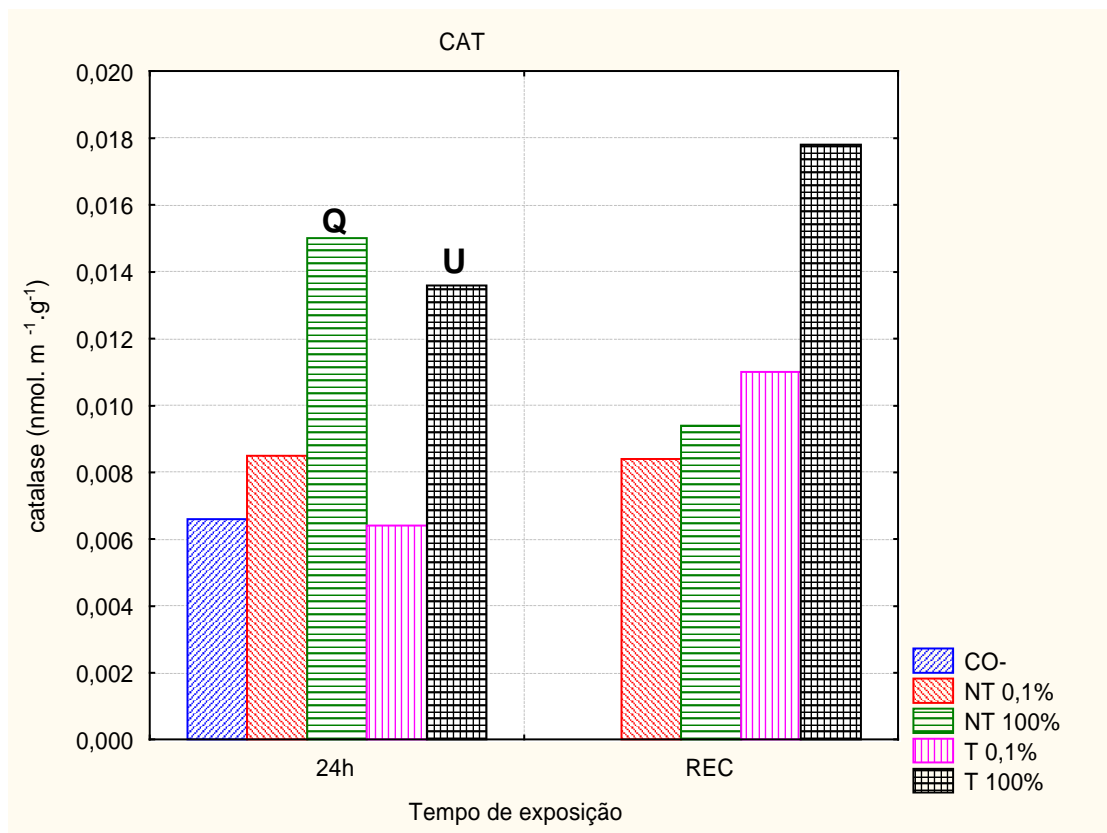


Figura 16 - Concentração de GSH ( $\mu\text{molg}^{-1}$ ) em bulbos de *Allium cepa* expostos à água não clorada cloro (controle negativo – CO), e aos efluentes não-tratado (NT) e tratado (T), nas concentrações de 0,1 e 100%, após período de 24h e recuperação (24h).

### 4.5.3 ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE (CAT)

A atividade enzimática da CAT foi alterada (aumento) significativamente nos bulbos expostos por 24 horas à maior concentração (100%) dos dois efluentes, não-tratado e tratado (Figura 17).



**Figura 17.** Atividade enzimática da CAT ( $\text{mmol de H}_2\text{O}_2$  consumido  $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ ) em bulbos de *Allium cepa* expostos à água não clorada cloro (controle negativo – CO), e aos efluentes não-tratado (NT) e tratado (T), nas concentrações de 0,1 e 100%, após período de 24h e recuperação (24h). (Q, U) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao Controle.

#### 4.5.4 ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

Conforme apresentado na Figura 18, a atividade da GST se apresentou significativamente elevada nas células meristemáticas expostas ao efluente tratado, após 24 horas de exposição em relação ao grupo controle. O maior aumento foi observado na concentração de 100% do efluente tratado (85%), seguida da concentração 0,1% do mesmo efluente.

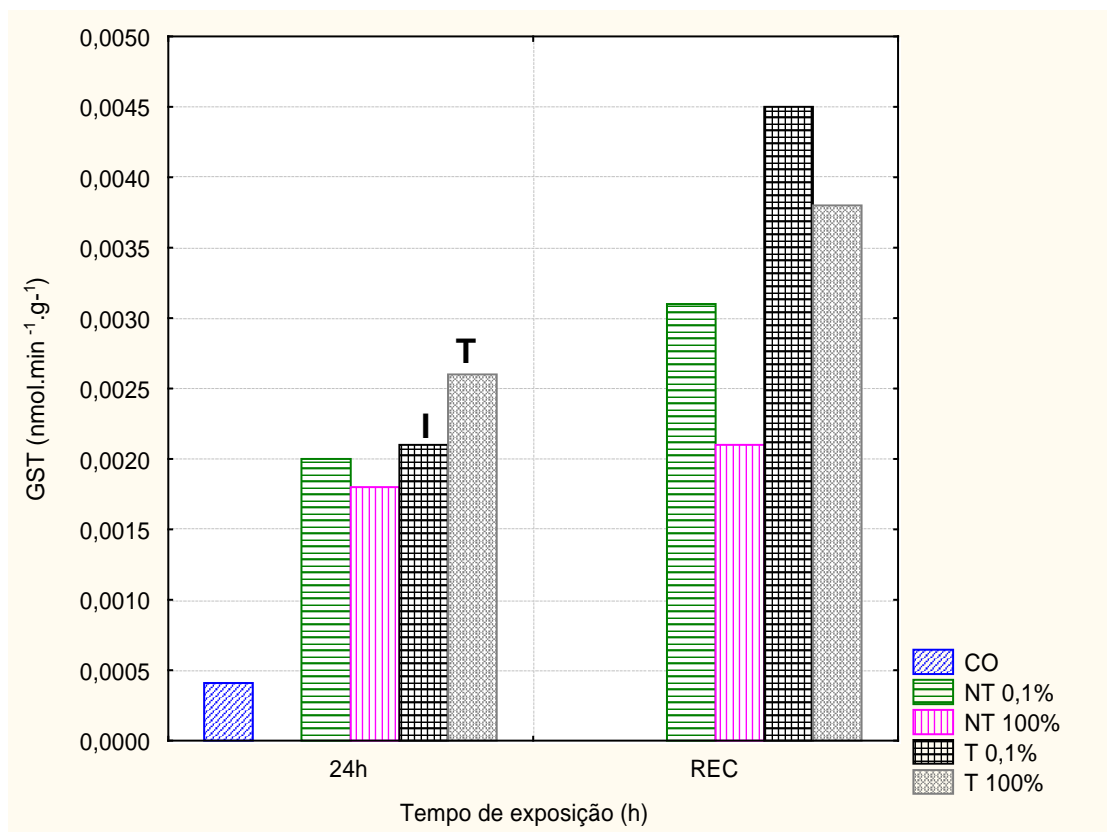


Figura 18. Atividade enzimática da GST ( $\text{nmol de CDNB conjugado min}^{-1}\text{g}^{-1}$ ) em bulbos de *Allium cepa* expostos à água não clorada cloro (controle negativo – CO), e aos efluentes não-tratado (NT) e tratado (T), nas concentrações de 0,1 e 100%, após período de 24h e recuperação (24h). (I, T) – diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao Controle.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DE DANO AO DNA (TESTE COMETA)

A Figura 19 apresenta a frequência de distribuição de cometas, diferenciados em classes conforme a extensão da cauda observada na corrida eletroforetica, para cada grupo analisado (concentração do efluente), ao longo dos períodos de exposição. Os dados para o grupo controle mostram a ausência significativa de danos. Por outro lado, nos grupos expostos a 100% do efluente não-tratado e tratado, houve um aumento na frequência das classes de maior dano (classes 1 e 2) em relação ao grupo controle. Todos os valores são significativos em relação ao controle e quando compara-se as concentrações dos efluentes.

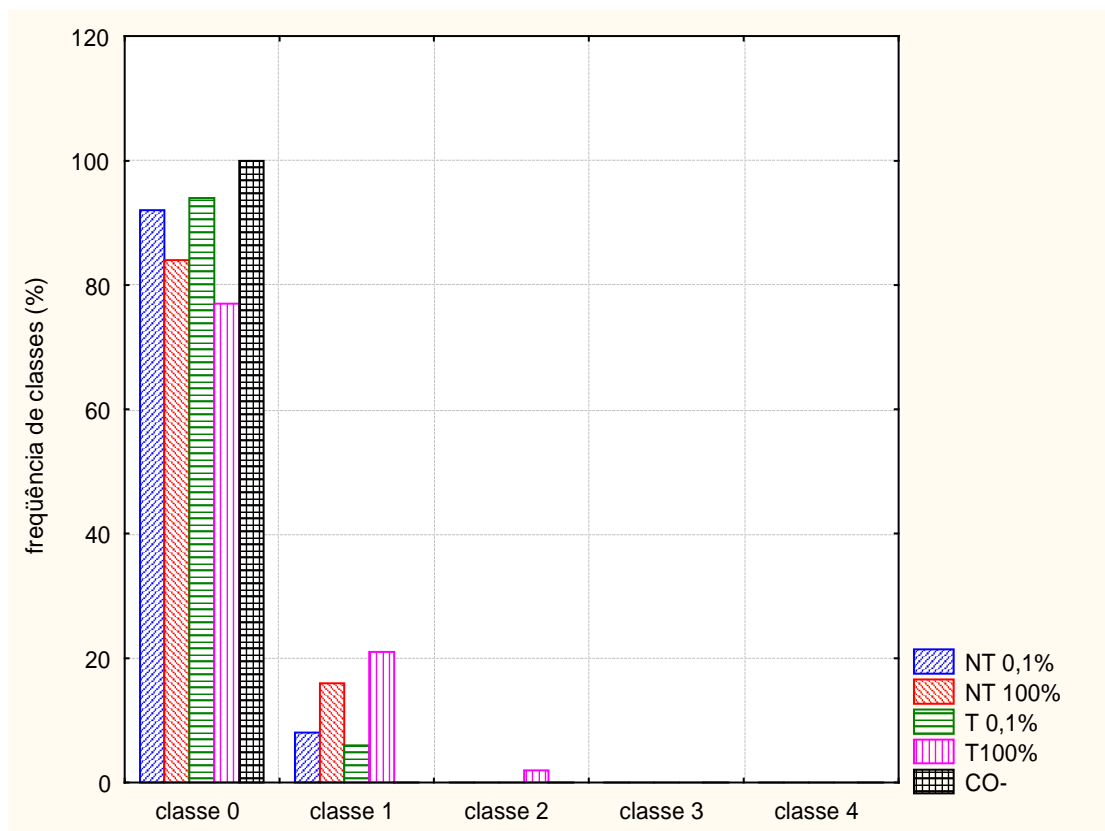


Figura 19 - Frequência das diferentes classes de dano de cometas observados células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* expostas à água sem cloro (CO), a 0,1 e 100% do efluente não-tratado e 0,1 e 100% do efluente tratado. Todos os valores são estatisticamente significativos em relação ao controle.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 ORGANISMO TESTE

O sistema de *A. cepa* foi utilizado para avaliar as variações, no ciclo celular, decorrentes da ação de agentes tóxicos presentes nos efluentes, assim como a presença de alterações celulares e cromossômicas, oriundas de agentes genotóxicos também possivelmente presentes nas amostras de efluentes, além de avaliar alterações nos chamados biomarcadores de estresse oxidativo (defesas antioxidantes e lipoperoxidação).

Conforme já mencionado anteriormente, a escolha do organismo teste seguiu indicação de outros estudos (Fiskejo, 1985; Khors et al.,1997; Rank e Nielsen, 1997, 1998; Kovalchuck et al.,1998; Sahi et al., 1998; Grover e Kaur, 1999; Bailey et al, 2000.; Moraes e Jordão, 2001; Camparoto et al.; 2002; Cantagalli e Vicentini, 2002; Fernandes et al., 2002; Hoshima et al., 2002; Rigonato e Jordão, 2002; Moraes, et al. 2002, Eilers, et al., 2003; Machado et al., 2003; Toledo et al., 2003; Ventura e Marin-Morales, 2003; Fatima e Ahmad, 2005) que mostraram a efetividade desse organismo na avaliação de mutagênese ambiental.

## 5.2 ANÁLISE DO EFEITO CITOTÓXICO (ÍNDICE MITÓTICO)

Em estudo realizado por Smaka-Kincl et al. (1996), a redução do índice mitótico em meristemas de raiz de cebola mostrou ser um método confiável para determinação relativamente rápida de presença de substâncias citotóxicas e para monitoramento dos níveis de poluição citotóxica em ambientes naturais. Segundo os autores, resultados do teste de *Allium* podem indicar a presença de certas substâncias citotóxicas, genotóxicas ou mutagênicas no ambiente, as quais apresentam riscos diretos ou indiretos para todos os organismos vivos.

Assim como no estudo acima citado, a análise dos índices mitóticos (IM) também foi utilizada como parâmetro de citotoxicidade no presente estudo. Este parâmetro foi avaliado de maneira comparativa com o controle negativo, ou seja, com células de *A. cepa* não expostas aos efluentes.

O nível de citotoxicidade pode ser determinado pela taxa de diminuição do índice mitótico. A redução do índice mitótico para valores inferiores a 50% do valor do controle negativo causa efeitos letais nos organismos teste, enquanto uma diminuição menor do que 22%, usualmente tem efeitos subletais. Este nível de 50% é chamado de valor limite de citotoxicidade (Smaka-Kincl et al., 1996).

Para bulbos expostos ao efluente não-tratado em concentração de 0,1%, foi observada a redução do IM, porém, este efeito não foi observado para as demais concentrações, para as quais foram observados aumentos acentuados. Portanto, efeitos antagônicos ao longo da faixa de concentração estudada foram claramente evidenciados. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que o efluente é uma mistura complexa de substâncias, as quais podem ter, e este parece ser o caso em estudo, efeitos diferenciados sobre o parâmetro em avaliação. Segundo Soares (2000), vários componentes do efluente da indústria papelreira, como



clorofenóis, incluindo fenol, 2-clorofenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,6-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, pentaclorofenol, entre outros, podem inibir o crescimento inicial das algas expostas a uma baixa concentração dessas substâncias. É fato bem conhecido (Soares 2000), que o efluente em estudo apresenta teores, ainda que reduzidos – da ordem de ppb, significativos de pentaclorofenol e algumas outras substâncias com prováveis efeitos de herbicida.

Nos bulbos expostos ao efluente tratado, seus IM não diferiram estatisticamente dos controles dos próprios bulbos, exceto para a concentração de 12%, onde houve uma redução significativa. A lagoa de aeração, tecnologia utilizada pela Klabin/Celucat para o tratamento do efluente, tem como objetivos principais promover a diminuição da DBO, DBQ e alterações no pH. Por ser um tratamento aeróbio, provoca alteração significativa no estado de oxidação das substâncias contidas no efluente. Estudos realizados por Yakovleva et al. (2004) demonstraram que existe relação entre o estado de oxidação dos agentes potencialmente genotóxicos e a toxicidade observada. Provavelmente, os efeitos dessas características do tratamento não tenham alterado significativamente os índices mitóticos das células expostas ao efluente tratado (exceto para a concentração 12%).

Quando os índices mitóticos apresentam valores superiores aos encontrados nos controles dos próprios bulbos, significa que houve indução no processo de divisão celular. Essa indução pode ocasionar uma proliferação descontrolada das células e resultar na formação de neoplasias, as quais não foram avaliadas no presente estudo. A redução dos índices mitóticos pode, muitas vezes, comprometer o desenvolvimento e crescimento do organismo, mostrando um efeito citotóxico.

Os dados revelam que o teste de índice mitótico de *Allium cepa* L. constitui um bom parâmetro de avaliação de citotoxicidade de efluentes e despejos. Foi observado, em nossas análises, que todas as células expostas ao efluente tratado não tiveram uma redução, exceto a

concentração de 12%, dos seus índices mitóticos, ao passo que para o efluente não tratado alterações significativas foram detectadas, diferenciando assim os mesmos.

Esses dados corroboram com as citações de Smaka-Kincl et al., (1996), que afirmam que agentes contaminantes despejados em corpos d'água podem alterar, reduzindo ou aumentando, os índices mitóticos das células meristemáticas de *A. cepa*.

### 5.3 ANÁLISE DO EFEITO GENOTÓXICO

O potencial de genotoxicidade das amostras dos efluentes foi avaliado pela frequência de células aberrantes (De La Torre 1997).

Foram realizadas análises em sistema teste de *Allium cepa* L. para avaliar a potencialidade de indução de efeito genotóxico de amostras de efluentes não-tratado e tratado da indústria papelreira Klabin/Celucat. Foram observadas, por meio de células em divisão portadoras de anormalidade, as aberrações cromossômicas para cada tratamento realizado, para todas as concentrações testadas.

As aberrações mais frequentes, observadas nestas análises, foram: C-metáfase, Ponte anafásica e Anáfase desorganizada. Observou-se a presença de células portadoras de interferência no fuso mitótico (inativação), as C-metáfases, em que não se observa a formação da placa equatorial organizada. Essa inativação levaria à formação de células com o dobro do número cromossômico, caracterizando as células ditas poliplóides (Fernandes, 2002).

Com isso, verificou-se que houve um perfil semelhante da frequência de aberrações encontradas nas células expostas tanto ao efluente não-tratado como ao tratado.

#### 5.4 ÍNDICES DE FASES

Os índices de fases são sensíveis às várias modificações químicas e físicas. Um pequeno aumento em uma das fases pode acarretar uma queda proporcional nas outras (González-Fernández, 1966).

No presente estudo, verificou-se que a proporção de células nos diversos estágios da mitose foi alterada em alguns casos, quando as raízes foram submetidas ao tratamento com os efluentes. Assim, por exemplo, na Figura 5, pode ser observado algumas alterações no índice de prófase. As alterações nas fases mitóticas não foram proporcionalmente iguais em todas as fases e poderiam estar relacionadas a possíveis modificações fisiológicas/bioquímicas celulares no período entre as divisões da mesma, as quais podem promover um atraso na entrada das células em divisão, ocasionando baixos índices mitóticos ou, um adiantamento na divisão celular, gerando índices mitóticos mais elevados do que os do controle. Estas alterações nos índices de fase também podem estar relacionadas à produção de frequências elevadas de aberrações celulares em um estágio específico do ciclo celular ou a alterações fisiológicas celulares específicas de determinadas etapas do ciclo (De La Torre et al., 1980).

Analisando os casos em que ocorreu alteração significativa da atividade proliferativa, observou-se que, tanto a redução quanto o aumento dos IM, não foram acompanhadas, na maioria dos casos, por uma queda na frequência relativa de células em uma ou mais fases e por um correspondente aumento na frequência de células em outros estágios determinados do ciclo celular, e que este efeito não se mostrou igualmente distribuído por todas as fases.

As células expostas ao efluente tratado na concentração de 12% nos períodos de 24, 72h e recuperação, também tiveram seu IM reduzido ao limite de citotoxicidade.

Com todos esses resultados, verifica-se que houve uma fase específica da mitose que foi preferencialmente atingida pela ação do efluente não-tratado, a prófase. Para o tratado, a

fase mais atingida foi a metáfase. Há indícios para supor que os componentes destas misturas complexas que constituem os efluentes, tiveram como alvo de sua ação tóxica eventos diferentes da mitose.

## 5.5 FREQUÊNCIA DE ABERRAÇÕES

Nos bulbos expostos ao efluente não-tratado, as frequências de células com aberrações foram altas nas concentrações de 50 e 100% no período de 24h de exposição e também em 72h e recuperação na concentração de 100%, sugerindo uma relação concentração-dependente.

Quando os resultados obtidos a partir dos tratamentos com o efluente tratado, concentrações de 50 e 100%, no período de 24h de exposição, foram comparados com o tempo de exposição 0h e com o grupo controle 24h, verificou-se diferenças significativas. Essa(s) diferença(s) estatisticamente significativas em relação ao tempo zero hora e com o grupo controle também foi observada em relação ao efluente tratado, na mesma concentração (50%) e no mesmo tempo de exposição (24h). Após o tratamento crônico (72h) com o efluente tratado (50%), verificou-se o mesmo fato comparando-se os resultados com os encontrados no tempo zero hora de exposição.

No entanto, é importante destacar que após exposição com o efluente tratado (100%) no tempo de 24h, o índice mitótico não foi alterado e as frequências de células aberrantes mostraram-se significativamente altas. Esta última observação nos levaria a supor que muitas células afetadas teriam sido impedidas de passar para a fase mitótica do ciclo, cuja

consequência lógica seria a redução do índice mitótico. Portanto, neste ponto, os dados produzidos não nos permitem fazer uma clara correlação entre os processos ocorridos. Estudos complementares são necessários.

Por outro lado, a mesma concentração do mesmo efluente, no período de exposição de 72h, apresentou alta frequência de aberrações cromossômicas em relação ao tempo 0h e ao controle 72h. O mesmo fato foi observado nas células expostas ao período de recuperação em relação ao controle recuperação.

## **5.6 TIPOS DE ABERRAÇÕES**

As aberrações mais frequentes não foram específicas por tratamento. De um modo geral, as C-metáfases foram mais frequentes nas células expostas ao efluente não-tratado; já as pontes anafásicas foram mais observadas nas células expostas ao efluente tratado. As anáfases desorganizadas foram encontradas de um modo igual nas células expostas a ambos efluentes.

Segundo Fiskesjö (1993), quebras cromossômicas podem causar fragmentos e pontes anafásicas, a última sendo originada por translocações ou simplesmente por terminações coesivas. Uma ponte anafásica pode resultar, segundo Hall (1994), de quebras que ocorrem no período G2 do ciclo celular, após a replicação cromossômica. As quebras podem ocorrer em ambas as cromátides do mesmo cromossomo e as terminações coesivas podem se unir incorretamente para formar uma união entre as cromátides irmãs. Na anáfase, quando os dois conjuntos cromossômicos movem-se para pólos opostos, a porção da cromatina entre os dois

centrômeros estende-se até o outro lado da célula entre os pólos, impedindo (ou atrasando) a separação das duas células filhas. Os dois fragmentos resultantes das quebras ocorridas em ambas as cromátides podem se unir, mas, uma vez que não há centrômero, eles provavelmente se perderão na primeira mitose. Este tipo de aberração ocorre em células humanas e é essencialmente letal (Giacomelli, 1999).

Os micronúcleos (MN) são originados de fragmentos acêntricos ou tardios, os quais são excluídos do próprio núcleo durante a mitose. Inúmeros agentes químicos são conhecidos por induzirem a formação de MN através de distúrbios do fuso ou de quebra cromossômica. Os MN são revelados na geração subsequente em células na interfase ou prófase (células F1). Desde que os MN são formados nas células interfásicas da F1, uma contagem eficiente não é feita em células meristemáticas em mitose. Desta forma, para contagem de micronúcleos em raízes, é necessário um longo tempo de recuperação envolvendo dois ciclos de mitose após o tratamento. Isto é determinado para a obtenção do dano cromossômico máximo produzido na interfase (G1, S, G2) das células meristemáticas e que, depois, torna-se MN na população de células F1. De uma forma geral, o desenvolvimento das raízes é iniciado no ápice da raiz por divisões mitóticas na região meristemática (aproximadamente 1mm de comprimento acima da coifa da raiz) e as células da F1 movem-se para cima proporcionando um alongamento da estrutura da raiz (Ma et al., 1995).

Neste presente estudo, em função do tamanho da porção da ponta da raiz tomada para o preparo das lâminas citológicas, seguramente, foram analisadas as células meristemáticas pertencentes à geração F1. Ainda assim, MN não foram observados após exposição das diferentes concentrações dos dois efluentes nos tempos de exposição. Não é possível definir se a ausência de MN esteve relacionada com as propriedades das amostras analisadas ou com a inespecificidade do protocolo experimental, que não foi proposto especificamente para este fim.

Segundo Rank e Nielsen (1997), a contagem de MN em células interfásicas não adiciona nenhuma informação sobre clastogenicidade quando apenas comparada com registros de aberrações cromossômicas em células ana-telofásicas. Além disso, a utilização de aberrações cromossômicas tem a vantagem de fornecer informação tanto sobre clastogenicidade como sobre os efeitos no fuso mitótico.

Compreende-se por anáfase desorganizada o fato dos cromossomos dirigirem-se isoladamente aos pólos da célula, como se não estivessem ligadas ao fuso mitótico. Esta alteração mostrou-se mais freqüente nas células expostas às concentrações 12, 50 e 100% do efluente tratado. A anáfase desorganizada é sinal de malformação ou inativação parcial do fuso mitótico.

Segundo Odeigah et al. (1997), a C-metáfase é uma indicação de fraco efeito tóxico, podendo ser reversível. Em todas as C-metáfases, o fuso nuclear é inativado, significando que nenhuma placa equatorial torna-se organizada e que a divisão do centrômero é atrasada. Sendo assim, um tratamento C-metafásico contínuo conduzirá ao dobro de cromossomos nas células que passam por mitose durante o tratamento.

## **5.7 ESTRESSE OXIDATIVO**

São utilizados biomarcadores de defesa oxidante como a glutathiona reduzida (GSH), as enzimas catalase (CAT) e glutathiona s-transferase e a lipoperoxidação (TBARS) para o biomonitoramento de poluentes (GST) (Wilhelm-Filho, 2001; Fatima e Ahmad, 2005).

A determinação das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) é uma medida indireta do processo de peroxidação que ocorre nos lipídios das membranas celulares, principalmente nos ácidos graxos poliinsaturados, por serem mais susceptíveis ao ataque oxidativo das EROs. Dentre os peróxidos de lipídeos formados que reagem com o TBA, destaca-se majoritariamente o malondealdeído, embora outros aldeídos e compostos como açúcar, aminoácidos e bilirrubina podem reagir também com o TBA (Meagher e Fitzgerald, 2000).

No presente trabalho, os níveis de TBARS verificados tanto nos bulbos expostos às concentrações de 0,1 e 100% do efluente não-tratado como em 100% do efluente tratado durante 24 horas mostraram-se significativamente elevados (Figura 13). Decorridas 24 horas em água desclorada, após a permanência em contato com os efluentes, o dano tecidual nesses bulbos foi reduzido e os níveis de TBARS não apresentaram diferenças significativas com relação ao grupo controle. A ausência de dano após o período de recuperação, poderia provavelmente constituir uma resposta adaptativa dos bulbos expostos a um período de tempo maior ou pela ausência do contato direto com os efluentes, refletida na própria depuração dos bulbos associada à elevação das defesas antioxidantes, como a elevação das GSH e das enzimas citoprotetivas (CAT e GST). Observando a Figura 15, fica claro que não houve diferenças entre o tipo e a concentração do efluente, pois os níveis de TBARS foram altos em ambos efluentes e ambas concentrações.

A alteração nas defesas antioxidantes representa um mecanismo de defesa celular para combater a toxicidade das EROs e que tem sido muito usada em vários estudos para determinar a toxicidade dos poluentes (Wilhelm Filho, 1996). A GSH é o principal tiol não protéico associado a uma variedade de funções celulares. Dentre essas funções, duas estão envolvidas na detoxificação, como na conjugação com intermediários eletrofílicos, principalmente via atividade da GST na fase II da biotransformação e participando como um



importante antioxidante pela neutralização direta, não enzimática, de metabólitos reativos (Gallagher e Di Giulio, 1992.). Por outro lado, existe uma consistente correlação entre o elevado nível de GSH endógena e a proteção contra exposição a xenobióticos, incluindo os derivados da indústria papelreira ( Wilhelm-Filho et al., 1997; Fatima e Ahmad, 2005).

Os resultados mostraram que o nível de GSH sofreu um aumento em relação ao controle para todas as condições avaliadas (Figura 16).

No presente estudo, os níveis de GSH e a concentração de TBARS mostraram uma correlação diretamente proporcional, ou seja, enquanto os níveis de TBARS estiveram elevados durante as 24 horas de exposição, o conteúdo de GSH sofreu alteração significativa nos mesmos períodos. Isso indica que o mecanismo de defesa celular através do aumento da GSH não foi suficiente para compensar a toxicidade oriunda da exposição. Este fato pode contribuir para explicar os danos observados pela exposição aos efluentes.

Também a atividade enzimática da CAT foi aumentada significativamente nos bulbos expostos aos efluentes de papel e celulose, principalmente na maior concentração, tanto do efluente não-tratado, como do efluente tratado, sendo que a concentração de 0,1% deste último não sofreu aumento (Figura 17). O aumento da atividade da CAT sugere a presença de compostos tóxicos nos efluentes que tenham favorecido mecanismos bioquímicos de formação de peróxido de hidrogênio. Tal condição pode potencializar a produção do radical hidroxil, via reação de Haber-Weiss (Fatima e Ahmad, 2005).

Portanto, este aumento progressivo da atividade enzimática poderia estar relacionado com uma resposta adaptativa do bulbo frente a uma exposição continuada aos poluentes tóxicos dos efluentes de papel e celulose. De forma semelhante, no peixe *Channa punctatus* exposto a 1% do efluente da indústria de papel, a atividade da CAT esteve aumentada, com relação ao controle, após 60 e 90 dias de exposição (Ahmad et al., 2000). Resultados anteriores obtidos em nossos laboratórios indicaram que o efluente em estudo promove a

produção de estresse oxidativo em peixes (tilápia) e que a indução de níveis mais elevados de CAT constitui um mecanismo de defesa importante (Wilhelm-Filho et al., 1997).

O aumento concomitante das atividades da CAT frente à exposição por poluentes que induzem estresse oxidativo também tem sido demonstrado por outros trabalhos. Siraj e Rani (2003) observaram que as atividades da CAT e SOD estavam aumentadas no fígado de tilápias expostas durante 7, 15 e 30 dias à concentração sub-letal de cádmio. O aumento da CAT também foi observado por Wilhelm et al. (1997) em tilápias expostas aos efluentes de papel e celulose utilizados neste trabalho. Entretanto, Fatima e Ahmad (2005) observaram valores de CAT próximos ao do controle em células meristemáticas de cebola expostas a metais pesados.

As GSTs têm sido reportadas como biomarcadores para avaliar o impacto ambiental de compostos orgânicos que geram estresse oxidativo, além de estarem envolvidas na detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos reativos (Di Giulio et al., 1995). A atividade da GST esteve aumentada significativamente (Figura 18) nos bulbos expostos às concentrações 0,1 e 100% do efluente tratado, após 24 horas de exposição, sugerindo a existência de processos oxidativos de biotransformação, particularmente fase I, com a geração de metabólitos reativos.

Da mesma forma, é possível que o aumento da atividade da GST, após exposição aos efluentes de papel e celulose, deva-se à participação desta enzima na manutenção celular das defesas antioxidantes. Como salientado por Stephensen et al. (2002), embora as GSTs não sejam enzimas relacionadas diretamente com a defesa antioxidante celular, elas contribuem indiretamente com esse mecanismo, uma vez que podem conjugar GSH a produtos gerados durante a lipoperoxidação das membranas. Neste sentido, é importante ressaltar que a indução da GST coincidiu com o aumento dos níveis de GSH observado no mesmo período nesses animais. Esse aumento da atividade da GST com a concomitante elevação dos níveis

da GSH tem sido demonstrado em outros trabalhos utilizando peixes (Wilhelm Filho, 1997; Pandey et al.; 2003; Sayeed et al., 2003).

Nos bulbos em período de recuperação anteriormente expostos às concentrações 0,1% e 100% de ambos os efluentes (exceto a concentração 100% do efluente não-tratado), observou-se um aumento de GST em relação ao período de 24 horas, sugerindo que a retirada do organismo do contato com o xenobiótico não é suficiente para diminuir a produção de metabólitos reativos ou não constitui tempo suficiente para afetar os mecanismos de controle da indução/produção da enzima, apesar de não se estar medindo a expressão da enzima e sim, a sua atividade.

## 5.8 DANOS AO DNA

As principais espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, e o radical hidroxil) podem potencialmente atacar qualquer estrutura celular ou molécula. Contudo, com respeito ao envelhecimento e o câncer, o DNA é considerado o principal alvo de ataque. A modificação oxidativa das bases do DNA pode resultar em mutação, ao passo que a oxidação das unidades de desoxirribose pode induzir à liberação de bases ou quebra nas fitas de DNA (Zwart et al., 1999).

Neste estudo houve uma maior frequência das classes 1 e 2 nas células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* (Figura 19) expostas por 24h ao efluente tratado concentrado (100%), quando comparado ao controle negativo, o que significou uma maior fragmentação do DNA.

Claxton e colaboradores (1998), numa pequena revisão, mencionaram estudos onde o tratamento de efluente da indústria de polpa e papel de celulose, em lagoas de aeração, conseguiu reduzir ou eliminar a genotoxicidade desse efluente após o tratamento. Contudo, em muitos outros casos, conforme citado pelos autores, o processo de remediação pode elevar a genotoxicidade de certos efluentes. Por exemplo, a biorremediação de óleo cru usando certas espécies de fungos, aumentou o potencial genotóxico do óleo, ao invés de diminuí-lo.

No presente estudo, embora ainda sejam necessários estudos complementares, existem evidências suficientes para supor uma possível participação de EROs nos processos de toxicidade observados, apesar de que não foram detectadas as classes 3 e 4, representativas de maior dano ao DNA.

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- O índice mitótico pode ser usado como um eficiente parâmetro para a avaliação do potencial de citotoxicidade de efluentes.
- As atividades proliferativas das células expostas às concentrações 12, 50 e 100% do efluente não-tratado mostraram-se significativamente elevadas em todos os tempos de exposição, indicando uma maior proliferação celular, podendo resultar na formação de neoplasias.
- As atividades proliferativas das células mostraram-se reduzidas após 24, 72h de exposição ao efluente tratado na concentração de 12%, assim como nas células expostas ao efluente não-tratado, na concentração de 0,1%, indicando uma disfunção do controle do ciclo celular.
- Aparentemente, a fase do ciclo mitótico mais atingida pelo efluente não-tratado foi a prófase, e para o efluente tratado, a metáfase, resultados que estão de acordo com aqueles existentes na literatura.
- As frequências de células aberrantes foram altas nas células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* expostas aguda (24h) e sub-cronicamente (72h) aos efluentes não tratado

e tratado nas concentrações de 50 e 100%, sugerindo um claro efeito concentração-dependente.

- As C-metáfases, pontes anafásicas e anáfases desorganizadas foram os tipos de aberrações encontradas em células expostas tanto no efluente não-tratado como no tratado, revelando que o tratamento industrial não evitou o surgimento destes tipos de alterações.
- As frequências de aberrações resultantes de quebras cromossômicas e, portanto, irreversíveis, foram maiores nas células expostas ao efluente tratado do que naquelas expostas ao efluente não-tratado sugerindo que o tratamento utilizado pela indústria não foi eficaz para evitar o aparecimento destas aberrações.
- A determinação dos níveis de TBARS e GSH e a indução das enzimas citoprotetivas (CAT e GST) mostraram ser ferramentas bastante úteis e sensíveis no diagnóstico de agentes poluidores, mas não permitiu uma clara distinção entre os efluentes não-tratado e tratado. Os níveis de TBARS e GSH, após 24h de recuperação voltaram aos do controles, enquanto que as enzimas mantiveram níveis semelhantes à exposição de 24h.
- As duas concentrações (0,1 e 100%) de ambos os efluentes apresentaram cometas (dano ao DNA) de classe 1 e a concentração de 100% do efluente tratado apresentou cometas de classe 2, indicando um maior efeito genotóxico, apesar de que as classes 3 e 4, indicadoras de maior fragmentação do DNA, não foram detectadas, indicando uma menor sensibilidade do teste.

- O organismo bioindicador (*Allium cepa*) selecionado para avaliação da toxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo dos efluentes de papel e celulose demonstra ser um bom indicador da qualidade dos efluentes avaliados, uma vez que foram capazes de detectar o grau de toxicidade do efluente em diferentes concentrações, bem como de diferenciar a toxicidade de um efluente não-tratado e tratado.
- Evidentemente que a mesma abordagem pode ser aplicada a populações humanas suspeitas de exposição a agentes citotóxicos e genotóxicos, e isso é até desejável. No entanto, os resultados preliminares obtidos com o organismo utilizado neste trabalho permitem uma previsão, para não falar em extrapolação, do que pode acontecer ou estar acontecendo com o material genético das populações humanas. Portanto, a utilização dessa última abordagem permite postergar o estudo de populações humanas para um momento em que os resultados preliminares com os organismos aqui utilizados sugerirem um perigo real de citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo e não apenas uma suspeita de risco.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.

AGENDA 21. Proteção da qualidade e do abastecimento dos recursos hídricos: aplicação de critérios integrados no desenvolvimento, manejo e uso de recursos hídricos. **A água em Revista – Suplemento das Águas**, p. 14-33, 1996.

AHMAD, I. et al. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1523, p. 37-48, 2000.

ARAMBASIC, M. B.; BJELIC, S.; SUBAKOV, G. Acute toxicity of heavy metals, phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* St.: comparative investigation and the practical applications. **Water Research**, v. 29, p. 497-503, 1995.

ARAÚJO, E.J.A. et al. Efeito de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). **Acta Scientiarum** 23(2): 391-399, 2001.

AU, W.W.; RIBEIRO, L.R. Estratégias para a condução de estudos em monitoramento genotóxico de populações humanas. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K (org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, p. 335-347, 2003.



BAILEY, D. A.; NELSON, P. V.; FONTENO W.C. **Substrates pH and water quality.** Raleigh: North Carolina State University, 2000. Disponível em: <<http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/floriculture/plugs/ph.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2004.

BAINY, A.C.D. Oxidative stress in gill erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology** v. 34, n2, p. 151-162, 1996.

BEUTLER, E.; DURAN, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory Clinic Medicine**, v. 61, p. 882-890, 1963.

BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 90, p. 105-110, 1984.

BORGES-OSÓRIO MR; ROBINSON WM: **Genética Humana.** Ed. Universidade/UFRGS/Artes Médicas, 1993.

BORTON, D. L., et al. Comparison of bioindicators to reproduction during fathead minnow (*Pimephales promelas*) life-cycle tests with kraft mill effluents. **Preprints of the 3rd International Conference on Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents**, p. 277-286, 1997.

BRACELPA - Associação Brasileira de Celulose e Papel. **Relatório Estatístico**, São Paulo, 1998.

BRACELPA - Associação Brasileira de Celulose e Papel. **Relatório Estatístico**, São Paulo, 2000. Disponível em:

<http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sdp/proAcao/forCompetitividade/impZonLivComercio/12papelceluloseresumo.pdf>. Acesso dia 12 de novembro de 2005.

BREUSEGEM, F.V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science** 161: 405-414, 2001.

BUENO, A.M.S. Utilização de roedores no biomonitoramento citogenético *in situ*. **Tese apresentada ao Instituto de Biociências da USP para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas**. São Paulo, 164 p. 1997.

CAMPAROTO, M.L. et al., Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth. Infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, v.25 (1), p.85-89, 2002.

CANTAGALLI, L.B.; VICENTINI, V.E.P. Estudo da ação mutagênica do antiinflamatório Viox, indicado no tratamento dos sintomas da artrite, em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*. **Arquivos Apadec**, Maringá, vol.6 (suplemento), p. 12, Nov. 2002. Resumo.

CHAUHAN, L.K.S.; GUPTA, S.K. Combined cytogenetic and ultrastructural effects of substituted urea herbicides and synthetic pyrethroid insecticide on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 82, p. 27-35, 2005.

CHERUBIN, M. Introdução ao processo de extração de celulose e fabricação de papel. São Paulo: **ABTCP**, 21 p. 1999.

CLAXTON, L. D., HOUK, V. S., HUGHES, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, v. 410, p. 237-243, 1998.

COLLINS, A. R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S. J. The kinetics of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. **Mutation Research**, v. 336, p. 69-77, 1995.

CONNOR, J.A.; FERGUNSON, M.A. **Essential medical genetics**. Smith Blackwell Scientific Publications. London, 260pp, 1993.

CONSTANTIN, M. J. Plant genetic systems with potential for the detection of atmospheric mutagens. In: Tice, R. R., Costa, D. L. and Schaich, K. M. (Eds) **Genotoxic Effects of Airborne Agents**, Plenum Press, New York, London, pp. 159-177, 1982.

CÓRDOBA-PEDREGOZA, M.C. et al. Zonal changes in ascorbate and hydrogen peroxide contents, peroxidase, and ascorbate-related enzyme activities in onion roots. **Plant Physiology**, v. 131, pp. 697-706. 2003.

COSTA, R.M.A; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biociência: Ciência & Desenvolvimento**. Ano 2, número 12: 24-26, 2000.

COTELLE S.; FÉRARD J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 34, p. 246-255, 1999.

DEAN, C.E.; PENA, C.; VARADY, R.; SUK, W.A.; Environmental health and hazardous waste issues related to the US-Mexico border. **Environmental Health Perspectives** 104: 590-594, 1996.

DEL LA TORRE et al. Onset of cell proliferation in dormant roots of *Allium cepa* L. bulbs. Kinetic analysis. **Biology Cell** 38, p. 95-104, 1980.

DEL LA TORRE et al. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. **Mutation Research**, v. 389, n.2, p. 271-277, 1997.

DEN BESTEN, P. J. Concepts for the implementation of biomarkers in environmental monitoring. **Marine Environmental Research**. 46, 253-256, 1998.

DEROSA, C.T. et al. Public health implications of hazardous waste sites: findings, assessment and research. **Food Chemical Toxicology** 34: 1131-1138, 1996.

DEVAUX, A. et al. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). **Marine Environmental Research**, v. 46, p. 257-262, 1998.

DI GIULIO, R. T. et al. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: **Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment.**

RAND, G. M. (ed.) 2ed. Taylor & Francis, p. 523-560, 1995.

EILERS, V.; QUINZANI-JORDÃO, B.; MORAES, D.S.L. Evaluation of the toxic, cytotoxic and genotoxic potentials of wastewaters of Corumbá, South Mato Grosso (MS), in Brazil, in *Allium cepa* roots. **Genetic and Molecular Biology** v.26 (2), suppl., p. 127, 2003.

FALKENMARK M, ALLARD B. Water Quality and disturbances of natural freshwaters. In: Hutzinger O, editor. **The handbook of environmental chemistry. Part A - Water pollution.** Berlin: Ed. Springer Verlag; v. 5. p. 46-78, 1991.

FATIMA, R.A.; AHMAD, M.. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. **Science of the Total Environment** 346: 256 – 273, 2005.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, 455: 81-95, 2000.

FERNANDES, T.C.C.; VENTURA, B.C.; MARIN-MORALES, M.A. O uso do teste de micronúcleo na detecção de genotoxicidade do herbicida Trifluralina, utilizando células meristemáticas de *Allium cepa*. In: **Relação de trabalhos do Congresso Nacional de Genética**, 48, 2002.

FISKEJO, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Lund, v.102, p. 99-112, 1985.

FISKESJÖ, G. The Allium test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality: An international journal**, v. 8, p. 291-298, 1993.

FISKESJÖ, G. *Allium* test II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberration in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology and Water Quality: An international journal**, v. 9, p. 235-241, 1994.

FONSECA, J.A.V.M. et al. Tratamento de efluentes líquidos de indústria de papel e celulose. **III Fórum de estudos contábeis, 2003.** Disponível em: <http://www.ceset.unicamp.br/ite/Artigos/3fec2415.pdf>. Acesso em: 22 de novembro de 2005.

GAGNON, M. M. DODSON, J. J. AND HODSON, P. V. Ability of BKME (bleached kraft mill effluent) exposed white suckers (*Catostomus commersoni*) to synthesize steroid hormones. **Comparative Biochemistry and Physiology** v. 107, p. 265–273, 1994.

GAGNON, M. M. et al. White sucker (*Catostomus commersoni*) growth and sexual maturation in pulp mill-contaminated and reference rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry** v. 14, p. 317–327, 1995.

GALLAGHER, E. P.; DI GIULIO, R. T. 1992. A comparison of glutathione-dependent enzymes in liver, gills and posterior kidney of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 102, p. 543-547, 1992.

GIACOMELLI, F.R.B. Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Aveia sativa*) recomendadas para a região sul. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. 1999.

GOLDFARB, P.; LIVINGSTONE, D.; BURMELIN, C. Biomonitoring in the aquatic environment: use of molecular biomarkers. **Biochem. Soc. Transac.** 26,690-694, 1998.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F.; JIMÉNEZ-MARTIN, G. Duration of the cell division cycle and its dependence on temperature. **Zeitschrift für Zellforschung** 75, p. 591-600, 1966.

GRANT, W.F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**, v.426, p. 107-112, 1999.

GRAY, J.S. Effects of environmental stress on species rich assemblages. **Biological Journal of the Linnean Society**, 37, p. 19 – 32, 1989.

GROVER, I.S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium cepa* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, v.426, p. 183-188, 1999.

HACON, S.S. Ecotoxicologia. In: **As bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. Coordenadores F.A. de Azevedo, A.A. M. Chasin. Rima Editora e InterTox. São Carlos, SP, Brasil, 2003.

HALL, J.B. DNA strand breaks and chromosomal aberrations. **Radiobiology for the radiologist**, 4 ed., Lippincott Company, Philadelphia, pp. 15-27, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Oxford University Press, 543 p. 1989.

HASSPIELER, B. M.; BEHAR, J. V.; DI GIULIO, R. T. Glutathione-dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bulhead (*Ameiurus nebulosus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 28, p. 82-90, 1994.

HOSHINA, M.M.; MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Avaliação da possível ação genotóxica de efluentes domésticos despejados no Ribeirão Claro/Município de Rio Claro, usando *Allium cepa* como organismo teste. **Relação de trabalhos do Congresso Nacional de Genética**, 48., 2002.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review. **Mutation Research** v. 277, p. 91-138, 1992.

JANZ, D. M. et al. Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. **Toxicology and Applied Pharmacology** v. 147, p. 391–398, 1997.

JIMENEZ, B.D.; STEGEMAN, J.J. Detoxication enzymes as indicators of environmental stress on fish. **American Fisheries Society Symposium**, v.8, p.67-79, 1990.



KAPPUS H. Oxidative stress in chemical toxicity. **Archives of Toxicology**, v. 60, p. 144–149, 1987.

KARELS A E.; NIEMI A . Fish community responses to pulp and paper mill effluents at the southern Lake Saimaa, Finland. **Environmental Pollution** v.116, p. 309-317, 2002.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities from glutathione S-transferase. **Journal of Biologic Chemistry**, v.251, p.6183-6188, 1976.

KHORS, S.S.; PANDA, K.K.; PANDA, B.B. Genotoxicity of tetrodoxin from buffer fish tested in root meristems cells of *Allium cepa* L. **Mutagenesis**, v.12, p. 265-9, 1997.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, 504 (1-2): 137-148, 2002.

KOVALCHUCK, O. et al. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soil of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research**, v.415, p. 1-20, 1998.

LARINI, L. Toxicidade dos praguicidas. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo:Manole, p. 9-18, 1999.

LEÃO, F. C. **Estrutura Produtiva e Organizacional do Setor de Papel e Celulose no Estado de Santa Catarina**. Centro Sócio Econômico, UNIPLAC, SC., pp.124, 2001.

LEMOS, C.T.; TERRA, N.R. Poluição: Causas, Efeitos e Controle. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (org.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, p. 117-144, 2003.

LÓPEZ, M. P.; VALINÃS, C. N.; RIOL, M. J. M. Glutathione S-transferase cytosolic isoforms as biomarkers of polychlorinated biphenyl (Arochlor-1254) experimental contamination in rainbow trout. **Toxicology Letters**, v. 136, p. 97-106, 2002.

MA, T.H.; XU, C. et al. The improved *Allium* /*Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185-195, 1995.

MACHADO, M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Análise do potencial genotóxico das águas do rio Paraíba do Sul, por meio de verificação de aberrações cromossômicas em *Allium cepa*. **Genetic and Molecular Biology** v.26 (2), suppl., p. 198, 2003.

MANNING, W.J.; FEDER, W.A. **Biomonitoring air pollutants with plants**. Applied Science Publishers. 142pp, 1980.

MARCANO, L. et al. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, 94, p. 221-226, 2004.

MATSUMOTO, S.T. et al. Avaliação genotóxica de um Córrego, Município de Franca/SP, que recebe efluente de curtume, utilizando *Allium cepa* como organismo teste. **Genetics and Molecular Biology** 26 (suppl.), p. 200, 2003.

MATSUMOTO, S.T. et al. Mutagenic Potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**, v 69, n.4, p. 399-408, 2004.

MATSUMOTO, S.T. Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP. **Tese (doutorado)**, 216p. Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto-SP, 2004.

MCCARTHY, J.F. et al. Preexposure to 3-methylcholanthrene increases benzo [a]pryeno adducts on DNA of bluegill sunfish. **Marine Environmental Research**, Barking, v.28, n. 1-4, p. 323-328, 1989.

McMASTER, M. E. et al. Detection of steroid hormone disruptions associated with pulp mill effluent using artificial exposure of goldfish. In: SERVOS, M. R, MUNKITTRICK, K. R., CAREY J. H.; VAN DER KRAAK, G. J., Editors, Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents. **Proceedings of the 2nd International Conference on Environmental Fate and Effects of Bleached Kraft Mill Effluents**, St. Lucie, Delray Beach, p. 425-437, 1996.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 202-226, 2000.

MINISSI, S.; LOMBI, E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. **Mutation Research**, v.39, p. 317-321. 1997.

MORAES, D.S.D.; JORDÃO, B.Q. Evaluation of the genotoxic potential of municipal wastewater discharged into the Paraguay river during periods of flood and drought. **Environmental Toxicology**, v.16, p. 113-116. 2001.

MORAES, D.S.L. et al. Investigação da atividade mutagênica de efluente municipal pelo teste de *Allium*. **Relação de trabalhos do Congresso Nacional de Genética**, 48., 2002.

MUNKITTRICK, K. R. et al. Changes in maturity, plasma sex steroid levels, hepatic mixed function oxygenase activity, and the presence of external lesions in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) exposed to bleached kraft mill effluent. **Journal of Fishery.Aquatic Sciences**. v. 49 p. 1560–1569, 1992.

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research**, 504 (1-2): 3-16, 2002.

NATARAJAN, A.T.; OBE, G. Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: Cytogenetic Assays in Mutagenicity. **New Horizons in Genetic Toxicology**. Ed. By J.A. Heddle. Academic Press, New York, 213pp., 1982.

NETO, G. C. Decomposição de fenol e efluente da indústria de papel e celulose por fotocatalise heterogênia. **Dissertação** de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

OBE, G. et al. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research** 504 (1-2): 17-36, 2002.

ODEIGAH, P.G.C.; NURUDEEN, O.; AMUND, O.O. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. **Hereditas**, v. 126, p. 161-167, 1997.

OOST, R. et al. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II. Biomarkers: pollution-induced biochemical response. **Aquatic Toxicology**, v. 36, p. 189-222, 1996.

PAIVA, A. B. Avaliação de risco ambiental utilizando parâmetros físico-químicos e biológicos no rio Canoas/SC. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

PANDEY, S. et al. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **The Science of the Total Environment**, v. 309, p. 105-115, 2003.

PASCALICCHIO, A.E. **Contaminação por metais pesados**. Ed. Annablume, São Paulo/SP, 132 pp, 2002

PAVLICA, M. et al. The cytotoxic effect of wastewater from the phosphoric gypsum depot on common oak (*Quercus robur* L.) and shallot (*Allium cepa* var. *Ascalonicum*). **Chemosphere**, Oxford, v. 41, 1519-27, 2000.

PENG, J.; JONES, G. L.; WATSON, K. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p. 1598-1606, 2000.

PEÑA S. et al. Role of glutathione in thiobencarb resistance in the European eel *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, p. 51-56, 2000.

PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; OBE, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis** 5 (4): 289-302, 2000.

QUINZANI-JORDÃO, B. Ciclo celular en meristemas. La formación de intercâmbios entre cromátidas hermanas. **Tese** (Doutorado), Universidad Complutense, Madrid, 276p. 1987.

RABELO-GAY, M.N. RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE-NETO, R. (Ed.). Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/**Revista Brasileira de Genética**, 1991.

RANK, J. NIELSEN, M.H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazid, sodium azide and ethyl methanesulfonate.

**Mutat. Res.** v. 390, p. 121-27, 1997.

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

RIBEIRO, L.C.; MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K (org.). **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, p. 21-27, 2003.

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

RIGONATO, J.; JORDÃO, B.Q. Uso do teste de *Allium* na avaliação de amostras ambientais.

**Resumos do 48º Congresso Nacional de Genética – CD Rom. 2002.**

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v. 722, p. 225-254, 1999.

ROTTA, D. N. H. Uma análise das perspectivas de desintegração vertical da produção florestal de uma empresa de papel e celulose: O caso da Klabin. **Dissertação** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Economia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 154 p, 2000.

SAHI, A.N. et al. Cytogenetic response of hexavalent chromium-induced somatic cell abnormalities in *Allium cepa*. **Cytobio**, v.96, p. 71-79, 1998.

SAUNAMAKI, R. Activated sludge plants in Finland. **Water Science Technology** v. 35, p. 235- 242, 1997.

SAYEED, I. et al. Oxidative stress of exposure to deltametrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 295-301, 2003.

SCHELENK, D. Necessity of defining biomarker for use in ecological risk assessments. **Marine Pollution Bulletin**, 39, 48-53, 1999.

SILVA, J.; FONSECA, M. B. Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (org.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, p. 70-84, 2003b.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (org.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, p. 166-180, 2003c.

SIRAJ, P.; RANI, A. U. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia) **Ecotoxicology Environmental safety**, v. 56, p. 218-221, 2003.



SMAKA-KINCL, V. et al. The evaluation of waste and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research**, v. 368, p. 171-179, 1996.

SOARES, C. H. L. Estudos Mecanísticos da degradação de efluentes de indústria de papel e celulose por fungos basidiomicetos degradadores de madeira. **Tese (doutorado)**, Instituto de Química. UNICAMP, SP, pp.128, 1998.

SOARES, C. H. L.; BAPTISTA, I.E.; MOISMANN, A. L. P. Estudo comparativo da toxicidade de efluentes de indústria de papel e celulose utilizando parâmetros bioquímicos. **Ecotoxicologia: Perspectivas para o século XXI**. Edit. RIMA, São Carlos. 471-480, 2000.

SOARES, C.H.L. **Papel e celulose: tecnologia e meio ambiente**. Edições Selo verde, Florianópolis, SC. No prelo. 2004.

SPONZA, D.T. Application of toxicity tests into discharges of the pulp-paper industry in Turkey. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 54, p. 74-86, 2003.

SREEKRISHNAN, M. A. T. R. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. **Advances in Environmental Research**, vol. 5, 175-196, 2001.

STEGEMAN, J.J. et al. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effects. In: HUGGETT, R.J. et al. (Ed.). **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boulder: Lewis Publishers, 235p., 1992.

STEPHENSEN, E.; STURVE, J.; FÖRLIN, L. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 435-442, 2002.

THOMPSON, G. et al. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. **Bioresource Technology**, vol. 77, 275-286, 2001.

THOREN, P.O., WASENIUS, C. O., SOINTIO, J. Environmental development with increased production. In: Use of tertiary treatment (DAF) in the latest stage of the wastewater treatment system at Braviken paper mill, Sweden. **Proceedings of the 1997 Environmental Conference**, v. 1, p. 327-330, 1997.

TOLEDO, F.; FERRARI, G.P.; VICENTINI, V.E.P. Verification of the mutagenic activity of the phytotherapeutic vaso-dilator Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), in *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology** v.26 (2), suppl., p. 149., 2003.

VAN DEN HEUVEL M. R. et al. Exposure of reproductively maturing rainbow trout to a New Zealand pulp and paper mill effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, p. 65-75, 2002.

VAN DER OOST et al. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, n.2, p. 57-149, 2003.

VENTURA, B.C.; MARIN-MORALES, M.A. Avaliação dos efeitos genotóxicos do herbicida Atrazina, usando sistema-teste de *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology** v.26 (2), suppl., p. 202., 2003.

VICENTINI, V. E. P.; MACHADO, M. F. P. S.; SILVA, M. F. Effect of 5-aninouracil on mitotic cell division in *Allium cepa*. **Acta Scientiarum**, v. 21, n. 2, p. 225-228, 1999.

WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J.B.; BLAISE, C. Comparing the presence, potency, and potencial hazard of genotoxins extracted from a broad range of industrial effluents. **Environmental and Molecular Mutation** v. 27, p. 116-39, New York., 1996.

WILHELM FILHO, D. Fish antioxidant defenses - a comparative approach. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p.1735-1742, 1996.

WILHELM FILHO, D. et al. The effect of pulp mill effluent on two fish species. **Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components**. Curitiba: PR, p.612 – 619, 1997.

WILHELM FILHO, D. et al. Influence of season and pollution on the antioxidante defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34 (6), p. 719-726, 2001.

YAKOVLEVA, Y.N.; OSTROVSKAYA, R.M.; NOVIKOVA, L.N. Assessment of genotoxicity of lignin substances as risk factor for aquatic ecosystems. **Russian Journal of Ecology**, n.4, pp. 242-246, 2004.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiology Review**, v. 74, p. 139-162, 1994.

ZUNINO, P.A.A.; SOARES, C.H.L. Alterações dos níveis sexuais e metabólitos plasmáticos e alterações histológicas de gônadas de peixes expostos a efluentes de indústria de papel e celulose. **SETAC Brasil – ECOTOX 2004**, p.145, 2004.

ZWART, L. L. et al. Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 202-226, 1999.

## ANEXO A



Ilustração 1: Klabin/Celucat – Indústria de papel e celulose – município de Correia Pinto (SC).



Ilustração 2: ponto de despejo do efluente tratado da indústria Klabin/Celucat no Rio Canoas (SC).

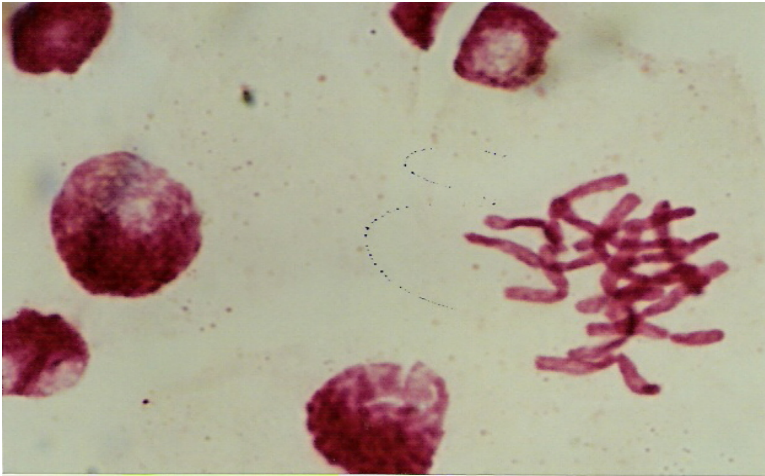


Ilustração 3 – C-metáfase

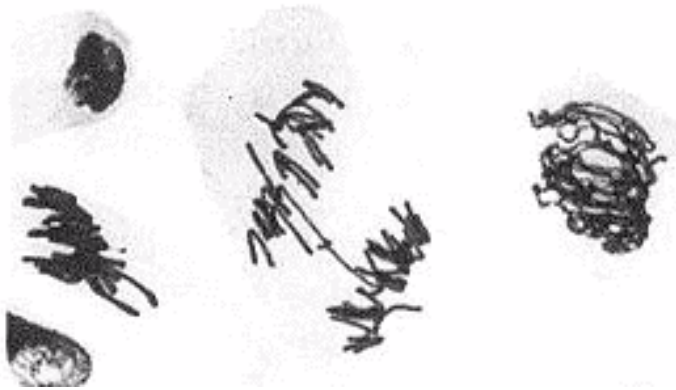


Ilustração 4 – Ponte anafásica

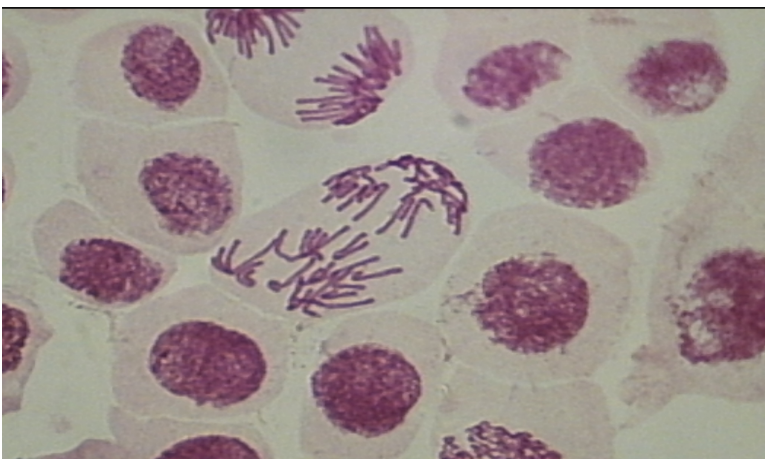


Ilustração 5 – Anáfase desorganizada

## ANEXO B

TABELA I – Valores médios de índices mitóticos e frequência de células aberrantes – F.C.A. (com seus respectivos desvios padrões) em cada bulbo, a zero hora de exposição com: CO - controle negativo; NT – efluente tratado, nas concentrações de 0,1, 12, 50 e 100%. 1000 células/bulbo analisadas.

CONTROLE/TRATAMENTO	I.M. (%)	F.C.A. (%)
CO - 1	7,1±2,30	0,1±0,04
CO - 2	6,9±2,32	0,0±0,03
CO - 3	12,6±2,88	0,0±0,03
CO - 4	8,1±2,26	0,0±0,03
CO - 5	6,4±2,37	0,0±0,03
NT 0,1% - 6	7,0±0,52	0,1±0,08
NT 0,1% - 7	6,6±0,52	0,0±0,09
NT 0,1% - 8	4,6±0,53	0,0±0,08
NT 0,1% - 9	4,7±0,55	0,0±0,08
NT 0,1% - 10	4,8±0,50	0,0±0,08
NT 12% - 11	1,5±1,40	0,1±0,05
NT 12% - 12	1,7±1,45	0,0±0,04
NT 12% - 13	2,5±1,22	0,1±0,04
NT 12% - 14	2,1±1,23	0,1±0,04
NT 12% - 15	2,0±1,22	0,0±0,04
NT50% - 16	1,1±0,98	0,0±0,04
NT50% - 17	1,5±0,98	0,0±0,04
NT50% - 18	1,1±0,94	0,0±0,04
NT50% - 19	2,1±0,91	0,1±0,05
NT50% - 20	1,2±0,93	0,1±0,10
NT 100% - 21	1,8±0,44	0,2±0,08
NT 100% - 22	3,6±0,44	0,0±0,08
NT 100% - 23	2,5±0,39	0,0±0,08
NT 100% - 24	2,8±0,38	0,0±0,08
NT 100% - 25	2,8±0,38	0,0±0,08

TABELA II – Valores médios de índices mitóticos e frequência de células aberrantes – F.C.A. (com seus respectivos desvios padrões) em cada bulbo, após 24h de exposição com: CO - controle negativo; NT – efluente tratado, nas concentrações de 0,1, 12, 50 e 100%. 1000 células/bulbo analisadas.

<b>CONTROLE/TRATAMENTO</b>	<b>I.M. (%)</b>	<b>F.C.A. (%)</b>
CO - 1	9,1±2,85	0,1±0,04
CO - 2	11,9±3,30	0,0±0,03
CO - 3	4,5±3,04	0,0±0,03
CO - 4	7,5±2,78	0,0±0,03
CO - 5	4,7±3,01	0,0±0,03
NT 0,1% - 6	3,9±1,18	0,0±0,05
NT 0,1% - 7	4,4±1,17	0,1±0,05
NT 0,1% - 8	2,2±1,28	0,0±0,05
NT 0,1% - 9	3,3±1,38	0,1±0,05
NT 0,1% - 10	4,0±1,15	0,1±0,05
NT 12% - 11	2,3±0,67	0,0±0,12
NT 12% - 12	2,1±0,65	0,3±0,11
NT 12% - 13	2,7±0,69	0,3±0,12
NT 12% - 14	1,7±0,73	0,0±0,13
NT 12% - 15	2,0±0,73	0,0±0,12
NT50% - 16	3,5±1,07	0,3±0,20
NT50% - 17	4,6±0,97	0,6±0,21
NT50% - 18	2,8±1,10	0,6±0,26
NT50% - 19	1,8±1,03	0,2±0,21
NT50% - 20	4,5±1,01	0,2±0,22
NT 100% - 21	5,4±1,18	0,9±0,29
NT 100% - 22	3,2±0,96	0,6±0,28
NT 100% - 23	2,2±0,99	0,3±0,33
NT 100% - 24	3,7±0,96	0,4±0,35
NT 100% - 25	5,8±1,03	0,3±0,28



TABELA III – Valores médios de índices mitóticos e frequência de células aberrantes – F.C.A. (com seus respectivos desvios padrões) em cada bulbo, após 72h de exposição com: CO - controle negativo; NT – efluente tratado, nas concentrações de 0,1, 12, 50 e 100%. 1000 células/bulbo analisadas.

<b>CONTROLE/TRATAMENTO</b>	<b>I.M. (%)</b>	<b>F.C.A. (%)</b>
CO - 1	6,9±1,49	0,2±0,10
CO - 2	7,5±1,51	0,0±0,08
CO - 3	9,3±1,77	0,0±0,08
CO - 4	4,7±1,75	0,0±0,08
CO - 5	6,4±1,51	0,0±0,08
NT 0,1% - 6	3,2±0,78	0,0±0,15
NT 0,1% - 7	1,5±0,70	0,1±0,13
NT 0,1% - 8	3,2±0,70	0,3±0,13
NT 0,1% - 9	2,6±0,67	0,0±0,13
NT 0,1% - 10	5,1±0,65	0,1±0,13
NT 12% - 11	2,8±1,50	0,3±0,20
NT 12% - 12	2,6±1,59	0,2±0,16
NT 12% - 13	2,4±1,36	0,2±0,16
NT 12% - 14	1,0±1,40	0,0±0,18
NT 12% - 15	3,1±1,41	0,1±0,17
NT50% - 16	2,7±1,37	0,1±0,17
NT50% - 17	3,1±1,44	0,0±0,19
NT50% - 18	2,7±1,44	0,4±0,17
NT50% - 19	3,8±1,40	0,4±0,17
NT50% - 20	3,1±1,32	0,4±0,20
NT 100% - 21	6,1±1,16	0,6±0,29
NT 100% - 22	6,8±1,30	0,6±0,28
NT 100% - 23	6,0±1,23	0,5±0,33
NT 100% - 24	5,8±1,23	0,2±0,35
NT 100% - 25	5,1±1,32	0,3±0,28

TABELA IV – Valores médios de índices mitóticos e frequência de células aberrantes – F.C.A. (com seus respectivos desvios padrões) em cada bulbo, após período de recuperação em água por 24h.: CO - controle negativo; NT – efluente tratado, nas concentrações de 0,1, 12, 50 e 100%. 1000 células/bulbo analisadas.

<b>CONTROLE/TRATAMENTO</b>	<b>I.M. (%)</b>	<b>F.C.A. (%)</b>
CO - 1	8,1±1,66	0,1±0,05
CO - 2	9,3±1,76	0,0±0,04
CO - 3	4,6±2,12	0,0±0,04
CO - 4	8,6±1,70	0,0±0,04
CO - 5	8,6±1,70	0,0±0,04
NT 0,1% - 6	1,8±1,23	0,0±0,08
NT 0,1% - 7	3,4±1,01	0,2±0,09
NT 0,1% - 8	4,4±1,08	0,0±0,08
NT 0,1% - 9	3,3±1,02	0,1±0,08
NT 0,1% - 10	4,7±1,12	0,0±0,08
NT 12% - 11	2,6±0,77	0,2±0,10
NT 12% - 12	2,2±0,81	0,0±0,08
NT 12% - 13	2,2±0,81	0,0±0,08
NT 12% - 14	3,9±0,85	0,0±0,08
NT 12% - 15	3,8±0,85	0,0±0,08
NT50% - 16	3,5±0,74	0,1±0,16
NT50% - 17	4,0±0,69	0,2±0,15
NT50% - 18	3,6±0,73	0,5±0,17
NT50% - 19	5,1±0,76	0,4±0,15
NT50% - 20	5,0±0,75	0,2±0,15
NT 100% - 21	5,2±0,47	0,4±0,16
NT 100% - 22	4,9±0,48	0,6±0,16
NT 100% - 23	6,0±0,57	0,2±0,19
NT 100% - 24	5,3±0,47	0,2±0,16
NT 100% - 25	4,6±0,53	0,2±0,16

TABELA V – Valores médios de índices mitóticos e frequência de células aberrantes – F.C.A. (com seus respectivos desvios padrões) em cada bulbo, a zero hora de exposição com: CO - controle negativo; T – efluente tratado, nas concentrações de 0,1, 12, 50 e 100%. Foram analisadas 1000 células/bulbo.

TRATAMENTOS	ÍNDICE MITÓTICO (%)	FREQÜÊNCIA CÉLS. ABERRANTES (%)
CO - 1	7,1±2,30	0,1±0,04
CO - 2	6,9±2,32	0,0±0,03
CO - 3	12,6±2,88	0,0±0,03
CO - 4	8,1±2,26	0,0±0,03
CO - 5	6,4±2,37	0,0±0,03
T 0,1% - 6	3,6±0,52	0,0±0,08
T 0,1% - 7	3,6±0,52	0,2±0,09
T 0,1% - 8	4,6±0,55	0,0±0,08
T 0,1% - 9	4,7±0,55	0,1±0,08
T 0,1% - 10	3,8±0,49	0,0±0,08
T 12% - 11	4,1±1,40	0,1±0,04
T 12% - 12	7,8±1,46	0,0±0,00
T 12% - 13	5,4±1,22	0,0±0,00
T 12% - 14	6,3±1,23	0,0±0,00
T 12% - 15	5,5±1,22	0,0±0,00
T50% - 16	4,5±0,98	0,0±0,00
T50% - 17	4,5±0,98	0,0±0,00
T50% - 18	2,6±0,94	0,0±0,00
T50% - 19	2,8±0,92	0,1±0,00
T50% - 20	2,7±0,93	0,0±0,04
T 100% - 21	3,0±0,44	0,2±0,10
T 100% - 22	4,1±0,43	0,0±0,08
T 100% - 23	3,3±0,39	0,0±0,08
T 100% - 24	3,7±0,38	0,0±0,08
T 100% - 25	3,7±0,38	0,0±0,08

TABELA VI – Valores médios de índices mitóticos e frequência de células aberrantes – F.C.A. (com seus respectivos desvios padrões) em cada bulbo, após 24h de exposição com: CO - controle negativo; T – efluente tratado, nas concentrações de 0,1, 12, 50 e 100%. Foram analisadas 1000 células/bulbo.

<b>TRATAMENTOS</b>	<b>ÍNDICE MITÓTICO (%)</b>	<b>FREQÜÊNCIA CÉLS. ABERRANTES (%)</b>
CO - 1	9,1±2,85	0,1±0,04
CO - 2	11,9±3,30	0,0±0,03
CO - 3	4,5±3,04	0,0±0,03
CO - 4	7,5±2,78	0,0±0,03
CO - 5	4,7±3,01	0,0±0,03
T 0,1% - 6	2,7±1,18	0,1±0,54
T 0,1% - 7	4,0±1,17	0,0±0,51
T 0,1% - 8	2,0±1,28	0,0±0,51
T 0,1% - 9	5,3±1,38	0,1±0,54
T 0,1% - 10	3,0±1,15	0,0±0,51
T 12% - 11	3,1±0,67	0,1±0,12
T 12% - 12	2,8±0,65	0,2±0,11
T 12% - 13	2,0±0,69	0,3±0,12
T 12% - 14	1,8±0,73	0,0±0,13
T 12% - 15	3,5±0,73	0,3±0,12
T50% - 16	4,9±1,07	0,4±0,20
T50% - 17	4,0±0,97	0,3±0,21
T50% - 18	2,4±1,10	0,8±0,26
T50% - 19	2,8±1,03	0,3±0,21
T50% - 20	4,5±1,01	0,2±0,22
T 100% - 21	1,4±1,18	0,6±0,0,29
T 100% - 22	2,8±0,96	0,5±0,28
T 100% - 23	3,8±0,99	0,9±0,33
T 100% - 24	3,4±0,96	0,0±0,35
T 100% - 25	4,1±1,03	0,5±0,28

TABELA VII – Valores médios de índices mitóticos e frequência de células aberrantes – F.C.A. (com seus respectivos desvios padrões) em cada bulbo, após 72h de exposição com: CO - controle negativo; T – efluente tratado, nas concentrações de 0,1, 12, 50 e 100%. Foram analisadas 1000 células/bulbo.

<b>TRATAMENTOS</b>	<b>ÍNDICE MITÓTICO (%)</b>	<b>FREQÜÊNCIA CÉLS. ABERRANTES (%)</b>
CO - 1	6,9±1,49	0,2±0,10
CO - 2	7,5±1,51	0,0±0,08
CO - 3	9,3±1,77	0,0±0,08
CO - 4	4,7±1,75	0,0±0,08
CO - 5	6,4±1,51	0,0±0,08
T 0,1% - 6	5,1±0,78	0,3±0,15
T 0,1% - 7	3,4±0,70	0,0±0,13
T 0,1% - 8	3,4±0,70	0,0±0,13
T 0,1% - 9	4,4±0,67	0,2±0,13
T 0,1% - 10	3,8±0,65	0,0±0,13
T 12% - 11	4,8±1,50	0,5±0,20
T 12% - 12	1,1±1,59	0,2±0,16
T 12% - 13	3,6±1,36	0,2±0,16
T 12% - 14	2,2±1,40	0,0±0,18
T 12% - 15	4,2±1,41	0,1±0,17
T50% - 16	4,8±1,37	0,2±0,17
T50% - 17	2,1±1,44	0,1±0,19
T50% - 18	2,1±1,44	0,4±0,17
T50% - 19	5,0±1,40	0,3±0,17
T50% - 20	4,3±1,32	0,6±0,20
T 100% - 21	4,1±1,61	0,6±0,30
T 100% - 22	5,4±1,30	0,5±0,29
T 100% - 23	5,0±1,23	0,9±0,33
T 100% - 24	2,9±1,24	0,0±0,35
T 100% - 25	2,4±1,32	0,5±0,29

TABELA VIII – Valores médios de índices mitóticos e frequência de células aberrantes – F.C.A. (com seus respectivos desvios padrões) em cada bulbo, após período de recuperação em água por 24h. CO - controle negativo; T – efluente tratado, nas concentrações de 0,1, 12, 50 e 100%. Foram analisadas 1000 células/bulbo.

TRATAMENTOS	ÍNDICE MITÓTICO (%)	FREQÜÊNCIA CÉLS. ABERRANTES (%)
CO - 1	8,1±1,66	0,1±0,05
CO - 2	9,3±1,76	0,0±0,04
CO - 3	4,6±2,12	0,0±0,04
CO - 4	8,6±1,70	0,0±0,04
CO - 5	8,6±1,70	0,0±0,04
T 0,1% - 6	5,8±0,79	0,0±0,13
T 0,1% - 7	4,9±0,78	0,0±0,13
T 0,1% - 8	5,0±0,77	0,3±0,15
T 0,1% - 9	4,3±0,67	0,0±0,13
T 0,1% - 10	6,5±0,90	0,2±0,13
T 12% - 11	4,8±0,78	0,1±0,08
T 12% - 12	4,2±0,76	0,0±0,08
T 12% - 13	4,2±0,76	0,2±0,09
T 12% - 14	3,1±0,91	0,0±0,08
T 12% - 15	5,4±0,87	0,0±0,08
T50% - 16	5,6±1,74	0,1±0,08
T50% - 17	6,0±1,80	0,2±0,09
T50% - 18	3,7±1,62	0,0±0,09
T50% - 19	3,2±1,65	0,2±0,09
T50% - 20	1,6±1,89	0,0±0,09
T 100% - 21	1,4±2,43	0,0±0,30
T 100% - 22	5,7±2,18	0,7±0,32
T 100% - 23	6,9±2,35	0,5±0,28
T 100% - 24	5,42±2,16	0,3±0,27
T 100% - 25	2,3±2,27	0,0±0,30

TABELA IX - Valores absolutos para cálculo dos índices de fases em cada bulbo, após exposição à água não clorada (controle negativo), nos períodos de zero hora (0H), 24h, 72h e recuperação (REC).

TRATAMEN TOS	MITOSES	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE
0H - 1	71	19	23	13	16
0H - 2	69	28	17	13	11
0H - 3	126	41	50	19	16
0H - 4	81	17	29	21	14
0H - 5	64	25	16	14	09
24H - 1	91	48	19	09	15
24H - 2	119	65	23	24	07
24H - 3	45	29	09	05	02
24H - 4	75	37	16	09	13
24H - 5	47	16	21	06	04
72H - 1	69	26	21	09	13
72H - 2	75	47	12	06	10
72H - 3	93	41	23	11	18
72H - 4	47	18	20	05	04
72H - 5	69	20	21	15	08
REC - 1	81	33	15	10	22
REC - 2	93	50	18	14	11
REC - 3	46	11	11	08	16
REC - 4	86	40	22	13	11
REC - 5	86	34	21	13	18

TABELA X - Valores absolutos para cálculo dos índices de fases em cada bulbo, após exposição ao efluente não-tratado, concentração 0,1%, nos períodos de zero hora (0H), 24h, 72h e recuperação (REC).

TRATAMEN TOS	MITOSES	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE
0H - 1	70	31	14	14	11
0H - 2	66	15	28	17	06
0H - 3	46	30	08	05	03
0H - 4	47	14	14	09	10
0H - 5	48	20	16	07	05
24H - 1	39	09	13	09	08
24H - 2	44	06	16	11	1
24H - 3	22	09	12	00	01
24H - 4	33	09	12	08	04
24H - 5	40	08	16	10	06
72H - 1	32	18	05	07	02
72H - 2	15	06	04	01	04
72H - 3	32	13	10	05	04
72H - 4	26	05	14	02	05
72H - 5	51	19	19	10	03
REC - 1	18	00	11	05	02
REC - 2	34	07	12	10	05
REC - 3	44	01	22	09	12
REC - 4	33	06	15	06	06
REC - 5	47	20	15	07	05



TABELA XI - Valores absolutos para cálculo dos índices de fases em cada bulbo, após exposição ao efluente não tratado, concentração de 12%, nos períodos de zero hora (0H), 24h, 72h e recuperação (REC).

TRATAMEN TOS	MITOSES	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE
0H - 1	15	07	03	05	00
0H - 2	27	05	05	07	00
0H - 3	25	09	05	09	02
0H - 4	21	13	04	03	01
0H - 5	20	11	08	01	00
24H - 1	23	05	09	05	04
24H - 2	21	02	09	04	06
24H - 3	27	07	13	03	04
24H - 4	17	02	03	04	08
24H - 5	20	03	12	02	03
72H - 1	28	08	07	06	07
72H - 2	26	08	13	01	04
72H - 3	24	10	08	03	03
72H - 4	10	04	03	03	00
72H - 5	31	08	11	08	04
REC - 1	26	13	05	07	01
REC - 2	22	12	09	00	01
REC - 3	22	06	15	00	01
REC - 4	39	15	10	06	08
REC - 5	38	05	11	16	06

TABELA XII - Valores absolutos para cálculo dos índices de fases em cada bulbo, após exposição ao efluente não tratado, concentração de 50%, nos períodos de zero hora (0H), 24h, 72h e recuperação (REC).

TRATAMEN TOS	MITOSES	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE
0H - 1	11	03	01	02	05
0H - 2	15	00	09	01	05
0H - 3	11	01	06	03	01
0H - 4	21	04	08	05	04
0H - 5	12	02	06	04	00
24H - 1	35	13	15	02	05
24H - 2	46	17	15	12	02
24H - 3	28	06	11	03	08
24H - 4	18	04	09	04	01
24H - 5	45	14	13	09	09
72H - 1	27	14	12	08	03
72H - 2	31	04	15	06	06
72H - 3	27	05	10	10	02
72H - 4	38	09	11	11	07
72H - 5	31	07	07	10	07
REC - 1	35	12	13	02	08
REC - 2	40	17	11	07	05
REC - 3	36	14	13	03	06
REC - 4	51	25	15	06	05
REC - 5	50	11	18	13	08

TABELA XIII - Valores absolutos para cálculo dos índices de fases em cada bulbo, após exposição ao efluente não tratado, concentração de 100%, nos períodos de zero hora (0H), 24h, 72h e recuperação (REC).

TRATAMEN TOS	MITOSES	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE
0H - 1	54	23	19	11	01
0H - 2	32	16	12	01	03
0H - 3	22	06	11	03	02
0H - 4	37	07	12	12	06
0H - 5	58	20	19	17	02
24H - 1	18	01	13	02	02
24H - 2	36	07	10	13	06
24H - 3	25	04	16	05	00
24H - 4	28	05	14	08	01
24H - 5	28	03	12	12	01
72H - 1	61	21	19	09	12
72H - 2	68	23	20	12	13
72H - 3	60	23	17	10	10
72H - 4	58	24	16	11	07
72H - 5	51	17	20	09	05
REC - 1	52	11	20	12	09
REC - 2	49	11	22	09	07
REC - 3	60	19	29	04	08
REC - 4	46	18	11	08	16
REC - 5	52	12	20	08	06

TABELA XIV - Valores absolutos para cálculo dos índices de fases em cada bulbo, após exposição ao efluente tratado, concentração de 0,1%, nos períodos de zero hora (0H), 24h, 72h e recuperação (REC).

TRATAMEN TOS	MITOSES	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE
0H - 1	36	20	09	04	03
0H - 2	36	12	10	07	07
0H - 3	46	14	14	09	10
0H - 4	47	14	12	09	12
0H - 5	38	10	14	04	10
24H - 1	27	09	11	01	06
24H - 2	40	19	13	05	03
24H - 3	20	03	06	05	06
24H - 4	53	25	12	04	12
24H - 5	30	13	09	01	07
72H - 1	51	25	18	02	06
72H - 2	34	17	07	03	07
72H - 3	34	21	07	02	04
72H - 4	30	20	06	12	04
72H - 5	34	20	06	12	04
REC - 1	58	32	15	06	05
REC - 2	49	16	22	02	09
REC - 3	50	21	15	09	05
REC - 4	43	10	19	08	06
REC - 5	65	12	24	12	17

TABELA XV - Valores absolutos para cálculo dos índices de fases em cada bulbo, após exposição ao efluente tratado, concentração de 12%, nos períodos de zero hora (0H), 24h, 72h e recuperação (REC).

TRATAMEN TOS	MITOSES	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE
0H - 1	41	20	12	05	04
0H - 2	78	45	13	11	09
0H - 3	54	18	18	12	06
0H - 4	63	14	20	18	11
0H - 5	55	10	23	16	06
24H - 1	31	18	08	04	01
24H - 2	28	12	06	09	01
24H - 3	20	09	07	01	03
24H - 4	18	08	06	02	02
24H - 5	35	13	09	01	07
72H - 1	48	30	10	05	03
72H - 2	11	03	06	02	00
72H - 3	36	17	11	04	04
72H - 4	22	07	09	03	03
72H - 5	30	13	14	06	09
REC - 1	48	34	06	06	02
REC - 2	42	08	28	03	03
REC - 3	42	13	16	10	03
REC - 4	31	10	13	05	08
REC - 5	54	22	14	10	08

TABELA XVI - Valores absolutos para cálculo dos índices de fases em cada bulbo, após exposição ao efluente tratado, concentração de 50%, nos períodos de zero hora (0H), 24h, 72h e recuperação (REC).

TRATAMEN TOS	MITOSES	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE
0H - 1	45	11	19	06	09
0H - 2	45	17	13	10	05
0H - 3	26	13	05	04	04
0H - 4	28	12	08	04	04
0H - 5	27	13	06	04	04
24H - 1	49	31	10	02	06
24H - 2	40	25	05	06	04
24H - 3	24	17	11	04	02
24H - 4	28	09	13	03	03
24H - 5	45	20	17	06	02
72H - 1	48	23	11	08	06
72H - 2	21	06	18	05	09
72H - 3	21	09	02	05	05
72H - 4	50	26	09	06	09
72H - 5	43	17	09	08	09
REC - 1	48	34	06	06	02
REC - 2	42	08	28	03	03
REC - 3	42	13	16	10	03
REC - 4	31	10	13	05	08
REC - 5	54	22	14	10	08

TABELA XVII - Valores absolutos para cálculo dos índices de fases em cada bulbo, após exposição ao efluente tratado, concentração de 100%, nos períodos de zero hora (0H), 24h, 72h e recuperação (REC).

TRATAMEN TOS	MITOSES	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE
0H - 1	30	11	07	09	03
0H - 2	41	23	10	05	03
0H - 3	33	05	17	05	06
0H - 4	37	10	17	06	04
0H - 5	37	15	13	03	06
24H - 1	14	01	04	02	07
24H - 2	28	10	11	04	03
24H - 3	38	08	13	06	11
24H - 4	34	10	12	07	05
24H - 5	41	15	17	04	05
72H - 1	41	15	09	05	12
72H - 2	54	24	13	10	07
72H - 3	50	27	11	07	05
72H - 4	29	09	07	05	08
72H - 5	24	09	07	04	04
REC - 1	14	12	02	00	00
REC - 2	57	29	16	07	05
REC - 3	69	30	19	15	05
REC - 4	54	26	13	07	08
REC - 5	23	05	09	03	06

## ANEXO C

TABELA I – Resultado final do Teste ANOVA, referente aos IM médio total, comparando os resultados do controle negativo nos tempos de 0, 24, 72h e recuperação (24h), em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses:  $H_0$ : Não há diferença estatisticamente significativa entre os tempos de exposição.  $H_1$ : Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando  $H_0$ .

<b>IM – MÉDIO TOTAL</b>	
<b>CONTROLE X CONTROLE</b>	<b>RESULTADO</b>
CO 0h x CO 24h	Aceito
CO 0h x CO 72h	Aceito
CO 0h x CO REC	Aceito
CO 24h x CO 72h	Aceito
CO 24h x CO 72h	Aceito
CO 72h x CO REC	Aceito



TABELA II – Resultado final do Teste ANOVA, referente aos IM médio total, comparando os resultados do controle dos próprios grupos (0h) com os períodos de exposição (24, 72h e recuperação) das concentrações 0,1, 12, 50 e 100% do efluente *não tratado* de papel e celulose, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses:  $H_0$ : Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações.  $H_1$ : Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando  $H_0$ .

<b>IM MÉDIO TOTAL</b>	
<b>NT 0,1%</b>	
<b>TRATAMENTO/CONCENTRAÇÃO</b>	<b>RESULTADO</b>
NT 0,1% 24h x NT 0,1% 0h	<i>Rejeito</i>
NT 0,1% 72h x NT 0,1% 0h	<i>Rejeito</i>
NT 0,1% REC x NT 0,1% 0h	<i>Rejeito</i>
NT 0,1% 24h x NT 0,1% 72h	<i>Rejeito</i>
NT 0,1% 24h x NT 0,1% REC	<i>Rejeito</i>
NT 0,1% 72h x NT 0,1% REC	<i>Rejeito</i>
<b>NT 12%</b>	
NT 12% 24h x NT 12% 0h	<i>Rejeito</i>
NT 12% 72h x NT 12% 0h	<i>Rejeito</i>
NT 12% REC x NT 12% 0h	<i>Rejeito</i>
NT 12% 24h x NT 12% 72h	<i>Rejeito</i>
NT 12% 24h x NT 12% REC	<i>Rejeito</i>
NT 12% 72h x NT 12% REC	<i>Rejeito</i>
<b>NT 50%</b>	
NT 50% 24h x NT 50% 0h	<i>Rejeito</i>
NT 50% 72h x NT 50% 0h	<i>Rejeito</i>
NT 50% REC x NT 50% 0h	<i>Rejeito</i>
NT 50% 24h x NT 50% 72h	<i>Rejeito</i>
NT 50% 24h x NT 50% REC	<i>Rejeito</i>
NT 50% 72h x NT 50% REC	<i>Rejeito</i>
<b>NT 100%</b>	
NT 100% 24h x NT 100% 0h	<i>Rejeito</i>
NT 100% 72h x NT 100% 0h	<i>Rejeito</i>
NT 100% REC x NT 100% 0h	<i>Rejeito</i>
NT 100% 24h x NT 100% 72h	<i>Rejeito</i>
NT 100% 24h x NT 100% REC	<i>Rejeito</i>
NT 100% 72h x NT 100% REC	<i>Rejeito</i>

TABELA III – Resultado final do Teste ANOVA, referente aos IM médio total, comparando os resultados do controle dos próprios grupos (0h) com os períodos de exposição (24, 72h e recuperação) das concentrações 0,1, 12, 50 e 100% do efluente *tratado* de papel e celulose, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses:  $H_0$ : Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações.  $H_1$ : Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando  $H_0$ .

<b>IM MÉDIO TOTAL</b>	
<b>T 0,1%</b>	
<b>TRATAMENTO/CONCENTRAÇÃO</b>	<b>RESULTADO</b>
T 0,1% 24h x T 0,1% 0h	Aceito
T 0,1% 72h x T 0,1% 0h	Aceito
T 0,1% REC x T 0,1% 0h	Aceito
T 0,1% 24h x T 0,1% 72h	Aceito
T 0,1% 24h x T 0,1% REC	Aceito
T 0,1% 72h x T 0,1% REC	Aceito
<b>T 12%</b>	
T 12% 24h x T 12% 0h	<i>Rejeito</i>
T 12% 72h x T 12% 0h	<i>Rejeito</i>
T 12% REC x T 12% 0h	<i>Rejeito</i>
T 12% 24h x T 12% 72h	<i>Rejeito</i>
T 12% 24h x T 12% REC	<i>Rejeito</i>
T 12% 72h x T 12% REC	<i>Rejeito</i>
<b>T 50%</b>	
T 50% 24h x T 50% 0h	Aceito
T 50% 72h x T 50% 0h	Aceito
T 50% REC x T 50% 0h	Aceito
T 50% 24h x T 50% 72h	Aceito
T 50% 24h x T 50% REC	Aceito
T 50% 72h x T 50% REC	Aceito
<b>T 100%</b>	
T 100% 24h x T 100% 0h	Aceito
T 100% 72h x T 100% 0h	Aceito
T 100% REC x T 100% 0h	Aceito
T 100% 24h x T 100% 72h	Aceito
T 100% 24h x T 100% REC	Aceito
T 100% 72h x T 100% REC	Aceito

TABELA V – Resultado final do cálculo do qui-quadrado total, referente às freqüência de aberrações cromossômicas, comparando os tempos de permanência em água não clorada de 0, 24, 72h e recuperação (24h) das células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*. O grau de liberdade = 1 e o Qui-quadrado da tabela = 3,84, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses: H<sub>0</sub>: Não há diferença estatisticamente significativa entre os tempos de exposição em água desclorada. H<sub>1</sub>: Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando H<sub>0</sub>.

<b>FREQÜÊNCIA DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS</b>	
<b>TRATAMENTO/ CONCENTRAÇÃO</b>	<b>RESULTADO</b>
CO 0h x CO 24h	Aceito (0,000)
CO 0h x CO 72h	Aceito (0,180)
CO 0h x CO REC	Aceito (0,000)
CO 24h x CO 72h	Aceito (0,180)
CO 24h x CO 72h	Aceito (0,000)
CO 72h x CO REC	Aceito (0,180)

TABELA VI – Resultado final do cálculo do qui-quadrado total, referente às freqüência de aberrações cromossômicas, comparando os resultados do controle com as concentrações 0,1, 12, 50 e 100% do efluente não tratado de papel e celulose e entre as concentrações, em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*. O grau de liberdade = 1 e o Qui-quadrado da tabela = 3,84, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses:  $H_0$ : Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações.  $H_1$ : Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando  $H_0$ .

<b>FREQÜÊNCIA DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS</b>	
<b>NT 0,1%</b>	
<b>CONTROLE/TRATAMENTO</b>	<b>RESULTADO</b>
NT 0,1% 0h x CO 0h	Aceito (0,00)
NT 0,1% 24h x CO 24h	Aceito (0,08)
NT 0,1% 72h x CO 72h	Aceito (0,09)
NT 0,1% REC x CO REC	Aceito (0,08)
NT 0,1% 24h x NT 0,1% 72h	Aceito (0,17)
NT 0,1% 24h x NT 0,1% REC	Aceito (0,00)
NT 0,1% 72h x NT 0,1% REC	Aceito (0,026)
NT 0,1% 24h x NT 0,1% 72h	Aceito (0,08)
NT 0,1% 24h x NT 0,1% 0h	Aceito (0,32)
NT 0,1% REC x NT 0,1% 0h	Aceito (0,08)
<b>NT 12%</b>	
NT 12% 0h x CO 0h	Aceito (0,00)
NT 12% 24h x CO 24h	Aceito (0,50)
NT 12% 72h x CO 72h	Aceito (0,09)
NT 12% REC x CO REC	Aceito (0,02)
NT 12% 24h x NT 12% 0h	Aceito (0,50)
NT 12% 0h x NT 12% 72h	Aceito (0,32)
NT 12% 0h x NT 12% REC	Aceito (0,02)
NT 12% 24h x NT 12% 72h	Aceito (0,003)
NT 12% 24h x NT 12% REC	Aceito (0,16)
NT 12% 72h x NT 12% REC	Aceito (0,09)
<b>NT 50%</b>	
NT 50% 0h x CO 0h	Aceito (0,00)
NT 50% 24h x CO 24h	Rejeito (6,48)
NT 50% 72h x CO 72h	Aceito (1,44)
NT 50% REC x CO REC	Aceito (3,38)
NT 50% 24h x NT 50% 0h	Rejeito (6,48)
NT 50% 0h x NT 50% 72h	Aceito (3,38)
NT 50% 0h x NT 50% REC	Aceito (3,38)
NT 50% 24h x NT 50% 72h	Aceito (0,026)
NT 50% 24h x NT 50% REC	Aceito (0,035)
NT 50% 72h x NT 50% REC	Aceito (0,00)
<b>NT 100%</b>	
NT 100% 0h x CO 0h	Aceito (0,00)
NT 100% 24h x CO 24h	Rejeito (9,68)
NT 100% 72h x CO 72h	Rejeito (4,00)
NT 100% REC x CO REC	Rejeito (4,50)

NT 100% 24h x NT 100% 0h	<i>Rejeito (9,68)</i>
NT 100% 0h x NT 100% 72h	<i>Rejeito (8,82)</i>
NT 100% 0h x NT 100% REC	<i>Rejeito (4,50)</i>
NT 100% 24h x NT 100% 72h	Aceito (0,0008)
NT 100% 24h x NT 100% REC	Aceito (0,037)
NT 100% 72h x NT 100% REC	Aceito (0,045)

TABELA VII – Resultado final do cálculo do qui-quadrado total, referente às freqüência de aberrações cromossômicas, comparando os resultados do controle com as concentrações 0,1, 12, 50 e 100% do efluente tratado de papel e celulose e entre as concentrações, em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*. O grau de liberdade = 1 e o Qui-quadrado da tabela = 3,84, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses:  $H_0$ : Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações.  $H_1$ : Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando  $H_0$ .

<b>FREQÜÊNCIA DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS</b>	
<b>T 0,1%</b>	
<b>CONTROLE/TRATAMENTO</b>	<b>RESULTADO</b>
T 0,1% 0h x CO 0h	Aceito (0,02)
T 0,1% 24h x CO 24h	Aceito (0,00)
T 0,1% 72h x CO 72h	Aceito (0,09)
T 0,1% REC x CO REC	Aceito (0,18)
T 0,1% 24h x T 0,1% 0h	Aceito (0,01)
T 0,1% 0h x T 0,1% 72h	Aceito (0,09)
T 0,1% 0h x T 0,1% REC	Aceito (0,04)
T 0,1% 24h x T 0,1% 72h	Aceito (0,32)
T 0,1% 24h x T 0,1% REC	Aceito (0,045)
T 0,1% 72h x T 0,1% REC	Aceito (0,005)
<b>T 12%</b>	
T 12% 0h x CO 0h	Aceito (0,00)
T 12% 24h x CO 24h	Aceito (1,28)
T 12% 72h x CO 72h	Aceito (0,64)
T 12% REC x CO REC	Aceito (0,08)
T 12% 24h x T 12% 0h	Aceito (1,28)
T 12% 0h x T 12% 72h	Aceito (1,72)
T 12% 0h x T 12% REC	Aceito (0,08)
T 12% 24h x T 12% 72h	Aceito (0,002)
T 12% 24h x T 12% REC	Aceito (0,24)
T 12% 72h x T 12% REC	Aceito (0,32)
<b>T 50%</b>	
T 50% 0h x CO 0h	Aceito (0,00)
T 50% 24h x CO 24h	<i>Rejeito (7,22)</i>
T 50% 72h x CO 72h	Aceito (1,96)
T 50% REC x CO REC	Aceito (0,32)
T 50% 24h x T 50% 0h	<i>Rejeito (7,22)</i>

T 50% 0h x T 50% 72h	<i>Rejeito (4,50)</i>
T 50% 0h x T 50% REC	<i>Aceito (0,32)</i>
T 50% 24h x T 50% 72h	<i>Aceito (0,016)</i>
T 50% 24h x T 50% REC	<i>Aceito (0,90)</i>
T 50% 72h x T 50% REC	<i>Aceito (0,48)</i>
<b>T 100%</b>	
T 100% 0h x CO 0h	<i>Aceito (0,02)</i>
T 100% 24h x CO 24h	<i>Rejeito (4,50)</i>
T 100% 72h x CO 72h	<i>Rejeito (5,76)</i>
T 100% REC x CO REC	<i>Rejeito (3,92)</i>
T 100% 24h x T 100% 0h	<i>Aceito (1,96)</i>
T 100% 0h x T 100% 72h	<i>Rejeito (5,76)</i>
T 100% 0h x T 100% REC	<i>Aceito (1,69)</i>
T 100% 24h x T 100% 72h	<i>Aceito (0,125)</i>
T 100% 24h x T 100% REC	<i>Aceito (0,001)</i>
T 100% 72h x T 100% REC	<i>Aceito (0,161)</i>

TABELA VIII – Resultado final do Teste T, referente ao índice de prófase, comparando os tempos de permanência em água não clorada de 0, 24, 72h e recuperação (24h) das células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses: H<sub>0</sub>: Não há diferença estatisticamente significativa entre os tempos de exposição em água desclorada. H<sub>1</sub>: Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando H<sub>0</sub>.

<b>ÍNDICE DE PRÓFASE</b>	
<b>CONTROLE X CONTROLE</b>	<b>RESULTADO</b>
CO 0h x CO 24h	<i>Aceito</i>
CO 0h x CO 72h	<i>Aceito</i>
CO 0h x CO REC	<i>Aceito</i>
CO 24h x CO 72h	<i>Aceito</i>
CO 24h x CO 72h	<i>Aceito</i>
CO 72h x CO REC	<i>Aceito</i>

TABELA IX – Resultado final do Teste T, referente ao índice de prófase, comparando os resultados do controle com as concentrações 0,1, 12, 50 e 100% do efluente *não tratado* de papel e celulose e entre as concentrações, em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses:  $H_0$ : Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações.  $H_1$ : Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando  $H_0$ .

<b>ÍNDICE DE PRÓFASE</b>	
<b>NT 0,1%</b>	
<b>CONTROLE/TRATAMENTO</b>	<b>RESULTADO</b>
NT 0,1% 0h x CO 0h	Aceito
NT 0,1% 24h x CO 24h	<i>Rejeito</i>
NT 0,1% 72h x CO 72h	Aceito
NT 0,1% REC x CO REC	Aceito
NT 0,1% 24h x NT 0,1% 72h	Aceito
NT 0,1% 24h x NT 0,1% REC	Aceito
NT 0,1% 72h x NT 0,1% REC	Aceito
<b>NT 12%</b>	
NT 12% 0h x CO 0h	Aceito
NT 12% 24h x CO 24h	<i>Rejeito</i>
NT 12% 72h x CO 72h	Aceito
NT 12% REC x CO REC	Aceito
NT 12% 24h x NT 12% 72h	<i>Rejeito</i>
NT 12% 24h x NT 12% REC	Aceito
NT 12% 72h x NT 12% REC	Aceito
<b>NT 50%</b>	
NT 50% 0h x CO 0h	Aceito
NT 50% 24h x CO 24h	<i>Rejeito</i>
NT 50% 72h x CO 72h	Aceito
NT 50% REC x CO REC	Aceito
NT 50% 24h x NT 50% 72h	Aceito
NT 50% 24h x NT 50% REC	Aceito
NT 50% 72h x NT 50% REC	Aceito
<b>NT 100%</b>	
NT 100% 0h x CO 0h	Aceito
NT 100% 24h x CO 24h	Aceito
NT 100% 72h x CO 72h	Aceito
NT 100% REC x CO REC	Aceito
NT 100% 24h x NT 100% 72h	Aceito
NT 100% 24h x NT 100% REC	Aceito
NT 100% 72h x NT 100% REC	Aceito

TABELA X – Resultado final do Teste T, referente ao índice de prófase, comparando os resultados do controle com as concentrações 0,1, 12, 50 e 100% do efluente *tratado* de papel e celulose e entre as concentrações, em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses:  $H_0$ : Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações.  $H_1$ : Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando  $H_0$ .

<b>ÍNDICE DE PRÓFASE</b>	
<b>T 0,1%</b>	
<b>CONTROLE/TRATAMENTO</b>	<b>RESULTADO</b>
T 0,1% 0h x CO 0h	Aceito
T 0,1% 24h x CO 24h	Aceito
T 0,1% 72h x CO 72h	Aceito
T 0,1% REC x CO REC	Aceito
T 0,1% 24h x T 0,1% 72h	Aceito
T 0,1% 24h x T 0,1% REC	Aceito
T 0,1% 72h x T 0,1% REC	Aceito
<b>T 12%</b>	
T 12% 0h x CO 0h	Aceito
T 12% 24h x CO 24h	Aceito
T 12% 72h x CO 72h	Aceito
T 12% REC x CO REC	Aceito
T 12% 24h x T 12% 72h	Aceito
T 12% 24h x T 12% REC	Aceito
T 12% 72h x T 12% REC	Aceito
<b>T 50%</b>	
T 50% 0h x CO 0h	Aceito
T 50% 24h x CO 24h	Aceito
T 50% 72h x CO 72h	Aceito
T 50% REC x CO REC	Aceito
T 50% 24h x T 50% 72h	Aceito
T 50% 24h x T 50% REC	Aceito
T 50% 72h x T 50% REC	Aceito
<b>T 100%</b>	
T 100% 0h x CO 0h	Aceito
T 100% 24h x CO 24h	Aceito
T 100% 72h x CO 72h	Aceito
T 100% REC x CO REC	Aceito
T 100% 24h x T 100% 72h	Aceito
T 100% 24h x T 100% REC	Aceito
T 100% 72h x T 100% REC	Aceito



TABELA XI – Resultado final do Teste T, referente ao índice de metáfase, comparando os tempos de permanência em água não clorada (controle negativo) de 0, 24, 72h e recuperação (24h) das células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*. O grau de liberdade = 1 e o Qui-quadrado da tabela = 3,84, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses: H<sub>0</sub>: Não há diferença estatisticamente significativa entre os tempos de exposição em água desclorada. H<sub>1</sub>: Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando H<sub>0</sub>.

<b>ÍNDICE DE METÁFASE</b>	
<b>CONTROLE/CONTROLE</b>	<b>RESULTADO</b>
CO 0h x CO 24h	Aceito
CO 0h x CO 72h	Aceito
CO 0h x CO REC	Aceito
CO 24h x CO 72h	Aceito
CO 24h x CO REC	Aceito
CO 72h x CO REC	Aceito

TABELA XII – Resultado final do Teste T, referente ao índice de metáfase, comparando os resultados do controle com as concentrações 0,1, 12, 50 e 100% do efluente *não tratado* de papel e celulose e entre as concentrações, em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses: H<sub>0</sub>: Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações. H<sub>1</sub>: Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando H<sub>0</sub>.

<b>ÍNDICE DE METÁFASE</b>	
<b>NT 0,1%</b>	
<b>CONTROLE/TRATAMENTO</b>	<b>RESULTADO</b>
NT 0,1% 0h x CO 0h	Aceito
NT 0,1% 24h x CO 24h	Aceito
NT 0,1% 72h x CO 72h	Aceito
NT 0,1% REC x CO REC	Aceito
NT 0,1% 24h x NT 0,1% 72h	Aceito
NT 0,1% 24h x NT 0,1% REC	Aceito
NT 0,1% 72h x NT 0,1% REC	Aceito
<b>NT 12%</b>	
NT 12% 0h x CO 0h	Aceito
NT 12% 24h x CO 24h	Rejeito

NT 12% 72h x CO 72h	Aceito
NT 12% REC x CO REC	Aceito
NT 12% 24h x NT 12% 72h	Aceito
NT 12% 24h x NT 12% REC	Aceito
NT 12% 72h x NT 12% REC	Aceito
<b>NT 50%</b>	
NT 50% 0h x CO 0h	<i>Rejeito</i>
NT 50% 24h x CO 24h	Aceito
NT 50% 72h x CO 72h	Aceito
NT 50% REC x CO REC	Aceito
NT 50% 24h x NT 50% 72h	Aceito
NT 50% 24h x NT 50% REC	Aceito
NT 50% 72h x NT 50% REC	Aceito
<b>NT 100%</b>	
NT 100% 0h x CO 0h	Aceito
NT 100% 24h x CO 24h	Aceito
NT 100% 72h x CO 72h	Aceito
NT 100% REC x CO REC	Aceito
NT 100% 24h x NT 100% 72h	Aceito
NT 100% 24h x NT 100% REC	Aceito
NT 100% 72h x NT 100% REC	Aceito

TABELA XIII – Resultado final do Teste T, referente ao índice de metáfase, comparando os resultados do controle com as concentrações 0,1, 12, 50 e 100% do efluente *tratado* de papel e celulose e entre as concentrações, em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses: H<sub>0</sub>: Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações. H<sub>1</sub>: Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando H<sub>0</sub>.

<b>ÍNDICE DE METÁFASE</b>	
<b>T 0,1%</b>	
<b>CONTROLE/TRATAMENTO</b>	<b>RESULTADO</b>
T 0,1% 0h x CO 0h	Aceito
T 0,1% 24h x CO 24h	Aceito
T 0,1% 72h x CO 72h	Aceito
T 0,1% REC x CO REC	Aceito
T 0,1% 24h x T 0,1% 72h	<i>Rejeito</i>
T 0,1% 24h x T 0,1% REC	Aceito
T 0,1% 72h x T 0,1% REC	Aceito
<b>T 12%</b>	
T 12% 0h x CO 0h	Aceito
T 12% 24h x CO 24h	<i>Rejeito</i>
T 12% 72h x CO 72h	Aceito
T 12% REC x CO REC	Aceito
T 12% 24h x T 12% 72h	Aceito
T 12% 24h x T 12% REC	Aceito
T 12% 72h x T 12% REC	Aceito
<b>T 50%</b>	
T 50% 0h x CO 0h	Aceito
T 50% 24h x CO 24h	Aceito
T 50% 72h x CO 72h	Aceito
T 50% REC x CO REC	Aceito
T 50% 24h x T 50% 72h	Aceito
T 50% 24h x T 50% REC	Aceito
T 50% 72h x T 50% REC	Aceito
<b>T 100%</b>	
<b>TRATAMENTO/CONCENTRAÇÃO</b>	<b>RESULTADO</b>
T 100% 24h x CO 24h	Aceito
T 100% 72h x CO 72h	Aceito
T 100% REC x CO REC	Aceito
T 100% 24h x T 100% 72h	<i>Rejeito</i>
T 100% 24h x T 100% REC	Aceito
T 100% 72h x T 100% REC	Aceito

TABELA XIV – Resultado final do Teste T, referente ao índice de anáfase, comparando os tempos de permanência em água não clorada (controle negativo) de 0, 24, 72h e recuperação (24h) das células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses: H<sub>0</sub>: Não há diferença estatisticamente significativa entre os tempos de exposição em água desclorada. H<sub>1</sub>: Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando H<sub>0</sub>.

<b>ÍNDICE DE ANÁFASE</b>	
<b>CONTROLE X CONTROLE</b>	<b>RESULTADO</b>
CO 0h x CO 24h	Aceito
CO 0h x CO 72h	Aceito
CO 0h x CO REC	Aceito
CO 24h x CO 72h	Aceito
CO 24h x CO 72h	Aceito
CO 72h x CO REC	Aceito

TABELA XV – Resultado final do Teste T, referente ao índice de anáfase, comparando os resultados do controle com as concentrações 0,1, 12, 50 e 100% do efluente *não tratado* de papel e celulose e entre as concentrações, em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses: H<sub>0</sub>: Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações. H<sub>1</sub>: Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando H<sub>0</sub>.

<b>ÍNDICE DE ANÁFASE</b>	
<b>NT 0,1%</b>	
<b>CONTROLE/TRATAMENTO</b>	<b>RESULTADO</b>
NT 0,1% 0h x CO 0h	Aceito
NT 0,1% 24h x CO 24h	Aceito
NT 0,1% 72h x CO 72h	Aceito
NT 0,1% REC x CO REC	Aceito
NT 0,1% 24h x NT 0,1% 72h	Aceito
NT 0,1% 24h x NT 0,1% REC	Aceito
NT 0,1% 72h x NT 0,1% REC	Aceito
<b>NT 12%</b>	
NT 12% 0h x CO 0h	Aceito
NT 12% 24h x CO 24h	Aceito
NT 12% 72h x CO 72h	Aceito
NT 12% REC x CO REC	Aceito
NT 12% 24h x NT 12% 72h	Aceito
NT 12% 24h x NT 12% REC	Aceito

NT 12% 72h x NT 12% REC	Aceito
<b>NT 50%</b>	
NT 50% 0h x CO 0h	Aceito
NT 50% 24h x CO 24h	Aceito
NT 50% 72h x CO 72h	<i>Rejeito</i>
NT 50% REC x CO REC	Aceito
NT 50% 24h x NT 50% 72h	Aceito
NT 50% 24h x NT 50% REC	Aceito
NT 50% 72h x NT 50% REC	Aceito
<b>NT 100%</b>	
NT 100% 0h x CO 0h	Aceito
NT 100% 24h x CO 24h	<i>Rejeito (10,730)</i>
NT 100% 72h x CO 72h	Aceito
NT 100% REC x CO REC	Aceito
NT 100% 24h x NT 100% 72h	Aceito
NT 100% 24h x NT 100% REC	Aceito
NT 100% 72h x NT 100% REC	Aceito

TABELA XVI – Resultado final do Teste T, referente ao índice de anáfase, comparando os resultados do controle com as concentrações 0,1, 12, 50 e 100% do efluente tratado de papel e celulose e entre as concentrações, em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses:  $H_0$ : Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações.  $H_1$ : Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando  $H_0$ .

<b>ÍNDICE DE ANÁFASE</b>	
<b>T 0,1%</b>	
<b>TRATAMENTO/CONCENTRAÇÃO</b>	<b>RESULTADO</b>
T 0,1% 0h x CO 0h	Aceito
T 0,1% 24h x CO 24h	Aceito
T 0,1% 72h x CO 72h	Aceito
T 0,1% REC x CO REC	Aceito
T 0,1% 24h x T 0,1% 72h	Aceito
T 0,1% 24h x T 0,1% REC	Aceito
T 0,1% 72h x T 0,1% REC	Aceito
<b>T 12%</b>	
T 12% 0h x CO 0h	Aceito
T 12% 24h x CO 24h	Aceito
T 12% 72h x CO 72h	Aceito
T 12% REC x CO REC	Aceito
T 12% 24h x T 12% 72h	Aceito
T 12% 24h x T 12% REC	Aceito
T 12% 72h x T 12% REC	Aceito

<b>T 50%</b>	
T 50% 0h x CO 0h	Aceito
T 50% 24h x CO 24h	Aceito
T 50% 72h x CO 72h	Aceito
T 50% 0h x T 50% REC	Aceito
T 50% 24h x T 50% 72h	Aceito
T 50% 24h x T 50% REC	Aceito
T 50% 72h x T 50% REC	Aceito
<b>T 100%</b>	
T 100% 0h x CO 0h	Aceito
T 100% 24h x CO 24h	Aceito
T 100% 72h x CO 72h	Aceito
T 100% REC x CO REC	Aceito
T 100% 24h x T 100% 72h	Aceito
T 100% 24h x T 100% REC	Aceito
T 100% 72h x T 100% REC	Aceito

TABELA XVII – Resultado final do Teste T, referente ao índice de telófase, comparando os tempos de permanência em água não clorada ( controle negativo) de 0, 24, 72h e recuperação (24h) das células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses:  $H_0$ : Não há diferença estatisticamente significativa entre os tempos de exposição em água desclorada.  $H_1$ : Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando  $H_0$ .

<b>ÍNDICE DE TELÓFASE</b>	
<b>CONTROLE X CONTROLE</b>	<b>RESULTADO</b>
CO 0h x CO 24h	Aceito
CO 0h x CO 72h	Aceito
CO 0h x CO REC	Aceito
CO 24h x CO 72h	Aceito
CO 24h x CO 72h	Aceito
CO 72h x CO REC	Aceito

TABELA XVIII – Resultado final do Teste T, referente ao índice de telófase, comparando os resultados do controle com as concentrações 0,1, 12, 50 e 100% do efluente não tratado de papel e celulose e entre as concentrações, em células meristemáticas de raiz de *Allium*, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses:  $H_0$ : Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações.  $H_1$ : Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando  $H_0$ .

<b>ÍNDICE DE TELÓFASE</b>	
<b>NT 0,1%</b>	
<b>CONTROLE/TRATAMENTO</b>	<b>RESULTADO</b>
NT 0,1% 0h x CO 0h	Aceito
NT 0,1% 24h x CO 24h	Aceito
NT 0,1% 72h x CO 72h	Aceito
NT 0,1% REC x CO REC	Aceito
NT 0,1% 24h x NT 0,1% 72h	Aceito
NT 0,1% 24h x NT 0,1% REC	Aceito
NT 0,1% 72h x NT 0,1% REC	Aceito
<b>NT 12%</b>	
NT 12% 0h x CO 0h	Aceito
NT 12% 24h x CO 24h	Aceito
NT 12% 72h x CO 72h	Aceito
NT 12% REC x CO REC	Aceito
NT 12% 24h x NT 12% 72h	Aceito
NT 12% 24h x NT 12% REC	Aceito
NT 12% 72h x NT 12% REC	Aceito
<b>NT 50%</b>	
NT 50% 0h x CO 0h	Aceito
NT 50% 24h x CO 24h	Aceito
NT 50% 72h x CO 72h	Aceito
NT 50% REC x CO REC	Aceito
NT 50% 24h x NT 50% 72h	Aceito
NT 50% 24h x NT 50% REC	Aceito
NT 50% 72h x NT 50% REC	Aceito
<b>NT 100%</b>	
NT 100% 0h x CO 0h	Aceito
NT 100% 24h x CO 24h	Aceito
NT 100% 72h x CO 72h	Aceito
NT 100% REC x CO REC	Aceito
NT 100% 24h x NT 100% 72h	Aceito
NT 100% 24h x NT 100% REC	Aceito
NT 100% 72h x NT 100% REC	Aceito

TABELA XIX – Resultado final do Teste T, referente ao índice de telófase, comparando os resultados do controle com as concentrações 0,1, 12, 50 e 100% do efluente tratado de papel e celulose e entre as concentrações, em células meristemáticas de raiz de *Allium*, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses: H<sub>0</sub>: Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações. H<sub>1</sub>: Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando H<sub>0</sub>.

<b>ÍNDICE DE TELÓFASE</b>	
<b>T 0,1%</b>	
<b>CONTROLE/ TRATAMENTO</b>	<b>RESULTADO</b>
T 0,1% 0h x CO 0h	Aceito
T 0,1% 24h x CO 24h	Aceito
T 0,1% 72h x CO 72h	Aceito
T 0,1% REC x CO REC	Aceito
T 0,1% 24h x T 0,1% 72h	Aceito
T 0,1% 24h x T 0,1% REC	Aceito
T 0,1% 72h x T 0,1% REC	Aceito
<b>T 12%</b>	
T 12% 0h x CO 0h	Aceito
T 12% 24h x CO 24h	Aceito
T 12% 72h x CO 72h	Aceito
T 12% REC x CO REC	Aceito
T 12% 24h x T 12% 72h	Aceito
T 12% 24h x T 12% REC	Aceito
T 12% 72h x T 12% REC	Aceito
<b>T 50%</b>	
T 50% 0h x CO 0h	Aceito
T 50% 24h x CO 24h	Aceito
T 50% 72h x CO 72h	Aceito
T 50% REC x CO REC	Aceito
T 50% 24h x T 50% 72h	Aceito
T 50% 24h x T 50% REC	Aceito
T 50% 72h x T 50% REC	Aceito
<b>T 100%</b>	
T 100% 0h x CO 0h	Aceito
T 100% 24h x CO 24h	Aceito
T 100% 72h x CO 72h	Aceito
T 100% REC x CO REC	Aceito
T 100% 24h x T 100% 72h	Aceito
T 100% 24h x T 100% REC	Aceito
T 100% 72h x T 100% REC	Aceito



TABELA XX – Resultado final do Teste T, referente a avaliação da peroxidação lipídica (TBARS), comparando os resultados do controle com as concentrações 0,1 e 100% do efluente *não tratado* e *tratado* de papel e celulose e entre as concentrações, em células meristemáticas de raiz de *Allium*, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses:  $H_0$ : Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações.  $H_1$ : Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando  $H_0$ .

<b>TBARS</b>	
<b>NT 0,1% e NT 100%</b>	
<b>CONTROLE/ TRATAMENTO</b>	<b>RESULTADO</b>
NT 0,1% 24h x CO	<i>Rejeito</i>
NT 0,1% x REC	Aceito
NT 100% 24h x CO	<i>Rejeito</i>
NT 100% x REC	Aceito
NT 0,1% 24h x NT 100% 24h	Aceito
<b>T 0,1% e T 100%</b>	
T 0,1% 24h x CO	Aceito
T 0,1% 24h x REC	Aceito
T 100% 24h x CO	<i>Rejeito</i>
T 100% 24h x REC	Aceito
T 0,1% 24h x T 100% 24h	Aceito

TABELA XXI – Resultado final do Teste T, referente a concentração de GSH, comparando os resultados do controle com as concentrações 0,1 e 100% do efluente *não tratado* e *tratado* de papel e celulose e entre as concentrações, em células meristemáticas de raiz de *Allium*, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses:  $H_0$ : Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações.  $H_1$ : Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando  $H_0$ .

<b>GSH</b>	
<b>NT 0,1% e NT 100%</b>	
<b>CONTROLE/ TRATAMENTO</b>	<b>RESULTADO</b>
NT 0,1% 24h x CO	Aceito
NT 0,1% x REC	Aceito

NT 100% 24h x CO	Aceito
NT 100% x REC	Aceito
NT 0,1% 24h x NT 100% 24h	Aceito
<b>T 0,1% e T 100%</b>	
T 0,1% 24h x CO	Aceito
T 0,1% 24h x REC	Aceito
T 100% 24h x CO	<b>Aceito</b>
T 100% 24h x REC	Aceito
T 0,1% 24h x T 100% 24h	Aceito

TABELA XXII – Resultado final do Teste T, referente a concentração de CAT, comparando os resultados do controle com as concentrações 0,1 e 100% do efluente *não tratado* e *tratado* de papel e celulose e entre as concentrações, em células meristemáticas de raiz de *Allium*, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses:  $H_0$ : Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações.  $H_1$ : Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando  $H_0$ .

<b>CAT</b>	
<b>NT 0,1% e NT 100%</b>	
<b>CONTROLE/ TRATAMENTO</b>	<b>RESULTADO</b>
NT 0,1% 24h x CO	Aceito
NT 0,1% x REC	Aceito
NT 100% 24h x CO	Aceito
NT 100% x REC	Aceito
NT 0,1% 24h x NT 100% 24h	Aceito
<b>T 0,1% e T 100%</b>	
T 0,1% 24h x CO	Aceito
T 0,1% 24h x REC	Aceito
T 100% 24h x CO	<i>Rejeito</i>
T 100% 24h x REC	Aceito
T 0,1% 24h x T 100% 24h	Aceito

TABELA XXIII – Resultado final do Teste T, referente a atividade da GST, comparando os resultados do controle com as concentrações 0,1 e 100% do efluente *não tratado* e *tratado* de papel e celulose e entre as concentrações, em células meristemáticas de raiz de *Allium*, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses:  $H_0$ : Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações.  $H_1$ : Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando  $H_0$ .

<b>GST</b>	
<b>NT 0,1% e NT 100%</b>	
<b>CONTROLE/ TRATAMENTO</b>	<b>RESULTADO</b>
NT 0,1% 24h x CO	Aceito
NT 0,1% x REC	Aceito
NT 100% 24h x CO	Aceito
NT 100% x REC	Aceito
NT 0,1% 24h x NT 100% 24h	Aceito
<b>T 0,1% e T 100%</b>	
T 0,1% 24h x CO	<i>Rejeito</i>
T 0,1% 24h x REC	Aceito
T 100% 24h x CO	<i>Rejeito</i>
T 100% 24h x REC	Aceito
T 0,1% 24h x T 100% 24h	Aceito

TABELA XXIV – Resultado final do cálculo do qui-quadrado total, referente às freqüência de cometas de classe  $\geq 1$ , comparando os resultados do controle com as concentrações 0,1 e 100% do efluente *não tratado* e *tratado* de papel e celulose e entre as concentrações, em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*. O grau de liberdade = 1 e o Qui-quadrado da tabela = 3,84, em nível de significância de 5%. Foram consideradas as seguintes hipóteses:  $H_0$ : Não há diferença estatisticamente significativa entre os controles e os tratamentos, em uma dada concentração e período de tempo, ou entre as concentrações.  $H_1$ : Há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados. As respostas dos testes foram dadas considerando  $H_0$ .

<b>FREQÜÊNCIA DE COMETAS DE CLASSE <math>\geq 1</math></b>	
<b>NT 0,1% e NT 100%</b>	
<b>CONTROLE/TRATAMENTO</b>	<b>RESULTADO</b>
NT 0,1% 24h x CO	<i>Rejeito</i> (18)
NT 100% 24h x CO 24h	<i>Rejeito</i> (98)
NT 0,1% 24h x NT 100% 24h	<i>Rejeito</i> (8)
<b>T 0,1% e T 100%</b>	
T 0,1% 24h x CO	<i>Rejeito</i> (220,5)
T 100% 24h x CO 24h	<i>Rejeito</i> (336,11)
T 0,1% 24h x T 100% 24h	<i>Rejeito</i> (33,33)









