

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA ELICEU MACIEL**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**



Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA CINZA DE CASCA DE ARROZ**

**Prof. João Nelci Brandalise**  
Engenheiro Agrônomo

Pelotas, 2018

**Prof. João Nelci Brandalise**  
Engenheiro Agrônomo

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA CINZA DE CASCA DE ARROZ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Érico Kunde Corrêa

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

B111a Brandalise, João Nelci

Avaliação ecotoxicológica da cinza de casca de arroz /  
João Nelci Brandalise ; Érico Kunde Corrêa, orientador. —  
Pelotas, 2018.  
105 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação  
em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de  
Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas,  
2018.

1. Resíduos da agroindústria. 2. Impacto ambiental. 3.  
Gestão ambiental. 4. Gestão de resíduos. 5. Bioenergia. I.  
Corrêa, Érico Kunde, orient. II. Título.

CDD : 633.18

**Prof. João Nelci Brandalise**  
Engenheiro Agrônomo

## **AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA CINZA DE CASCA DE ARROZ**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 26 de março de 2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Érico Kunde Correa – ESA/UFPEL (Orientador).  
Doutorado em Biotecnologia Ambiental pela Universidade Federal de Pelotas – UFPEL.

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi. Doutor em Biologia Molecular Vegetal pela Ecole Nationale Superieure Agronomique de Toulouse.

Prof. Dr. Moacir Cardoso Elias. Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Lucia Bobrowski. Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dedico este trabalho a minha esposa, Maria Serafina Pinto Brandalise e aos filhos Anne Pinto Brandalise, Mauricio Pinto Brandalise e Mariane Pinto Brandalise em razão de que com o amor da família as dificuldades são sempre superadas.

E pela importância que tiveram na minha vida dedico este momento também a minha primeira Professora, Irmã Gilda, do Colégio Sagrado Coração de Jesus de Nova Bassano - RS, pois ao me ensinar as cores me possibilitou através da imaginação ver e contemplar a beleza do colorido dos componentes da natureza. Ao me apresentar às letras e os números me habilitou à leitura e conseqüentemente à compreensão das diferentes expressões culturais, sociais e econômicas, bem como, as dimensões do espaço e que a saudade é diretamente proporcional a passagem do tempo.

Da mesma forma quero dedicar este momento a todos os demais professores que participaram da minha educação e em especial aos professores do Curso de Agronomia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel.

## AGRADECIMENTOS

Ao concluir esta importante etapa da minha vida não podia deixar de agradecer a todos aqueles que contribuíram para sua realização:

Ao meu orientador professor, Dr. Érico Kunde Corrêa, por me estimular a ingressar no curso, pela dedicação e ao incondicional apoio recebido para execução dos trabalhos.

Da mesma forma, não posso deixar de externar minha gratidão:

Às Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup>. Vera Lúcia Bobrowski e Beatriz Helena Gomes Rocha pelas inspiradoras sugestões.

Aos Professores, Dr. Maurizio Silveira Quadro, Dr. Willian Silva Barros, Dr. Anderson Schwingel Ribeiro e Dra. Adriane Medeiros Nunes pelo prestigiado incentivo e auxílio recebido.

Aos professores que participam do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo acolhimento, auxílio, orientação e atenção recebida durante todas as etapas deste trabalho.

À doutoranda Emanuelle R. Lopes e ao Eng, Flor. Dr Maicon Nardino, bolsista de pós-doutorado pela disponibilidade e contribuição na execução das análises e avaliação dos dados.

À equipe do Núcleo de Educação, Pesquisa e Extensão em Resíduos e Sustentabilidade - NEPERS do Centro de Engenharia coordenado pelo Prof. Dr. Erico Kunde Corrêa e à Prof. Dra. Luciara Bilhalva Corrêa constituída pelo Dr. Matheus Francisco da Paz, Mestrandos Gabriel Afonso Martins e Lucas Lourenço Castiglioni Guidoni e aos acadêmicos Gabriel Hartur Xavier, Matheus Torres Nazari, Pamela Lais Cabral Silva e Paula Paiva Hofmeister, por estarem sempre disponíveis a me dar suporte na execução dos trabalhos além de uma convivência de mútuo aprendizado.

Aos professores do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética e do Departamento de Morfologia do Instituto de Biologia pela atenção e apoio recebido e em especial ao técnico Álvaro Miguel Moreira Martins.

E para finalizar agradeço os meus familiares pela ajuda, compreensão e incentivo recebido em mais uma esta etapa da vida.

Muito obrigado a todos.

O mais importante e bonito do mundo é  
isso: que as pessoas não estão sempre  
iguais, mas que elas vão sempre  
mudando.

Guimarães Rosa

## RESUMO

BRANDALISE, João Nelci, **AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICO DA CINZA DE CASCA**, 2018. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

O arroz (*Oryza sativa*, L.) é o segundo alimento mais consumido no mundo, ao ser beneficiado produz a casca de arroz, que corresponde a  $\pm 23\%$ , do peso do arroz em grão. Seu uso como fonte de energia renovável tem crescido nas últimas décadas e conseqüentemente a gera a cinza de casca de arroz que equivale a  $\pm 4\%$  do peso do grão de arroz em casca. Embora a incorporação ao solo da CCA seja considerada favorável ambientalmente, na prática ela é depositada nas proximidades das lavouras ou em aterros, permanecendo exposta a ação dos fatores climáticos, responsáveis por promover a dispersão e acarretar impactos ambientais indesejados aos ecossistemas além de por em risco a saúde humana. Neste cenário, o projeto tem por objetivo avaliar o potencial ecotoxicológico das CCAs, oriundas de três diferentes processos de queima, utilizando-se para tanto da análise dos constituintes físicos e químicos da CCA, o índice de germinação, como variável resposta dos bioindicadores *Lactuca sativa* L (alface); *Allium cepa* (cebola) e *Brassica oleracea* (repolho) para qualificar a fitotoxicidade e o teste *Allium cepa* L. para avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade. Os resultados evidenciaram que as cinzas dos distintos processos apresentaram na sua composição elementos com diferentes concentrações, teores e índices que as tornam diferentes entre si. Na avaliação da ação fitotóxica das variáveis independentes Al, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Ti, umidade, matéria orgânica e pH sobre os bioindicadores alface, cebola e repolho houve uma redução significativa do índice de germinação da alface (63.66%), cebola (30.87%) e repolho (37.55%), no tratamento do processo II, que apresentou uma correlação de causa e efeito positiva significativa do Cu via matéria orgânica e pH, sugerindo com isso que entre outros fatores, que se deva a maior concentração de Cu e aos menores valores da matéria orgânica e pH presentes no processo II na comparação com os processos I e III. Na avaliação da citotoxicológica, teste *Allium cepa* L., observou-se uma inibição do índice mitótico no processo II, na comparação com o tratamento controle da ordem de 35.5%, debitada ao efeito do AL numa ação sinérgica com o Cu. Os resultados das investigações de genotoxicidade não foram significativos demonstrando que inexistem substâncias com potencial tóxico capaz de interferir no material genético. Conclui-se que as CCAs do processo II apresentam características bioativas de efeito fitotóxicos sobre a alface, cebola e repolho e citotóxico para a cebola. Os resultados podem contribuir na compreensão dos mecanismos de interação com o meio ambiente e na tomada de decisão do destino final adequado da CCA.

**Palavras-chaves:** resíduos da agroindústria, impacto ambiental, gestão ambiental, gestão de resíduos, bioenergia.

## ABSTRACT

### ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF RICE HUSK ASH

Rice (*Oryza sativa*, L.) is the second most consumed food in the world, and when being benefited it produces the husk, which corresponds to  $\pm 23\%$  of the rice grain weight. Its use as a source of renewable energy has increased in the last decades and, consequently, the generation of rice husk ash, which accounts for  $\pm 4\%$  of the rice grain weight as husk. Although the incorporation of the RHA (CCA) to the ground is considered environmentally favorable, in practice, it is placed near crops or in landfills, being exposed to the actions of climate factors, responsible for promoting its spread and causing not desirable environmental impact on ecosystems, besides the risks to human health. In this scenario, the project has the objective to evaluate the RHA ecotoxicological power from three different types of burn, using the analysis of RHA physic and chemical constituents, the germination index, and as variables answers the bioindicators *Lactuca sativa* L. (lettuce), *Allium cepa* (onion), and *Brassica oleracea* (cabbage), to qualify the phytotoxicity and *Allium cepa* L. to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity. The results evidenced that the ashes of the different processes presented in their composition elements with different concentrations, contents and indices that make them different from each other. In the evaluation of the phytotoxic action of the independent variables Al, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Ti, moisture, organic matter and pH on the lettuce, onion and cabbage bioindicators there was a significant reduction of the germination index of the lettuce (63.66%), onion (30.87%) and cabbage (37.55%), in the treatment of process II, which showed a correlation of significant positive cause and effect of Cu via organic matter and pH, suggesting that among other factors, due to the higher concentration of Cu and the lower values of organic matter and pH present in process II in comparison with processes I and III. In the evaluation of the cytotoxicological test *Allium cepa* L., an inhibition of the mitotic index in process II was observed in the comparison with the control treatment of the order of 35.5%, due to the effect of Al on a synergistic action with Cu. The results of genotoxicity investigations were not significant, showing that there are not substances with toxic power capable to interfere the genetic material. It was concluded that the RHA of process II presented bioactive characteristics with phytotoxic effect on lettuce, onion and cabbage, and cytotoxic on onion. The results can contribute to the comprehension of interaction mechanisms with the environment and the right and adequate fate to RHA.

Keywords: agroindustrial waste, environmental impact, environmental management, waste management, bioenergy.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Fluxograma do processo de beneficiamento e os aspectos ambientais gerados.....	22
Figura 2 - Depósito de CA na faixa de domínio da BR 153 próximo Km 497, Cachoeira do Sul-RS e na BR 392 contorno Pelotas-RS, setembro de 2016.....	23
Figura 3 - Sequência de etapas compreendidas pela ecotoxicologia e denominada cadeia da causalidade, (COSTA, 2008), adaptada pelo autor.....	30
Figura 4 - Amostras das cinzas de casca de arroz.....	45
Figura 5 - Treinamento de integração desenvolvido pelas empresas.....	45
Figura 6 - Sementes de alface, cebola e repolho espécies usadas como bioindicadores.....	46
Figura 7 - Material em repouso para obtenção da solução teste e operação de filtragem para lograr a solução teste.....	48
Figura 8 - Preparação das placas de petri e disposição das placas de petri na BOD.....	49
Figura 9 - Operação de medição do comprimento das raízes e do cálculo e registro do IG (%)......	49
Figura 10 - Operação de lavagem das Raízes de <i>Allium cepa</i> L. em água destilada e hidrolise em solução de HCl a 5 N.....	51
Figura 11 - Equipamento de microscopia, com câmera, usado no exame citológico e Fotomicrografica de células meristemáticas de raiz de <i>Allium cepa</i> L.....	51
Figura 12 - Observações em células meristemáticas de raízes de <i>Allium cepa</i> L.....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Qualificação da magnitude dos níveis de fitotoxicidade.....	40
Tabela 2 -	Valores médios das análises dos ETs, U, MO e pH dos três processos de queima estudados (P - I, P - II, P - III) com os valores de (p) e VC (%).	53
Tabela 3 -	Resumo da análise multivariada de Wilks' Lambda entre as variáveis Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Ti, U, MO e pH presentes na composição das CCAs provenientes de três diferentes processos de queima.....	55
Tabela 4 -	Valores das médias dos IGs %, valor de (p) e coeficiente de variação dos bioindicadores sementes de alface – ( <i>Lactuca sativa</i> L), cebola – ( <i>Allium cepa</i> L) e repolho – ( <i>Brassica oleracea</i> , L) submetidas ao tratamento com extrato aquoso das CCA de diferentes processos de incineração, por 144 horas.....	56
Tabela 5 -	Equações lineares referentes a análise de regressão de Stepwise (p < 15%) entre as variáveis Al, Cu, Fe, Mg, Mn, MO, Na, Ni, Ti, U, MO e pH e as variáveis respostas IGa, IGc e IGr.....	57
Tabela 6 -	Resumo com os valores significativos das correlações de Pearson (p < 0,5%) das variáveis Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Ti, U, MO, pH e dos IGs, das sementes dos bioindicadores alface, cebola e repolho submetidos ao tratamento das CCA de diferentes processos de incineração.....	58
Tabela 7 -	Estimativa dos efeitos diretos e indiretos das variáveis (Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Ti, U, MO, pH) avaliadas na composição das CCA de três diferentes processos de incineração sobre a variável principal IGa, alface.....	61
Tabela 8 -	Estimativa dos efeitos diretos e indiretos das variáveis (Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Ti, U, MO, pH) avaliadas na composição das CCA de três diferentes processos de queima sobre a variável principal IGa, cebola.....	62

## Continuidade

Tabela 9 -	Estimativa dos efeitos diretos e indiretos das variáveis (Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Ti, U, MO, pH) avaliadas na composição das CCA de três diferentes processos de queima sobre a variável principal IGa, repolho.....	63
Tabela 10 -	Valores das médias do IM (%), observado em células meristemáticas de sementes de cebola ( <i>Allium cepa</i> L) tratadas, com extrato aquoso de CCA proveniente de três diferentes processos de queima da CA, comparado os tratamentos pelo teste de Dunnett (5% de erro).....	67
Tabela 11 -	Resumo dos dados da regressão, através dos procedimentos propostos por de Stepwise ( $p < 15$ ) entre as variáveis Al, Cu, Fe, Mg, Mn, MO, Na, Ni, Ti, U, MO e pH e a variável resposta IM.....	68
Tabela 12 -	Resumo dos valores da matriz de correlação de Pearson ( $p < 0,5$ ) entre as variáveis independentes Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Ti, U, MO e pH e a variável resposta IM das células meristemáticas de sementes de <i>Allium cepa</i> L. submetidas ao tratamento de extrato aquoso da CCAs provenientes de três diferentes processos de queima da CA.....	69
Tabela 13 -	Estimativa dos efeitos diretos e indiretos das variáveis (Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Ti, U, MO, pH) avaliadas na composição das CCA de três diferentes processos de incineração sobre a variável principal IM do bioindicador <i>Allium cepa</i> L.....	70
Tabela 14 -	Valores médios, em porcentagem, da frequência de AC nas diferentes fases da divisão celular, em células meristemáticas de sementes de cebola - ( <i>Allium cepa</i> L.) submetidas à germinação num período de 144 horas, em meio aquoso das CCA procedentes de diferentes processos de queima, coeficiente de variação - CV e valor de p.....	72

**LISTA DE SÍMBOLOS**

ANEEL	Agência Nacional de Energia Elétrica
ABNT	Associação Brasileira Normas Técnicas.
Al	Alumínio
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Óxido de alumínio
BOD	Câmara incubadora
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CONSEMA	Conselho Estadual de Meio Ambiente
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCA	Cinza da casca de arroz
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
CaO	Óxido de cálcio
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DEZG	Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética
DM	Departamento de Morfologia
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DAS	Secretaria de Defesa Agropecuária
ET	Elementos traços
EUA	Estados Unidos da América
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Óxido de ferro
FAO	Food and Agriculture of the United Nations
HCl	Ácido clorídrico

IBICT	Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações
ICSU	Committe of the International Council of Scientific Unions
IRGA	Instituto Rio Grandense do Arroz
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IN	Instrução Normativa
K <sub>2</sub> O	Óxido de potássio
kJ.kg	Quilojoule por quilograma
kW	Quilovatio
Kg	Quilograma
Kg/m <sup>3</sup>	Quilograma por metro cúbico
LD	limite de detecção
MMA	Ministério de Meio Ambiente,
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas
MgO	Óxido de magnésio ou Magnetita
MnO	Óxido de manganês
mg kg <sup>-1</sup>	Micrograma por quilograma
MO%,	Porcentagem de matéria orgânica
NBR	Norma Brasileira
NEPERS	Núcleo de Educação, Pesquisa e Extensão em Resíduos e Sustentabilidade
Na <sub>2</sub> O	Óxido de sódio

ONU	Organização das Nações Unidas
OECD	Organização de Cooperação Econômica e Desenvolvimento
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Pentóxido de fósforo
ppm	Partes por milhão
pH	Representação da escala de uma solução indicando que é ácida quando pH<7 e básica se pH>
RS	Rio Grande do Sul
SO <sub>3</sub>	Trióxido de enxofre ou óxido sulfúrico
SiO <sub>2</sub>	Óxido de silício ou sílica
TiO <sub>2</sub>	Dióxido de titânio
ton.	Tonelada
ZnO	Óxido de zinco

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	17
1.2	Hipótese.....	19
1.3	Objetivos geral.....	19
1.3.1	Objetivos específicos.....	19
3	Revisão bibliográfica.....	20
3.1	Perspectivas para a indústria de alimentos e o setor de beneficiamento de arroz.....	20
3.2	Arroz.....	21
3.3	Casca de arroz.....	23
3.3.1	Cinza de Casca de Arroz.....	24
3.4	Toxicidade.....	26
3.4.1	Toxicologia.....	27
3.4.2	Ecotoxicologia.....	29
3.4.2.1	Testes de ecotoxicidade e bioindicadores.....	31
4	Materiais e métodos.....	43
4.1	Procedimentos metodológicos.....	43
4.2	Área de abrangência dos estudos e local do desenvolvimento dos trabalhos.....	43
4.3	Materiais.....	44
4.3.1	Coleta das amostras de cinza de casca de arroz.....	44
4.3.2	Materiais de laboratório.....	45
4.4	Análise dos elementos traços, umidade, matéria orgânica e pH da CCA.....	46
4.4.1	Delineamento experimental das análises dos elementos traços, umidade, matéria orgânica e pH da CCA.....	47
4.5	Teste de fitotoxicidade.....	47
4.5.1	Preparo dos bioensaios.....	47
4.5.2	Delineamento experimental da avaliação da fitotoxicidade e cálculo do IG.....	49

4.6	Teste de citotoxicidade e genotoxicidade.....	49
4.6.1	Obtenção o tecido meristemático .....	50
4.6.2	Exame de microscopia do tecido meristemático.....	50
4.6.3	Delineamento experimental e cálculo das variáveis IM e AC bioindicador <i>Allium cepa</i> L.....	51
4.7	Análise estatística.....	52
5.	Resultados e discussão.....	53
5.1	Avaliação dos resultados dos Elementos Traços, U, MO e pH.....	53
5.2	Avaliação da fitotoxicidade da CCA .....	55
5.3	Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade.....	66
5.3.1	Avaliação da citotoxicidade .....	66
5.3.2	Avaliação da genotoxicidade.....	72
6.	Conclusões .....	74
6.1	Da hipótese.....	74
6.2	Dos objetivos específicos.....	74
6.2.1	Caracterização dos elementos traços e os teores de U, MO e pH.....	74
6.2.2	Avaliação da ação fitotóxica da CCA usando como parâmetro o índice de germinação de sementes (% IG) e como bioindicadores <i>Lactuca sativa</i> L (alface), <i>Allium cepa</i> (cebola) e <i>Brassica oleracea</i> (repolho).....	74
6.2.3	Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade.....	75
6.2.4.	Gerar informações que possam contribuir para definição de alternativas estratégicas de uso sustentável da CCA e no aumento da competitividade da indústria arroseira.....	76
7.	Sugestões futuras.....	76
8.	Bibliografia.....	77
9.	Apêndices.....	90

## 1 Introdução

O arroz (*Oryza sativa*, L.) é um dos principais componentes da dieta alimentar da população mundial e do Brasil, por conseguinte, ocupa o terceiro lugar entre os cereais mais cultivados com uma produção mundial anual de aproximadamente 746.9 milhões de ton. (FAO, 2016). Deste montante, o Brasil, maior produtor, fora do continente asiático, participa com 12,3 milhões de ton (CONAB, 2017) e o Rio Grande do Sul - RS, maior produtor do Brasil com 8,7 milhões de ton (IRGA, 2017). Na Zona Sul do RS, área de estudo do presente projeto a produção anual estimada é de 1,5 milhão ton (IRGA, 2017).

No processo de beneficiamento do arroz são gerados resíduos e subprodutos entre os quais cabe destacar a casca de arroz - CA por corresponder a  $\pm 23\%$  do peso do arroz em casca (DELLA et al., 2001; FOLETTTO et al., 2005; GONÇALVES e BERGMANN, 2007; SOLTANI et al., 2015).

O uso da CA como fonte de energia renovável tem sido a prática mais adotada e alvo de estudos, haja vista, os trabalhos desenvolvidos por Bazargan et al. (2015); Chen et al. (2015); Gomes et al. (2013); Jiang et al. (2003); Lim et al. (2012, 2013, 2014); Loha et al. (2013); Pode (2016); Prasara-A e Gheewala (2016); Rigon (2015); Raymundo (2016); Shafie (2016); Soltani et al. (2015); Thakkar (2016).

O produto da transformação termoquímica da CA é a cinza da casca de arroz - CCA. Material heterogêneo em função da sua composição química variável, constituída basicamente de óxidos de metais alcalinos  $Al_2O_3$ ,  $K_2O$ ,  $Na_2O$ ,  $MgO$ ,  $CaO$ ,  $Fe_2O_3$ ,  $MnO$ ,  $P_2O_5$ ,  $TiO_2$ ,  $ZnO$ , tendo a  $SiO_2$  (sílica) seu principal componente, numa proporção de 85 a 98%, e baixa densidade  $\pm 137$   $Kg/m^3$  representa  $\pm 20\%$  da massa da CA ou  $\pm 4\%$  do peso do grão em casca (ANGEL et al., 2009; DELLA et al., 2001; DELLA, KÜHN e HOTZA 2005; FERNANDES et al., 2016; GONÇALVES e BERGMANN, 2007; NASCIMENTO et al., 2015; POUHEY, 2006 e QUESADA et al., 2017).

Para Lim et al. (2012, 2013, 2014); Prasara - A e Gheewala (2016) e Rigon (2015) o desafio é dar um destino à CCA que seja economicamente, socialmente e ambientalmente sustentável.

Nessa perspectiva, a comunidade científica tem desenvolvido estudos e processos tecnológicos na busca por transformar em novos produtos com alto valor agregado e baixo impacto ambiental que estão relatados nas revisões bibliográficas de Chandrasekhar et al. (2003); Foletto et al. (2005); Foo e Hameed (2009); Moraes et al. (2014); Soltani et al. (2015) e Pode (2016).

Apesar das inúmeras alternativas de uso adequado, na prática se observa que a CCA é depositada nas proximidades das lavouras ou em aterros irregulares permanecendo exposta à ação dos fatores climáticos, responsáveis por promover a dispersão, antes de ser incorporada ao solo. Procedimento esse inadequado, uma vez que o mesmo pode provocar impactos ambientais indesejados aos ecossistemas terrestres e aquáticos, além de, por em risco a saúde humana (BILO et al., 2015; GRYCZAK, 2016; ISLABÃO, 2013 e SANDRINI, 2010).

À vista disso, buscou-se investigar o tema a partir dos referenciais teóricos que versam sobre os aspectos ecotoxicológicos da CCA, tendo em vista a exiguidade de trabalhos que tratam do tema (PRASARA-A e GHEEWALA, 2016) e a relevância ao se pretender o uso sustentável da CCA.

Ademais, a importância do conhecimento dos possíveis efeitos tóxicos da CCA, deve-se aos elementos traços - ETs presentes na sua composição que por não serem biodegradáveis, mas persistentes, e, em concentrações elevadas são tóxicos, podem se distribuir no ambiente e por meio dos ciclos geobioquímicos das plantas e dos animais serem incorporados ao ciclo alimentar (ALVES; REIS e GRATÃO, 2016; MARTINS et al., 2011; KHAN et al., 2015 e SOUZA et al., 2015).

Sob esta óptica, os estudos foram conduzidos tendo como objetivo Investigar os potenciais efeitos ecotoxicológicos da cinza de casca de arroz.

Quanto aos resultados produzidos a expectativa é que devam contribuir na tomada de decisão dos gestores públicos e privados, sobre as alternativas adequadas de manejo e destino final da CCA, numa perspectiva de escala e abrangência local, regional e global, além de, proporcionar uma melhoria da imagem da indústria de alimentos, em especial do setor de beneficiamento de arroz.

## 1.2 Hipótese

A cinza de casca de arroz apresenta características bioativas de ação tóxica que interfere no desenvolvimento dos vegetais.

## 1.3 Objetivo geral

Investigar os potenciais efeitos ecotoxicológicos da cinza de casca de arroz utilizando-se, para tanto, da análise dos constituintes físicos e químicos das cinzas, do índice de germinação – (IG %), como variável resposta dos bioindicadores *Lactuca sativa* L (alface); *Allium cepa* L. (cebola) e *Brassica oleracea* L. (repolho) para qualificar a fitotoxicidade, bem como, o índice mitótico – (IM %) e a frequência de aberrações cromossômicas – (AC %) para aferir a citotoxicidade e a genotoxicidade do bioindicador *Allium cepa* L. (cebola).

### 1.3.1 Objetivos específicos

1.3.1.1 Caracterizar os elementos traços e os teores de umidade, matéria orgânica e pH das amostras de CCA;

1.3.1.2 Avaliar a ação fitotóxica das CCA;

1.3.1.3 Investigar a ação citotóxica e genotóxica da CCA;

1.3.1.4 Gerar informações que possam contribuir para definição de alternativas estratégicas de uso sustentável da CCA e no aumento da competitividade da indústria arroseira.

### 3. Revisão bibliográfica

Os estudos foram desenvolvidos buscando contextualizar os resíduos gerados no processo de beneficiamento do arroz com ênfase na CCA no tocante ao seu potencial ecotoxicológico e seus possíveis impactos negativos sobre os ecossistemas e a saúde humana ao ser lançada no ambiente sem o devido tratamento ou manejo adequado.

Para tanto, realizou-se uma revisão bibliográfica utilizando-se das bases de dados do Portal de Periódicos da CAPES, ScienceDirect, Scielo, Google Scholar, Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações - IBICT e site de órgãos públicos e privados além de livros. As palavras chave utilizadas na busca foram, “cinza de casca de arroz” (*rice husk ash*), “cinza de casca de arroz e ecotoxicologia”, (*rice husk ash and ecotoxicology*), “ecotoxicologia”, (*ecotoxicology*), “casca de arroz”, (*rice husk ash*), “impacto ambiental”, (*environmental impacts*), “fitotoxicidade”, (*phytotoxicity*), “genotoxicidade” (*genotoxicity*) e “teste *Allium cepa* L.”, (*Allium cepa* L. test).

#### 3.1 Perspectivas para a indústria de alimentos e o setor de beneficiamento de arroz

O futuro para a indústria de alimentos é de um cenário de grandes oportunidades, tendo em vista, o crescimento da população mundial dos atuais 7,2 bilhões para 9,5 bilhões, até 2050, e um aumento da urbanização numa projeção de 66% da população, para o mesmo período, (ONU, 2013), além das mudanças nos hábitos alimentares percebidos na diversidade de novos produtos lançados pelos grandes grupos do setor de alimentos (ELIAS, 2013). Em contrapartida, o setor é desafiado a dar respostas a um ambiente em que, o consumidor conectado, na escolha dos alimentos considera questões relacionadas à qualidade de vida e do ambiente.

Esta realidade de mudanças econômicas e sociais, que o Brasil e o mundo vivenciam, para Miritz e Waquil (2012), impõem às indústrias processadoras de commodities, respostas com novos produtos com valor agregado, abertura para novos mercados, associar parâmetros energéticos e ambientais na escolha e uso de recursos naturais, desenvolver novas relações

com as instituições públicas e privadas, incrementar estratégias para atuar num ambiente mais competitivo e sob-regime mais restritivo no que diz respeito às questões ambientais a exemplo da obrigatoriedade de dar um destino adequado aos resíduos a fim de evitar impactos ambientais negativos.

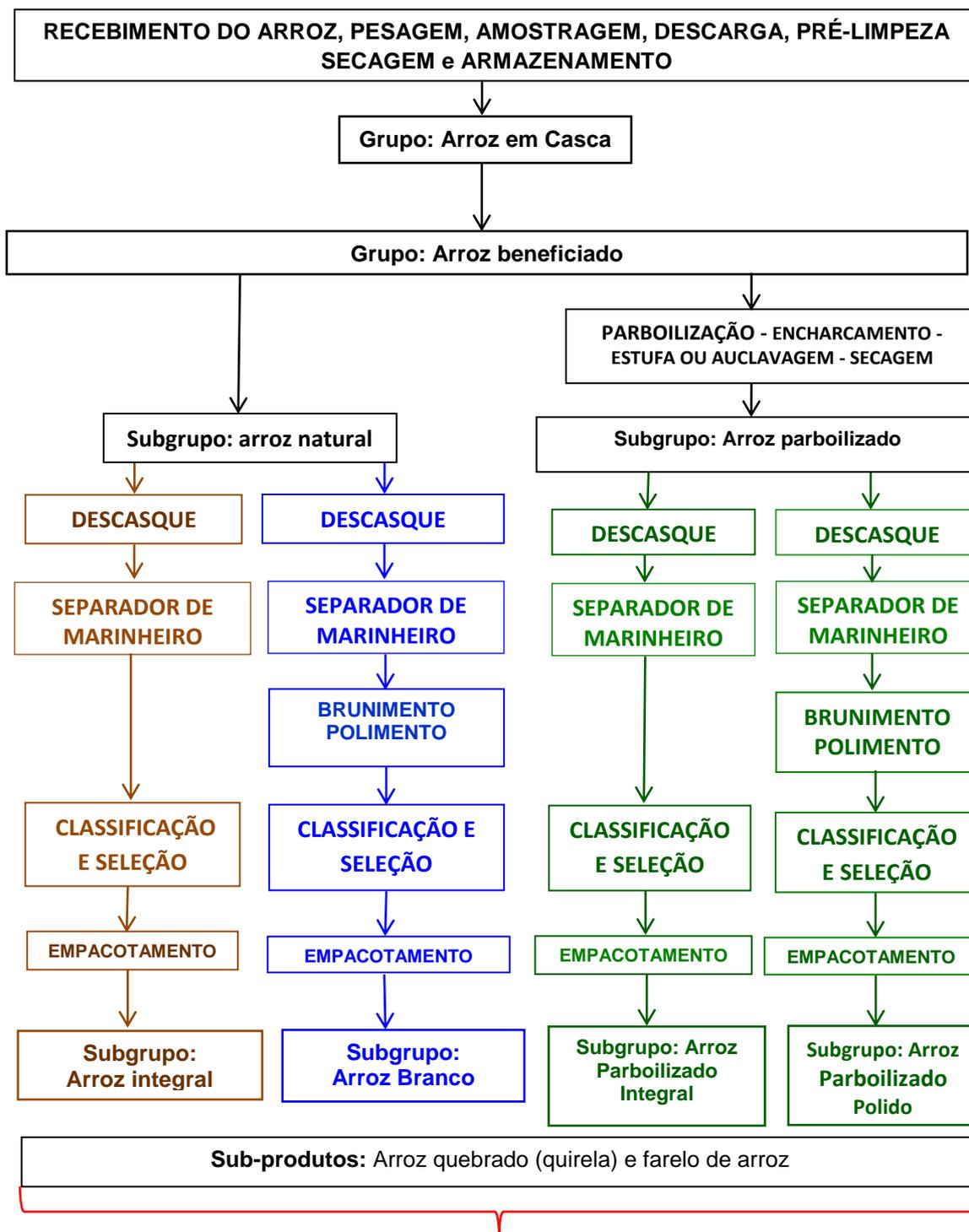
Neste contexto, está inserida a indústria orizícola, responsável por beneficiar o arroz, terceiro cereal mais produzido no mundo (FAO, 2016) e o segundo no Brasil (CONAB, 2017).

### **3.2 Arroz**

O arroz (*Oryza sativa* L.) para ser consumido deve ser beneficiado, o que consiste basicamente na separação dos diferentes componentes do grão. O processo tecnológico adotado é definido em função do produto desejado. Assim sendo, dependendo do produto, a planta industrial de beneficiamento apresenta um fluxograma e layout simples ou diversificado. Segundo Miritz e Waquil (2012) ao estudarem 10 empresas dentre as 20 maiores beneficiadoras de arroz do Rio Grande do Sul, identificaram, que seis apresentam 100% de sua receita anual proveniente do arroz, duas apresentam 90% e, as outras duas, 70%. Ou seja, a maioria das empresas enquadra-se como negócio único o arroz, o que significa uma baixa diversificação de produtos, a exemplo das empresas do presente estudo.

Neste cenário, fica evidente que a maioria das empresas têm como foco, no beneficiamento, as dimensões do grão, principal quesito considerado pelo consumidor brasileiro e normatizado pela Instrução Normativa n.º 6/09 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2009).

O processo de beneficiamento, de forma simplificada, está descrito no fluxograma da figura 1 e segue a classificação dos produtos proposta pela Instrução Normativa nº 6/09 do MAPA. Para tanto, estão previstas uma sequência de etapas que visam segregar o arroz oriundo da lavoura, em arroz do grupo em casca e beneficiado e seus subgrupos arroz natural e parboilizado, que vão originar os produtos arroz integral, arroz branco, arroz parboilizado integral e arroz parboilizado polido.



**Principais aspectos ambientais gerados no processo de beneficiamento:**

Resíduos de varredura, impurezas contidas no arroz, pó, ruído, calor, embalagens danificadas ou fora das especificações, sucata, efluente do processo de parboilização, lodo da ETE, emissões aéreas (gases e particulados), casca de arroz e cinza de casca de arroz.

**Figura 1** - Fluxograma do processo de beneficiamento, subprodutos e os aspectos ambientais gerados.

Fonte: Imagem do autor, (2017).

Entre os aspectos ambientais gerados nas diferentes etapas do beneficiamento cabe destacar a CA e a CCA pela quantidade produzida e pelo seu potencial de impacto negativo sobre o ecossistema aquático e terrestres e a saúde humana quando lançado ao meio sem tratamento ou de forma inadequada a exemplo dos depósitos evidenciados ao longo das estradas no RS no ano de 2016/2017 (Fig. 2 A e B).



**Figura 2** - Imagens do depósito de CA na faixa de domínio da BR 153, próximo ao Km 497, no Rio Grande do Sul, abril de 2016, (A) e do depósito de CCA, a céu aberto, nas proximidades da BR 392 entre o entroncamento da rede férrea e o Arroio Santa Barbara, setembro de 2017, Pelotas – RS, (B).

Fonte: Imagem do autor (2017)

### 3.3 Casca de arroz

A CA, material ligno-celulósico, composto por aproximadamente 50% de celulose e hemicelulose, 30% de lignina além de 20% de elementos inorgânicos com alto teor em sílica (85% a 98% de  $\text{SiO}_2$ ) e por corresponder a  $\pm 23\%$  do peso do grão em casca (DELLA et al., 2001; FOLETTO et al., 2005; GONÇALVES e BERGMANN, 2007; SOLTANI et al., 2015) é o principal resíduo gerado pelo processo de beneficiamento. Estima-se que no mundo, com base na produção de arroz de 2017, sejam geradas aproximadamente 149.3 milhões de ton de CA sendo que o Brasil contribui com 2.4 milhões de ton e o Rio Grande do Sul - RS, maior produtor do Brasil, com 1.74 milhões ton a Zona Sul do RS, com o montante de 0,358 milhões ton por beneficiar aproximadamente 20% (IRGA, 2017) do arroz produzido no RS.

Entre as principais propriedades da CA restritivas ao uso cabe destacar a dureza, fibrosidade, abrasividade, a lenta biodegradabilidade, (cinco anos ou

mais), baixo poder nutricional e indigestibilidade que a torna imprópria ao consumo humano e animal. Já o poder calorífico, aproximadamente 16.720 kJ/kg e a quantidade de sílica são as propriedades promissoras a serem distinguidas e as credencia a ser um subproduto para uso energético e matéria prima para produtos a base de sílica (DELLA; KÜHN e HOTZ, 2005 e FERNANDES et al., 2016). A densidade de aproximadamente 130 Kg/m<sup>3</sup>, é outro fator que deve ser considerado uma vez que dificulta o manejo, onera o transporte e facilita a sua dispersão no ambiente.

Seu uso como fonte de energia renovável tem sido alvo de estudos responsáveis por encorajar o aumentado do seu uso nestes últimos anos, haja vista, os trabalhos desenvolvidos por Bazargan et al. (2015), Chen et al. (2015), Gomes et al. (2013), Jiang et al. (2003), Lim et al. (2012, 2013, 2014), Loha et al. (2013), Pode (2016), Prasara-A e Gheewala (2016), Rigon (2015), Raymundo (2016), Shafie (2016), Soltani et al. (2015) e Thakkar (2016).

No Brasil, segundo a Agência Nacional de Energia Elétrica – ANNEEL, dado de setembro de 2016, doze (12) usinas do tipo biomassa, operavam utilizando apenas com matéria prima a CA, gerando uma capacidade estimada de 45.33 kW, sendo que oito (8) estão localizadas no RS e conseqüentemente produzindo cinza de casca de arroz – CCA (ANEEL, 2016).

### **3.2.1 Cinza de Casca de Arroz**

A CCA é um material heterogêneo de baixa densidade  $\pm 137$  Kg/m<sup>3</sup>, composição química variável, constituída basicamente de óxidos de metais alcalinos Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>O, MgO, CaO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, MnO, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO, SrO tendo a SiO<sub>2</sub> (sílica) seu principal componente, numa proporção de 85 a 98%. (DELLA et al., 2001; DELLA; KÜHN e HOTZ, 2005; GONÇALVES e BERGMANN, 2007; ANGEL et al., 2009; POUHEY, 2006; NASCIMENTO et al., 2015; FERNANDES et al., 2016; QUESADA et al., 2017) que representa  $\pm 20\%$  da massa da CA ou  $\pm 4\%$  do peso do grão em casca (DELLA et al., 2001; SOLTANI et al., 2015; FERNANDES et al., 2016).

Tendo como referência a produção de arroz de 2016/2017 é possível estimar que o potencial anual de geração de CCA no mundo é de aproximadamente 29.89 milhões de ton sendo que, deste montante o Brasil

participa com 0,49 milhões de ton o RS com 0,348 milhões ton e a Zona Sul do RS com 0,069 milhões de ton. O desafio é dar um destino à CCA que seja economicamente, socialmente e ambientalmente sustentável (LIM et al. (2012, 2013, 2014); PRASARA - A e GHEEWALA, 2016 e RIGON, 2015).

Neste contexto, cabe destacar que a comunidade científica tem desenvolvido estudos e processos tecnológicos na busca por transformar a CCA em novos produtos com alto valor agregado e baixo impacto ambiental que estão relatados nas revisões bibliográficas de Chandrasekhar et al. (2003); Foletto et al. (2005); Foo e Hameed (2009); Moraes et al. (2104); Soltani et al. (2015) e Pode (2016).

Apesar das inúmeras alternativas de uso adequado, na prática se observa que a CCA é depositada nas proximidades das lavouras ou em aterros irregulares permanecendo exposta a ação dos fatores climáticos, responsáveis por promover a dispersão, antes de ser incorporada ao solo. Procedimento esse inadequado, uma vez que o mesmo pode provocar impactos ambientais indesejados aos ecossistemas terrestres e aquáticos, além de, por em risco a saúde humana (SANDRINI, 2010; ISLABÃO, 2014; BILO et al., 2015 e GRYCZAK, 2016).

Nesse cenário, caber considerar que apesar, dos componentes minerais, presentes na composição da CCA, serem fundamentais nos processos geobioquímicos por serem micronutrientes ou oligoelementos e estarem presentes em pequenas quantidades, atenção deve ser dada ao se tratar de aplicações sucessivas, tendo em vista, o possível acúmulo de elementos traço - ETs nos diferentes compartimentos do meio ambiente.

HUGEN (2010), na sua tese, descreve que os ETs ou também chamados de metais pesados, micronutrientes e oligoelementos constituem um grupo heterogêneo de elementos químicos que englobam metais, metalóides e não metais como o alumínio (Al); arsênio (As); boro (B); cádmio (Cd); cloro (Cl); cobalto (Co); cobre (Cu); cromo (Cr); chumbo (Pb); ferro (Fe); mercúrio (Hg); molibdênio (Mo); manganês (Mn); magnésio (Mg); níquel (Ni), sódio (Na); prata (Ag); selênio (Se); titânio (Ti); urânio (U); vanádio (V); e o zinco (Zn).

São encontrados na natureza (solo, ar, água, vegetais, animais, microrganismos e tecidos) de forma ínfima, representados por  $\text{mg kg}^{-1}$  (micrograma por quilo) ou ppm (partes por milhão) que são imprescindíveis

para que o equilíbrio orgânico se mantenha tanto na célula viva animal como na dos vegetais e pelo papel que exercem no metabolismo e reações enzimáticas dos seres vivos (HERNÁNDEZ, 2015).

Sua origem natural está diretamente relacionada à composição mineralógica da rocha de origem e pelos processos pedogenéticos ao longo do tempo e antrópica devido ao uso excessivo de agroquímicos e descarte de resíduos industriais e urbanos responsáveis por poluir os solos, ar e mananciais de águas quando presentes em quantidades acima dos padrões recomendados (BUSCHLE, 2013; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; OLIVEIRA, 2013).

Ainda que, os ETs sejam essenciais aos seres vivos, em condições específicas e concentrações acima dos limites de tolerância são tóxicos e bioativos por se bioacumularem ao longo da cadeia alimentar. Por essa razão, é um aspecto que deve ser considerado com especial atenção, haja vista, a possibilidade de causar desequilíbrios ecológicos, aumento dos níveis de ETs nos alimentos e, assim, por em risco os seres humanos e animais através do seu consumo (ALVES; REIS e GRATÃO, 2016).

Na avaliação dos riscos de contaminação da produção de alimentos de origem vegetal e animal é importante que se quantifique os teores e o potencial toxicológico dos ETs presentes nos ambientes e disponíveis às plantas e aos animais (LIMA, 2015).

À vista disso, buscou-se investigar o tema a partir dos referenciais teóricos que versam sobre os aspectos ecotoxicológicos da CCA, tendo em vista a exiguidade de trabalhos que tratam do tema (PRASARA-A e GHEEWALA, 2016) e a relevância ao se pretender o uso sustentável da CCA.

### **3.4. Toxicidade**

Por ser um tema complexo, na literatura encontramos várias definições sobre toxicidade, optamos em considerar as definições propostas pela norma ABNT NBR 10004:2004, Resolução do CONSEMA-RS Nº 129/2006 e Arenzon, Pereira Neto e Gerber (2011).

A ABNT NBR 10004, norma internacional adotada pelo Brasil, que trata da classificação dos resíduos sólidos define toxicidade como sendo a “propriedade potencial que o agente tóxico possui de provocar, em maior ou menor grau, um efeito adverso em consequência de sua interação com o organismo”.

Segundo a mesma norma, o agente tóxico é

qualquer substância ou mistura cuja inalação, ingestão ou absorção cutânea tenha sido cientificamente comprovada como tendo efeito adverso (tóxico, carcinogênico, mutagênico, teratogênico ou ecotoxicológico) (ABNT NBR 10004, 2004, p. 2).

A Resolução do CONSEMA-RS de Nº 129, (2006, p. 20) que dispõe sobre critérios e padrões de emissões para toxicidade de efluentes líquidos, item XXI, define toxicidade, como sendo, “propriedade potencial que uma amostra possui de provocar efeito adverso em consequência de sua interação com o organismo teste”.

Arenzon, Pereira Neto e Gerber (2011, p. 5) referem-se à toxicidade, como sendo,

a capacidade de determinada substância, produto ou conjunto de substâncias de provocar efeitos danosos aos organismos com os quais entra em contato. Estes efeitos podem ser desde alterações comportamentais, alteração de crescimento ou reprodução até a morte dos organismos.

Com base nas definições, apercebe-se que na toxicidade o objeto de investigação é o organismo por sofrer os efeitos causados pelos agentes tóxicos, cuja ação depende dos mecanismos de interação, do tempo de exposição e da concentração.

A compreensão dos mecanismos de toxicidade, que iniciam com a exposição e evoluem a partir de uma série de eventos que promovem uma variedade de interações entre o agente tóxico e o organismo, possibilita interpretar a ação tóxica (GREGUS, 2012, p. 22). Para tanto, vamos nos valer dos fundamentos da toxicologia para podemos compreender os diferentes mecanismos e processos de interação que se estabelecem entre os organismos e os agentes tóxicos e seus efeitos adversos nos ecossistemas.

### **3.4.1 Toxicologia**

Segundo Eaton e Gilbert (2012, p. 6), “toxicologia é o estudo dos efeitos adversos das substâncias químicas sobre organismos vivos”. Já, Oga e Siqueira (2014, p. 5) conceituam toxicologia como sendo a “ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias química com o organismo, sob condições específicas de exposição”.

Costa et al. (2008) enfatizam que a toxicologia, enquanto instrumento de análise, está vinculada a processos físicos, químicos e biológicos os quais exigem, para sua compreensão, o conhecimento de diferentes áreas e uma abordagem feita na perspectiva da multidisciplinariedade.

GALLO (2012, p.1), na mesma linha de pensamento de Costa et al. (2008), ressalta que,

a toxicologia moderna vai além dos estudos dos efeitos adversos dos agentes exógenos, por incorporar conhecimentos e técnicas de bioquímica molecular, biologia, química, genética, matemática, medicina, farmacologia, fisiologia e física, uma vez que, subsidia a avaliação da segurança e de risco dos agentes tóxicos.

O autor complementa apontando que “em todos os ramos da toxicologia, cientistas exploram os mecanismos pelos quais as substâncias químicas produzem efeitos adversos nos sistemas biológicos”.

Oga e Siqueira (2014, p. 5), a partir da visão de carácter multidisciplinar e os diferentes campos de atuação, propõem a divisão da toxicologia em Toxicologia Analítica ou Química, Toxicologia Clínica ou Médica e Toxicologia Experimental. Os mesmos autores caracterizam a toxicologia experimental como sendo a área que

desenvolve estudos, através de espécies bioindicadoras, com objetivo de elucidar os mecanismos e efeitos provocados pelos agentes tóxicos sobre os diferentes níveis organizacionais dos ecossistemas. Desta forma, a toxicologia experimental, enquanto marco teórico referencial orienta as pesquisas sobre a avaliação dos agentes tóxicos no meio ambiente e dá origem a Toxicologia Ambiental.

Complementando, os autores definem a toxicologia ambiental como sendo “a área da toxicologia em que se estudam os efeitos nocivos causados pela interação de agentes químicos contaminantes do ambiente, água, ar, solo, com os organismos humanos”.

Deste modo, permite-se considerar que a toxicologia ambiental trata de compreender a influência dos agentes tóxicos sobre o meio ambiente físico, químico e biótico, bem como, a saúde e o bem estar do homem.

Sendo assim, para Costa et al. (2008) e Eaton e Gilbert (2012) surge à necessidade de se conhecer os efeitos antropogênicos, sobre o ambiente biótico. Para tanto, a ecotoxicologia emerge como uma área especializada da toxicologia ambiental.

### 3.4.2 Ecotoxicologia

A ecotoxicologia, segundo Dörr et al. (2014, p. 136) tem por objetivos compreender, caracterizar e estimar os efeitos deletérios de substâncias químicas de origem antrópica no meio ambiente, bem como avaliar as medidas necessárias para prever, conter ou tratar os danos causados.

Consoante, Giulio e Newman (2012, p. 392) definem e caracterizam o objetivo da ecotoxicologia, como sendo:

o estudo de contaminantes na biosfera e seus efeitos sobre os componentes dos ecossistemas e tem como objetivo geral explicar e prever o efeito da exposição ou de sua ocorrência nos vários níveis de organização biológica.

Castro (2013) em sua dissertação relata que,

o termo Ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez durante uma reunião do Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU), realizada em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut no ano de 1969 ao definir a ecotoxicologia como sendo a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto interligado (PLAA, 1982, p.13 apud CASTRO, 2013).

Fundamentado no exposto, depreende-se que a ecotoxicologia é uma área especializada da toxicologia ambiental e centra seus estudos nos efeitos ocasionados pelos agentes tóxicos sobre os organismos vivos, dinâmica das populações e comunidades integrantes de um ecossistema (COSTA et al., 2008; COSTA, 2010; GUARATINI et al., 2008; EATON e GILBERT, 2012; DÖRR et al., 2014).

Para tanto, Guaratini et al. (2008, p. 125) ressalta que nos estudos de ecotoxicidade além da análise da ação dos agentes tóxicos sobre os organismos devem-se considerar as influências dos fatores ecológicos.

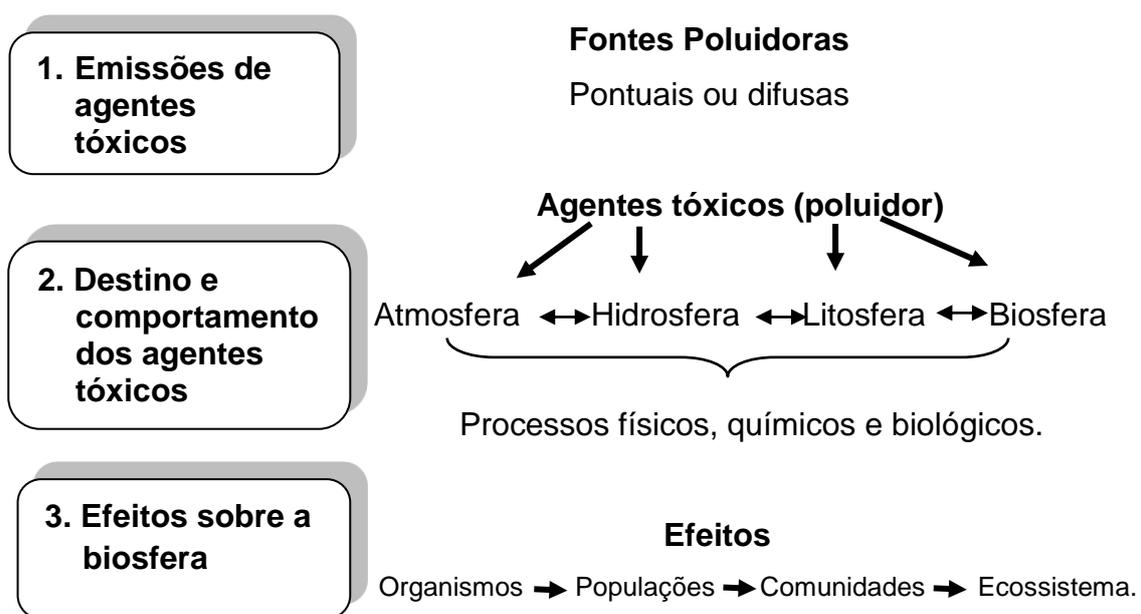
Isso posto, nos valem das definições de Marcondes (1992, p 62) ao propor que os fatores ecológicos são:

os elementos do meio, que agem diretamente sobre os seres vivos, pelo menos, em uma das fases do ciclo de vida e são distinguidos por fatores bióticos e abióticos.

Os fatores bióticos são características biológicas relacionadas às espécies de organismos vivos envolvidos, em função de atributos relacionados à idade, fase de desenvolvimento, estado nutricional, predação, parasitismos, competição e doenças.

Os fatores abióticos correspondem às características relacionadas à energia e aos componentes físicos ou climáticos e químicos.

De acordo com Costa et al. (2008), na prática a ecotoxicológica avalia o risco e a probabilidade de ocorrer uma ação antrópica sobre o ambiente e envolve a descrição qualiquantitativa da provável ocorrência de uma ação toxicológica específica, associada à elucidação das causas e efeitos a exemplo da perda de biodiversidade, redução dos recursos biológicos naturais e alterações da qualidade dos ecossistemas. A sequência de etapas compreendidas pela ecotoxicologia Costa et al. (2008) denominam de cadeia de causalidade conforme esquema da (Fig. 3).



**Figura 3** - Imagens da sequência de etapas compreendidas pela ecotoxicologia e denominada por Costa (2008) de cadeia da causalidade adaptada pelo autor.

Fonte: Costa et al. (2008, p.1821) adaptado pelo autor (2017).

Suas limitações devem-se à complexidade do tema, o que torna difícil identificar todos os componentes e processos ecológicos envolvidos num problema ambiental causado por uma ação antrópica.

### 3.4.2.1 Testes de ecotoxicidade e bioindicadores

No Brasil, a exemplo do que ocorre no mundo, o aumento da conscientização, de que os agentes tóxicos, podem por em risco a integridade dos ecossistemas e a vida em todas as suas formas, tem induzido os órgãos de controle ambiental a intensificarem as exigências de aplicação de testes de ecotoxicidade, a exemplo, das Resoluções do CONAMA Nº 357/2005 alterada pelas Resoluções CONAMA Nº 410 e Nº 430/2011, que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes a nível federal, bem como a Resolução CONSEMA - RS Nº 129/20 que dispõe sobre a definição de critérios e padrões de emissões para toxicidade de efluentes líquidos lançados em águas superficiais no RS. Neste sentido, cabe destacar que em 1975 a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB foi a pioneira em desenvolver procedimentos metodológicos na área de ecotoxicologia.

Cabe ainda destacar que a Organização de Cooperação Econômica e Desenvolvimento - OECD elaborou um guia de orientação para teste de análise de produtos químicos com plantas terrestres no qual estão listadas no anexo 2, as espécies vegetais recomendadas para ensaios de avaliação de produtos químicos (OECD/OCDE 208, 2006, p. 13).

Nessa perspectiva, a comunidade científica tem desenvolvido protocolos padronizados de testes de ecotoxicidade com objetivo de determinar padrões de emissões, qualidade do ambiente e instrumentos regulatórios. Cabe destacar, que através da padronização se torna possível comparar os métodos, protocolos e dados de diferentes estudos além de contribuir para comparar a performance dos laboratórios que executam os bioensaios (SILVA, 2014).

O Brasil tem buscado a padronização dos testes de ecotoxicidade, através da aplicação de um conjunto de Resoluções e Instruções Normativas em nível Federal pelo Ministério de Meio Ambiente, IBAMA e CONAMA e pelos correspondentes órgãos, de gestão ambiental, responsáveis por atuarem nos Estados e nos Municípios.

Soma-se ainda, as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, a exemplo, da ABNT NBR 10.004-2004, que versa sobre a

Classificação dos resíduos sólidos; ABNT NBR 15350:2012, refere-se ao teste Ecotoxicologia aquática, Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea; ABNT NBR 15537:2014, Ecotoxicologia terrestre - Toxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas (Lumbricidae); ABNT NBR 15.499:2016, Ecotoxicologia aquática, Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes; ABNT NBR 12.713:2016, Ecotoxicologia aquática, Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera), e; a Resolução CONAMA Nº 430/2011 que complementa e altera a Resolução Nº 357/2005 que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, no item XIII define os testes de ecotoxicidade como sendo “os métodos utilizados para detectar e avaliar a capacidade de um agente tóxico provocar efeito nocivo, utilizando bioindicadores dos grandes grupos de uma cadeia ecológica” (CONAMA, 430/11, p. 2).

Considerando-se o exposto, depreende-se que as normas citadas se aplicam para avaliação da ecotoxicidade aquática havendo uma lacuna normativa na avaliação dos componentes terrestres e o uso de plantas com bioindicadores. Não obstante, Grant (1994) relata que as plantas superiores por serem organismos pluricelulares e eucariontes, apresentam estrutura celular e cromossômica semelhantes as das células dos animais, além de, possibilitarem ensaios *in situ* e *in locu*, são consideradas excelentes organismos testes ou bioindicadores para testes de fitogenotoxicidade.

Ao versar sobre os testes de ecotoxicidade Costa et al. (2008) salientam que os mesmos não substituem as análises químicas tradicionais uma vez que:

as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas e os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos. E, complementa chamando atenção, da importância do uso de testes de avaliação de risco ecotoxicológico, uma vez que eles complementam as informações, uma vez que, os dados das análises químicas e físicas não são suficientes para avaliar os possíveis efeitos de um agente tóxico sobre os organismos e os ecossistemas (COSTA et al., 2008, p. 1820).

Na buscando de subsídios para o uso de teste ecotoxicidade, Bettiol et al. (2016) avaliarão que os bioensaios podem ser utilizados individualmente ou como componentes de uma bateria de teste e são recomendados para avaliar

os efeitos tóxicos de substâncias desconhecidas, misturas de produtos químicos e amostras de composição complexa, como efluentes industriais, matrizes ambientais contaminadas e resíduos, foco do presente projeto de estudos.

Sobre o tema, HACON (2004, p. 265) ao tratar da avaliação de risco de contaminação ambiental salienta, das dificuldades de se avaliar todos os constituintes de um sistema ambiental poluído, haja vista, a grande variedade de organismos exposto e a complexa mistura de contaminantes. Sendo assim, o autor reconhece que os bioindicadores por serem reconhecidos como medidas que incluem todos os níveis de organização ecológica, ou seja, desde um organismo até as populações de um ecossistema são bons instrumentos para serem utilizados na avaliação dos riscos ecotoxicológicos de agentes contaminantes.

Por sua vez, Giulio e Newman (2012, p. 396) enfatizam que uma grande variedade de espécies de plantas e animais representativos de diferentes níveis de organização do sistema biológico são utilizadas como bioindicadores para avaliar a toxicidade de xenobióticos.

Analisando-se a literatura constata-se, de fato, que há um consenso no meio científico, em considerar que as plantas superiores apresentam características que as credenciam a serem modelos em bioensaios e no uso como bioindicadores em monitoramento e avaliação da qualidade ambiental a exemplo dos trabalhos de Athanásio, Prá e Rieger (2014), Bagatini, Silva e Tedesco (2007), Barbério, Voltolini e Mello (2011), Bernardes et al. 2015, Bianchi (2008), Cordova (2013), Caritá (2010), Caritá e Marin-Morales (2008), Gerber (2017), Goujon et al. (2014), Hoshina (2005), Iqbal (2016), Leme e Marin-Morales (2009), Lopes (2014), Mendes et al. (2016).

Entre as características destacadas pelos os autores estão à confiabilidade das respostas, similaridade e boa correlação com outros testes, possibilidade de avaliar as reações dos organismos vivos ao agente tóxico, a sensibilidade aos efeitos sinérgicos em misturas complexas, simplicidade dos testes, curta duração e baixo custo, além de, viabilizar o uso de mais de um parâmetro para mensurar as respostas biológicas e as ações tóxicas.

Assim, para Bettiol et al. (2016) e Costa et al. (2008) preliminarmente, qualquer espécie vegetal pode ser usada nos testes de ecotoxicidade, todavia,

os autores salientam que, na escolha do bioindicador, é importante considerar o conhecimento disponível sobre as características fisiológicas, genéticas e comportamentais, seletividade constante aos agentes tóxicos, disponibilidade, abundância, uniformidade, estabilidade genética das populações, representatividade de seu nível trófico, significado ambiental em relação à área de estudo, ampla distribuição, importância comercial, facilidade de cultivo e de adaptação às condições de laboratório.

Com base nos fundamentos expostos e considerando o contexto deste trabalho de investigação, nos utilizaremos de espécies de plantas superiores como bioindicadores, por se moldar a hipótese formulada de que **“a CCA apresenta características bioativas de ação tóxica que interfere no desenvolvimento dos vegetais”**.

A relevância de aprofundarmos os estudos deve-se ao procedimento prático de descarte da CCA de forma inadequada no ambiente. E, seu conhecimento, contribuirá na definição de estratégias de uso sustentável e aumento da competitividade da indústria arroseira.

Ademais, optamos por utilizar nos bioensaios, plantas superiores das espécies *Lactuca sativa* L, (alface), vc, marca, ISLA<sup>®</sup>, Lote 30724-S2, *Allium cepa* L. (cebola), vc, marca, ISLA<sup>®</sup>, Lote 36550-S2 e *Brassica oleracea* L, (repolho), vc, marca, ISLA<sup>®</sup>, Lote: 32491-S2 como bioindicadores, por estarem contempladas no guia de recomendação da OECD/OCDE - 208 (2006) e por ser um procedimento metodológico bastante difundido, haja vista, o número significativo de trabalhos de investigação desenvolvidos a exemplo de:

Zucconi et al. (1981) ao pesquisar a toxicidade dos compostos orgânicos nos diferentes estágios do processo de compostagem usou como bioindicador *Lepidium sativum*, L. (agrião de jardim) e o IG (%) como parâmetro de avaliação da fitotoxicidade. As respostas revelaram que o IG% é capaz de detectar efeitos de ação de baixa toxicidade que afeta o crescimento das raízes como a alta toxicidade que reduz a germinação das sementes.

Fiskesjö (1988) ao aplicar o teste *Allium cepa* L. nos estudos ambientais de toxicidade de íons metálicos confirmou o teste *Allium cepa* L. como sendo uma ferramenta útil no rastreamento de produtos químicos.

Leme e Marin-Morales (2009) desenvolveram estudos de avaliação do impacto do vazamento de óleo de um oleoduto sobre a qualidade da água do

rio Guaecá, São Sebastião, SP, BR usando *Allium cepa* L. como bioindicador. Os dados revelaram a existência de uma correlação de causa e efeito entre a análise química da água e os efeitos genotóxicos e mutagênicos observados nas células meristemáticas das raízes de *Allium cepa* L. expostas à água contaminada.

Saidelles et al. (2009) ao avaliou os parâmetros biométricos e índices de qualidade das mudas de timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*) e grapiá (*Apuleia leiocarpa*) em substrato com CCA observaram um comportamento diferente para *Apuleia leiocarpa* que teve o crescimento diminuído com aumento da CCA.

Belo (2011) ao avaliar a fitotoxicidade do processo de compostagem com vários materiais orgânicos utilizou como parâmetro o IG (%) e o bioindicador *Lepidium sativum* L. (agrião de jardim). Os achados confirmaram a eficiência do teste a exemplo de outros trabalhos publicados.

Cuchiara, Borges e Bobrowski (2012) ao avaliarem o comportamento da alface (*Lactuca sativa* L.) e da cebola (*Allium cepa* L.) com bioindicadores para testar qualidade das águas superficiais, evidenciaram que a alface apresentou maior sensibilidade aos efeitos citotóxicos causados pela água coletadas no Arroio Doutor, Capão do Leão-RS.

Masood e Malik (2013) ao realizarem estudos de avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade de águas industriais com teste *Allium cepa* L. verificaram que as águas apresentam ação de efeito genotóxico e mutagênico.

Mesi e Kopluku (2013) desenvolveram estudos de avaliação citotóxica e genotóxica dos pesticidas diclofop-methyl (herbicida) e Lindane (inseticida) através do teste *Allium cepa* L. Os dados dos estudos demonstraram que os pesticidas analisados apresentam potencialidade de induzir efeitos citogenotóxico em culturas e na biota e riscos à saúde humana.

Ozakca e Silah (2013) estudaram o efeito genotóxico das diferentes concentrações e exposição de flusilazol (inseticida) sobre as células meristemáticas de *Allium cepa* L. Os resultados revelaram inibição do IM com o aumento da concentração de flusilazol de 30 para 45 ppm.

Luna et al. (2013) ao avaliar a fitotoxicidade de biosurfactantes produzidos por microorganismo a partir de resíduos de biomassa de refinaria de óleo de noz e licor de milho tendo por bioindicadores a *Solanum gilo* (jiló),

*Lactuca sativa* L. (alface) e *Brassica oleracea* L. (couve) observaram a inexistências de ação tóxica.

Jiang et al. (2014) ao investigar os efeitos genotóxicos do chumbo (Pb) nas células meristemáticas de *Allium cepa* L. verificou que o IM reduziu progressivamente com o aumento da concentração de Pb nas células meristemáticas da raiz indicando como sendo o local principal de ação citotóxica.

Pakrashi et al. (2014) pesquisaram a ação genotóxica das nanopartículas de dióxido de titânio (NPs - TiO<sub>2</sub>), usando o teste *Allium cepa* L. O exame dos dados de aumento das AC (%) e redução do IM (%) associado com ensaio de teste cometa preconizou que os efeitos citogenéticos e genotóxicos dependem da dose e absorção, bem como, que a exposição as (NPs - TiO<sub>2</sub>) é capaz de induzir genotoxicidade nos sistemas vegetais mesmo em baixas concentrações de 12,5µg/mL.

Pandey, Kumar e Roy (2014) ao investigaram, o efeito genotóxico sobre as células meristemáticas de *Allium cepa* L dos conservantes de alimentos hidroxianisole butílico (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propilo (PG), ácido sórbico, 2,4-hexadienóico, (SA) e nitrato de sódio (SN) frequentemente utilizados em alimentos, verificarm uma redução do IM (%) e um aumento das AC (%) indicando, com isso, que os mesmos apresentam potencial genotóxico.

Bilo et al. (2015) ao estudar a absorção dos metais traços - MTs na cultura do arroz, cultivado em solos contaminados, evidenciaram uma concentração significativa de MTs na casca do arroz.

Mazzeo et al. (2015) nos estudos de avaliação da toxicidade de lodo de esgoto, não tratado, evidenciaram características bioativas com potencial genotóxica e mutagênica e ratificaram o teste *Allium cepa* L. como sendo um bom bioindicador para a avaliação do potencial tóxico de misturas complexas.

Özkara et al. (2015) realizaram estudos de avaliação da ação citotóxica do herbicida Anilofos usando como bioindicador *Allium cepa* L. e os resultados indicaram uma redução dos valores médios do comprimento das raízes, bem como, uma redução do IM (%), em comparação com ensaio controle, sugerindo que o herbicida apresenta ação citotóxica sobre as plantas.

Pathiratne, Hemachandra e Silva (2015) avaliaram a qualidade da água do rio receptor dos efluentes de quatro atividades industriais (duas indústrias têxteis, três indústrias de borracha, duas usinas de tratamento comum de zonas industriais e duas estações de tratamento de água) através do teste *Allium cepa* L. Os resultados apresentaram evidências científicas sólidas que os efluentes apresentavam potencial citotoxicidade e genotoxicidade.

Bettioli et al. (2016) ao investigar a toxicidade do herbicida fenólico (Pestanal®) com bioindicadores *Lepidium sativum* L. (agrião de jardim), *Lactuca sativa* L. (alface), *Cucumis sativus* L. (pepino) e o teste *Vibrio fischeri*, Microtox® baseado na inibição de bactérias luminescentes. Os resultados sugerem que a ação tóxica do herbicida examinado, embora com potencial diferenciado, envolve processos metabólicos com características comuns entre bioindicadores usados, sementes e bactérias. Depreende-se do fato que a ação do xenobiótico pode atingir organismos alvos e não alvos e que os ensaios de fitotoxicidade são eficientes e relevantes na avaliação da ecotoxicológica de defensivos agrícolas.

Mendes et al. (2016) ao estudarem a fitotoxicidade das camas usadas na criação de 5 lotes de frango, utilizando-se dos parâmetros físicos-químicos das camas e do índice de germinação - IG dos bioindicadores alface (*Lactuca sativa* L.) e pepino (*Cucumis sativus* L.) apuraram que todas as amostras de camas apresentavam na sua composição elementos com características fitotóxicas.

Palmieri et al. (2016) pesquisaram o potencial genotóxico do Spent Pot Liner (SPL), resíduo sólido da indústria do alumínio que contém como principais componentes químicos (fluoreto, cianeto e alumínio) utilizando como bioindicador *Allium cepa* L. e o Ensaio de Cometa em leucócitos humanos. Os resultados sugeriram que o resíduo apresenta componentes genotóxicos, uma vez que houve redução do parâmetro IM (%) e aumento da frequência de aberrações cromossômicas (AC) tanto das células vegetais como animais.

Salles (2016) avaliou a ação citotóxica e genotóxica das águas superficiais de São Paulo - SP utilizando-se de *Allium cepa* L. como bioindicador. Os dados dos parâmetros IM e AC sugeriram que os eventos vinculados à sazonalidade e à falta de tratamento de esgoto causam influência

sobre a qualidade da água uma vez que no período chuvoso houve um aumento dos efeitos tóxicos sobre o bioindicador *Allium cepa* L.

Gerber et al. (2017) ao investigarem a fitotoxicidade dos efluentes brutos e tratados da indústria de parboilização do arroz e de abatedor de suínos recorreram de bioensaios com três organismos testes, de níveis tróficos diferentes, peixes, zebrafish (*Danio rerio*), sementes de vegetais, alface (*Lactuca sativa*) e pepino (*Cucumis sativus*) e a bactéria (*Escherichia coli*). Os parâmetros físicos-químicos dos efluentes apreciados foram DBO - demanda bioquímica de oxigênio, DQO - demanda química de oxigênio, Sólidos Suspensos Totais, NTK - Nitrogênio Total Kjeldhal, Nitrogênio Amoniacal, Fósforo Total, Cloretos, Surfactantes, Sulfetos, Dureza, Alumínio, Manganês, Ferro, Zinco, Fenóis, Condutividade Elétrica, Salinidade, pH e temperatura. Os resultados apontaram que o efluente bruto e tratado apresenta elementos na composição com ação fitotóxica ao bioindicadores alface e pepino.

A vantagem do uso de sementes, de fornecedores comerciais, como organismos de teste nos bioensaios, deve-se pela homogeneidade genética e fisiológica que apresentam e disponibilidade durante o ano todo (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Além disso, são submetidas à avaliação de germinação, pureza, sanidade, viabilidade e vigor, pelo fornecedor, o que garante um bom desempenho e confiabilidade do ensaio.

Com base no exposto, percebe-se que os testes de ecotoxicidade são desenvolvidos para avaliar misturas complexas detectar diferentes tipos de agentes tóxicos e seus efeitos, sendo os mais aplicados, o de fitotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade (LEME e MARIN-MORALES, 2009) a exemplo do presente projeto.

Nos testes de fitotoxicidade são avaliadas as perturbações relacionadas aos efeitos toxicológicos, causados por agentes tóxicos, presentes ou produzidos no meio, que interferem diretamente sobre o comportamento, estrutura, desenvolvimento e sobrevivência dos vegetais. Os principais parâmetros biológicos utilizados são aptos a mensurar o percentual de sementes germinadas; crescimento da parte aérea; comprimento das raízes; índice de velocidade de germinação; avaliação da biomassa da parte aérea e das raízes (RAMOS, 2016; TIQUIA; TAM; HODGKISS, (1996) e TIQUIA, 2010).

Entre os testes de fitotoxicidade, cabe destacar, o Índice de Germinação - IG (%) que combina os dados de germinação com os do comprimento das raízes das sementes tratadas com o extrato solução teste, em relação a um tratamento controle (testemunha) por ser usado com frequência pelos pesquisadores (BELO, 2011). O mesmo autor relata que, no meio científico, não há uma unanimidade no tocante à qualificação da magnitude dos níveis de fitotoxicidade com base no Índice de Germinação IG, (Tabela 1), entretanto, ao analisar as diferentes propostas, constatou que a maioria considera o valor do IG superior a 80% como não fitotóxico.

Aprofundar a compreensão sobre o potencial toxicológico e das possíveis alterações prejudiciais e herdáveis no material genético, provocadas por um agente tóxico sobre os organismos expostos são fundamentais para avaliar o risco de dano ambiental. Nesta perspectiva são aplicados os testes de citotoxicidade e genotoxicidade.

Os testes de citotoxicidade e genotoxicidade são usados, para investigar as possíveis anormalidades e os danos causados na célula e no material genético, herdáveis ou não, pelos agentes citotóxicos e genotóxicos ao bioindicador (CARITÁ e MARIN-MORAIS, 2008).

O índice mitótico - IM (%) é o parâmetro básico usado para aferir a citotoxicidade e está relacionado à avaliação da aceleração, inibição ou parada do processo de divisão celular.

Na avaliação da genotoxicidade é apurado o potencial de promover alterações nocivas ao material genético de um agente tóxico e que necessariamente não são fixadas uma vez que podem ser recompostas pelo sistema de reparo celular. Para Leme e Marin-Morales (2009) as alterações cromossômicas se caracterizam por alterações no número total de cromossomas ou de qualquer estrutura cromossômica que pode ser espontânea ou provocada por efeitos de agentes físicos ou químicos.

O parâmetro usado na avaliação da genotoxicidade é a frequência de aberrações cromossômicas - AC (%) que afere a ocorrência de aberrações cromossômicas de efeitos aneugênicos e clastogênicos (FISKESJÖ, 1985 e 1988; CARITÁ, 2010; HOLAN (2014) e LEME e MARIN-MORALES, 2009).

**Tabela 1 - Qualificação da magnitude dos níveis de fitotoxicidade.**

Referência bibliográfica	IG (%)	Classificação
Trautmann e Krasny, 2009	80-100	Não inibe o crescimento da planta
	60-80	Inibição moderada
	40-60	Inibição forte
	<40	Inibição severa
Batista e Batista, 2007 (cit. Woods End, 2000)	>85	V- não tóxico
	70-80	IV- moderadamente tóxico
	50-70	III- tóxico
	30-50	II- muito tóxico
	<30	I- extremamente tóxico
Batista e Batista, 2007 (cit. Brinton et al., 2001)	>90	Bastante maturado
	80-90	Maturado
	<80	Imaturo
Bernal <i>et al.</i> , 2009 (cit. Zucconi <i>et al.</i> , 1981)	>50	Maturado
Wong <i>et al.</i> , 2001 (cit. Zucconi <i>et al.</i> , 1981)	>50	Composto livre de fitotoxinas
Ortega <i>et al.</i> , 1996 (cit. Zucconi <i>et al.</i> , 1985)	<60	Produto orgânico considerado fitotóxico
Cabañas-Vargas <i>et al.</i> , 2005 (cit. Zucconi e de Bertoldi, 1987)	>60	Maturado
Gómez-Brandón <i>et al.</i> , 2008 (cit. Zucconi e de Bertoldi, 1987)	>60	Limite que reduz a fitotoxicidade para níveis aceitáveis para aplicação segura no solo
Helfrich <i>et al.</i> , 1998	≥70	Baixo nível de fitotoxinas
Fang e Wong, 1999 (cit Rifaldi <i>et al.</i> , 1986)	>80	Não fitotóxico
He <i>et al.</i> , 2009 (cit Zucconi <i>et al.</i> , 1981)	>80	Composto livre de fitotoxinas
Tiquia <i>et al.</i> , 2010 (cit Zucconi <i>et al.</i> , 1981; Tiquia e Tam, 1998)	>80	Composto livre de fitotoxinas
Gao <i>et al.</i> , 2010 (cit Zucconi <i>et al.</i> , 1981; Tiquia e Tam, 1998)	>80	Composto livre de fitotoxinas; maturado
Delgado <i>et al.</i> , 2010	>100	Estimula as propriedades do solo

Fonte: Belo, (2011, p. 16).

As alterações genotóxicas de efeitos aneugênicos são constituídas por perdas cromossômicas, cromossomas retardatários, C-matáfase, mau funcionamento do fuso e ganho ou perda de cromossomos intactos. Já as alterações genotóxicas de efeitos clastogênicos estão representadas por

alterações na estrutura cromossômica, formação de micronúcleos, perda ou rearranjo de porções de cromossômicos, pontes e quebras cromossômicas.

Quando as alterações genotóxicas de efeitos clastogênicos não são devidamente reparadas pelo sistema celular, podem levar a mutações herdáveis cujos efeitos podem ser desde a inviabilidade celular até o desenvolvimento de processos carcinogênicos.

Os micronúcleos, segundo Hoshina (2005); Caritá e Marin Morales (2008), Caritá (2010), Ciğerci et al. (2015) e Iqbal (2016) podem ser resultantes tanto de efeitos aneugênicos quanto clastogênicos.

Segundo, Santelli e Siviero (2014, p. 71).

a distribuição exata do material genético às células-filhas durante a divisão mitótica envolve muitos eventos coordenados que vão desde a replicação do DNA propriamente dita até a segregação cromossômica. O sucesso do processo de divisão celular, em todas as suas fases, depende da manutenção da normalidade da célula e o perfeito equilíbrio genético.

Os agentes tóxicos, ao interagirem de forma negativa, com os diferentes componentes do ambiente podem causar dois tipos de efeitos nos organismos. O efeito tóxico agudo de curto prazo ou o crônico de longo prazo. Segundo a Resolução do CONAMA Nº 357/2005, alterada pelas Resoluções Nº 410/2009 e 430/2011, item XVII e XVIII define efeito tóxico agudo e crônico como sendo:

XVII - efeito tóxico agudo: efeito deletério aos organismos vivos causado por agentes físicos ou químicos, usualmente letalidade ou alguma outra manifestação que a antecede, em um curto período de exposição;

XVIII - efeito tóxico crônico: efeito deletério aos organismos vivos causado por agentes físicos ou químicos que afetam uma ou várias funções biológicas dos organismos, tais como a reprodução, o crescimento e o comportamento, em um período de exposição que pode abranger a totalidade de seu ciclo de vida ou parte dele (CONAMA, 357/05, p. 2).

A ABNT NBR 10.004 - 2004, (p. 2) por sua vez, define a toxicidade aguda como sendo:

Propriedade potencial que o agente tóxico possui de provocar um efeito adverso grave, ou mesmo morte, em consequência de sua interação com o organismo, após exposição a uma única dose elevada ou a repetidas doses em curto espaço de tempo.

A partir dos enunciados podemos compreender, na prática, que um quadro de toxicidade aguda, a associação causa/efeito, em geral é mais fácil

de ser detectada por ser de curta duração e pelos sintomas apresentados pelos organismos. Nos vegetais, a toxidade pode se manifestar em deformações no sistema radicular, redução do desenvolvimento da planta, perda de produtividade e morte.

A toxicidade crônica, caracterizada por uma exposição de baixa concentração ou dose dos agentes tóxicos, é mais difícil de ser avaliada, uma vez que a associação causa/efeito só é detectada, em longo prazo. A toxicidade aguda deve ser analisada com maior atenção tendo em vista que dependendo do tipo de ação, os agentes tóxicos ou dos seus metabólitos, são transferidos por meio da cadeia trófica e dos processos de bioacumulação e ou biomagnificação podendo interferir na reprodução, na sobrevivência dos organismos e o no próprio homem através dos alimentos.

O que se depreende é que os testes de ecotoxicidade são procedimentos metodológicos complexos e sua validação depende de um modelo conceitual em que os bioensaios sejam capazes de associar a interação dos contaminantes e a avaliação ecológica dos efeitos da exposição ao agente tóxico.

## **4. Materiais e métodos**

### **4.1 Procedimentos metodológicos**

Os procedimentos metodológicos adotados no desenvolvimento das investigações foram os recomendados para uma pesquisa científica em que os estudos são de caráter interdisciplinar, razão pela qual os critérios metodológicos utilizados nas investigações foram: quanto à natureza da pesquisa é básica por utilizar de conhecimentos teóricos para estudos empíricos; sobre a realidade estudada; no tocante à finalidade, a pesquisa é aplicada pelo interesse prático que os resultados sejam utilizados na solução dos problemas (GERHARDT e SILVEIRA, 2009 e MAGALHÃES, 2010).

Além disso, trata-se de pesquisa descritiva uma vez que, se pretende observar e descrever as características dos subprodutos e resíduos da indústria arroseira e exploratória ao se ambicionar aprofundar as investigações, esclarecer os conceitos e buscar resposta à hipótese formulada (GIL, 2017).

Complementam os critérios metodológicos a abordagem sobre os procedimentos neste contexto, a pesquisa é hipotética-dedutiva uma vez que se inicia pela percepção de uma lacuna nos conhecimentos acerca da qual formula-se a hipótese e, pelo processo de inferência dedutivo, testa a predição da ocorrência de fenômenos abrangidos pela hipótese (LAKATOS e MARCONI, 2007); bibliográfica, tendo em vista que se vale da bibliografia que trata do tema; e, experimental, uma vez que se usam protocolos reconhecidos cientificamente para se obter dados de análises quantitativas e qualitativas para elucidar os fatos; e, quanto ao local de realização, a pesquisa é de campo e laboratorial, visto que foram desenvolvidas atividades em ambos os locais (MAGALHÃES, 2010).

### **4.2 Área de abrangência dos estudos e local do desenvolvimento dos trabalhos.**

A área de abrangência dos estudos compreende os municípios de Capão do Leão, Pelotas e Rio Grande do Estado do Rio Grande do Sul - RS, Brasil - BR, localidades onde as indústrias de beneficiamento de arroz estão instaladas. Os

trabalhos foram desenvolvidos na Universidade Federal de Pelotas junto aos laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Ciências e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia Eliceu Maciel - FAEM; Núcleo de Educação, Pesquisa e Extensão em Resíduos e Sustentabilidade – NEPERS do Centro de Engenharia; Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética - DEZG e Departamento de Morfologia – DM do Instituto de Biologia, Laboratório de Metrologia Química - LABmequi do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos – CCQFA e as três empresas fornecedoras da CCA. Para preservar a privacidade e o anonimato das empresas elas serão identificadas como processo I, II e III.

### **4.3 Materiais**

#### **4.3.1 Coleta das amostras de cinza de casca de arroz**

As cinzas de casca de arroz - CCA, da safra de 2014/2015 foram obtidas de três processos de queima operacionalizados por empresas, localizadas na Zona Sul do RS, que estão licenciadas pelos órgãos ambientais competentes e desfrutam da casca de arroz para atender às demandas das plantas industriais por calor, vapor e energia. No período das coletas os fornos de grelha deslizantes operavam no processo I - (PI) a uma temperatura entre 800 - 900° C e tempo de queima até 5 min; processo II - (PII) temperatura de queima 800 - 900° C e tempo de queima entre 15 a 20 min; e, no processo III - (PIII) temperatura de 600° C - 700° C e tempo de queima de 15 a 20 min.

As coletas das amostras de CCA, sem tratamento, foram realizadas junto ao silo de armazenamento temporário, durante a operação de carregamento dos caminhões que realizam o transporte para as áreas de incorporação da CCA no solo. O procedimento das coletas foi realizado num período em 5 dias consecutivos, manualmente, em 3 pontos distintos (no início, meio e fim do carregamento do caminhão), com auxílio de um Becker, de polipropileno de 1000 mL, descontaminado, perfazendo 1 kg por amostra e o total de 5 amostras por processo. As amostras identificadas foram

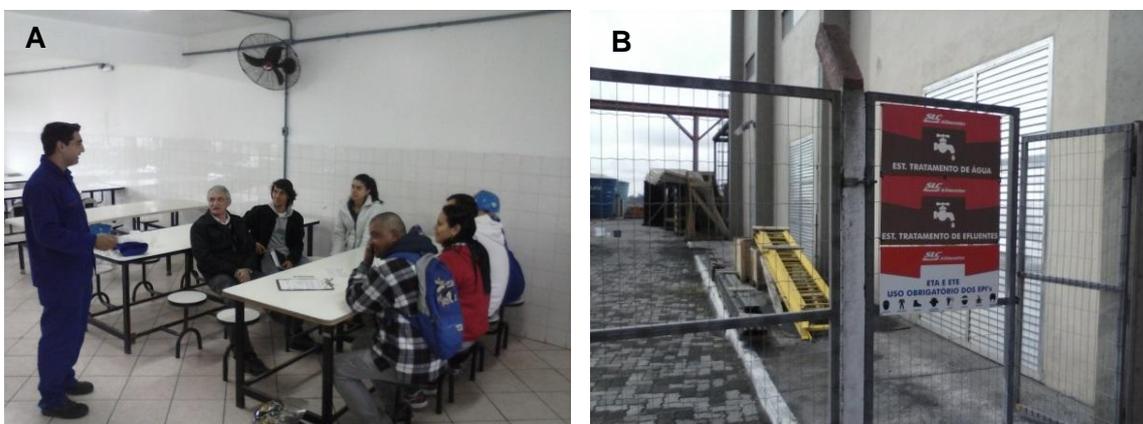
acondicionadas e transportadas em sacos de polipropileno de 5 Kg e estocadas em local protegido no NEPERS/UFPEL.



**Figura 4** - Imagens das cinzas de cascas de arroz, obtidas com câmera CN Scopo, 5 MP e lupa Physis 0,8 X, em que se pode observar diferença nas características granulométricas das cinzas do processo I (A) e III (C) na comparação com as cinzas do processo II (B).

Fonte: Imagem do autor, (2017).

As operações de coletas foram realizadas com equipamentos de proteção individual e de acordo com os protocolos de segurança adotados pelas empresas (Fig. 5, A e B).



**Figura 5** - Imagens do treinamento de integração desenvolvido pelas empresas (A) e das placas de sinalização a serem observadas ao circular pela planta industrial (B).

Fonte: Imagem do autor (2017).

#### 4.3.2 Materiais de laboratório

Todos os reagentes químicos empregados na caracterização da CCA, ensaios de fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenotoxicidade, foram de grau analítico. Na escolha dos reagentes foram levados em

consideração critérios referentes à compatibilidade para a análise de matrizes complexas, qualidade, segurança do analista e os possíveis impactos ambientais. As soluções foram preparadas utilizando água destilada tratada pelo sistema Pilsen. Para bioindicadores foram escolhidas as sementes, sem tratamento, das espécies *Lactuca sativa* L., (alface, vc, regina de verão), marca ISLA®, Lote - 30724-S2, germinação 82%, pureza 99,8%, validade 03/2017); *Allium cepa* L., (cebola, vc, baia periforme), marca ISLA®, Lote - 36550-S2, germinação 92%, pureza 99.9% e validade até 01/2017 e *Brassica oleracea* L. (repolho, vc, chato de quintal), marca ISLA®, Lote - 32491-S2, germinação 91%, pureza 100.0% e validade 04/2016) por serem recomendadas pela Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) para biotestes terrestres (OECD, 208/2006) (Fig. 6, A, B e C).



**Figura 6** - Imagens das sementes dos bioindicadores utilizadas na pesquisa *Lactuca sativa* L. (alface), (A), *Allium cepa* L. (cebola), (B) e *Brassica oleracea* L. (repolho), (C).

Fonte: Imagem do autor, (2015).

#### 4.4 Análise dos elementos traços, umidade, matéria orgânica e pH da CCA

A avaliação dos elementos traços (ETs) presentes nas amostras de CCA oriundas dos 3 (três) processos estudados foi realizada por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES). O método de preparo de amostras utilizado foi de decomposição ácida em tubos de digestão adaptados com sistema de refluxo (ORESTE et al., 2013). O sistema de refluxo, refrigerado com circulação de água, funcionou durante as análises a uma temperatura de 15 °C.

A digestão de 250 mg de amostras se deu com 3,6 mL de HNO<sub>3</sub> e 1,4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, em tubo de digestão com refluxo, bloco digestor operando a uma temperatura de 225 °C e por 3 horas e 25 min (LOPES et al., 2017). A opção pelo uso do método deveu-se por consumir pequenas quantidades de reagentes, ser adequado para matrizes complexas, simples e de baixo impacto ambiental e os resultados foram expressos em mg kg<sup>-1</sup>.

O teor de umidade (U) e matéria orgânica (MO) foi determinado por método gravimétrico (AOAC, 1995) e a pesagem foi realizada em balança analítica ( $\pm 0,0001$ ). O cálculo em porcentagem foi obtido com base na diferença de peso antes e depois da secagem e calcinação.

Todas as análises foram realizadas em triplicata e o valor final considerado foi à média dos três valores registrados.

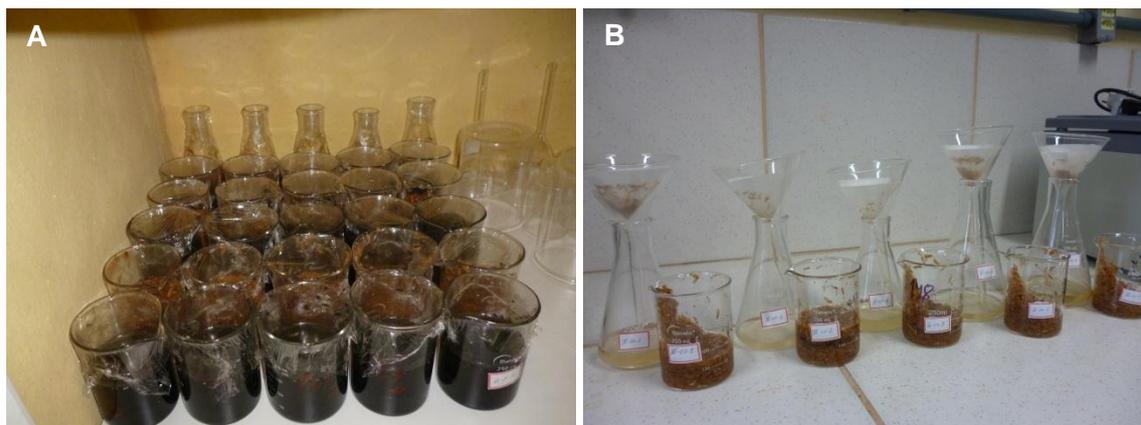
#### **4.4.1 Delineamento experimental das análises dos elementos traços, umidade, matéria orgânica e pH da CCA**

O delineamento experimental das análises dos elementos traços, umidade, matéria orgânica e pH da CCA constituíram-se de 3 tratamentos x 5 amostras x 3 repetições, (N=45 processos/amostras/repetições).

#### **4.5 Teste de fitotoxicidade**

##### **4.5.1 Preparo dos bioensaios**

A fitotoxicidade foi avaliada utilizando-se o IG% como parâmetro quantitativo seguindo o protocolo de Zucconi et al (1981) adaptado, de acordo com a experiência de laboratório, por Mendes et al. (2016) e Gerber et al. (2017). Assim sendo, para cada amostra de CCA, devidamente identificada, foi preparada uma solução do extrato aquoso (SEA) da CCA, a partir da diluição de 10 gramas de CCA (base úmida) em 100 mL de água destilada, em Becker de 250 mL, numa relação v/m de 10:1 e armazenada em repouso em ambiente escuro por 12 horas. Findo o período de repouso o sobrenadante da (extrato aquoso) foi filtrado utilizando-se papel filtro Whatman n°1 (Fig. 7, A e B).



**Figura 7** - Imagens do material em repouso para obtenção solução do extrato aquoso – SEA, (A) e da operação de filtragem do sobrenadante para lograr a SEA (B).

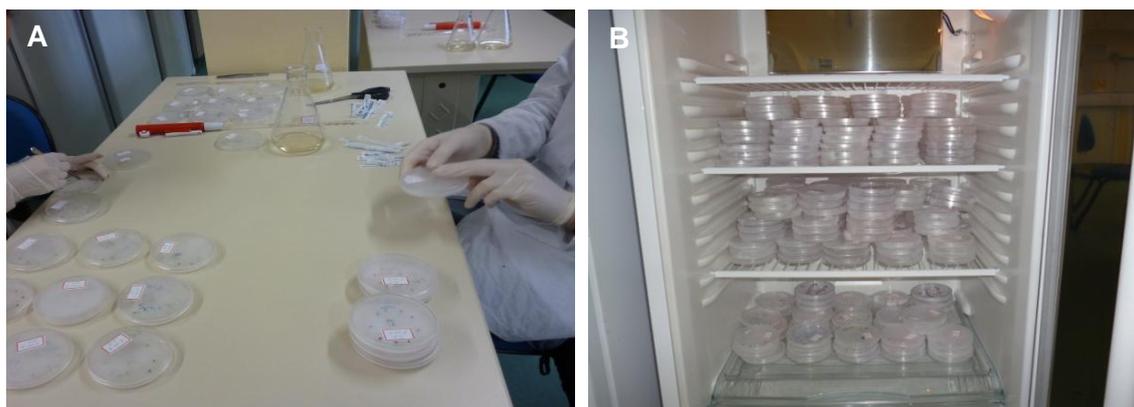
Fonte: Imagem do autor (2017)

Na sequência 10 sementes de cada bioindicador alface, cebola e repolho, em triplicata, foram distribuídas de forma uniforme sobre o papel filtro qualitativo, 14  $\mu\text{m}$  de porosidade, disposto em placas de Petri, com 9 mm de diâmetro e umedecidas com 5 mL da SEA perfazendo um total de 135 placas e 1350 sementes. Para o tratamento controle (TC) 3 placas com 30 sementes de cada bioindicador foram umedecidas com 5 mL de água destilada.

As placas de Petri seladas com parafilm foram submetidas à germinação numa câmara incubadora - BOD, no escuro a uma temperatura de  $25 \pm 0,5$  °C pelo período de 144 horas (BRASIL, 2009, p. 179). A disposição das placas de Petri no interior da BOD foi realizada de forma aleatória por sorteio independente do tratamento e do bioindicador (Fig. 8, A e B).

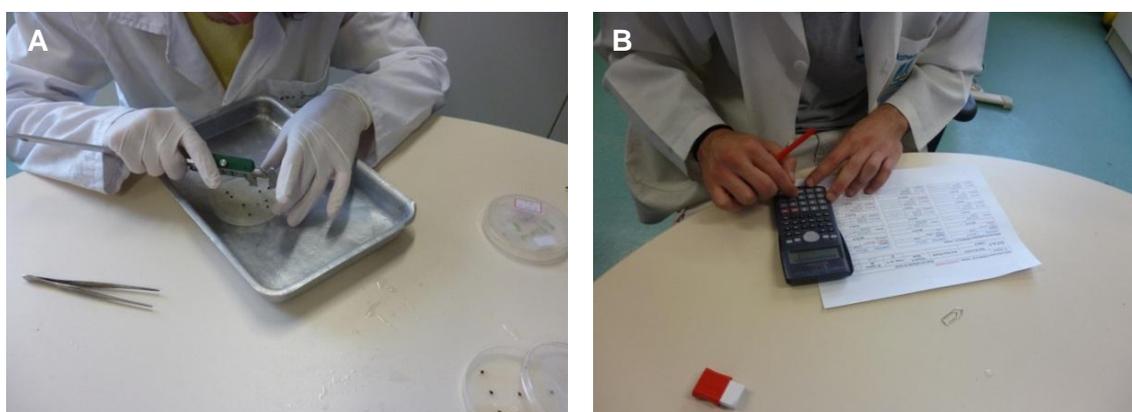
O índice de germinação - (IG%), em porcentagem, foi calculado seguindo a fórmula  $IG (\%) = (Gt/Gc) \times (Sct/SCc) \times 100$  proposta por Tiquia et al (1996) em que  $Gt$  = número de sementes germinadas no tratamento com a SEA;  $Gc$  = número de sementes germinadas no TC;  $Sct$  = comprimento médio das raízes das sementes germinadas no tratamento com a SEA (mm); e,  $SCc$  = comprimento médio das raízes das sementes germinadas no TC (mm) (Fig. 9, A e B).

O valor médio do IG superior a 80% foi considerado como não fitotóxico (BELO, 2011).



**Figura 8** - Imagens das operações de preparação das placas de Petri (A) e da disposição das placas de Petri no interior da BOD (B).

Fonte: Imagem do autor (2017)



**Figura 9** - Imagens das operações de medição do comprimento das raízes (A) e do registro dos dados e cálculo do IG (B).

Fonte: Imagem do autor (2017)

#### 4.5.2 Delineamento experimental da avaliação da fitotoxicidade e cálculo do IG

O delineamento experimental, dos bioensaios do tratamento, com as SEA constituíram-se de 3 tratamentos (processos) x 5 amostras x 3 repetições x 10 sementes x 3 bioindicadores num total de 1.350 sementes. Para os bioensaios do TC o delineamento experimental foi concebido com 1 tratamento x 3 repetições e 10 sementes x 3 bioindicadores num total de 90 sementes. Deste modo o total de sementes utilizadas no projeto foi de 1.440 sementes.

#### 4.6 Teste de citotoxicidade e genotoxicidade

Para avaliação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos da CCA foi empregado o teste *Allium cepa* L. de acordo com os procedimentos metodológicos recomendados por Fiskesjö (1985 e 1988) e adaptações propostas por Caritá (2010), Holan (2014) e Leme e Marin-Morales (2009). Para aferir a citotoxicidade utilizou-se o IM pela contagem de células nas diferentes fases do processo de mitose e a genotoxicidade pela frequência de aberrações cromossômicas - AC observadas nas fases de prófase, metáfase, anáfase e telófase.

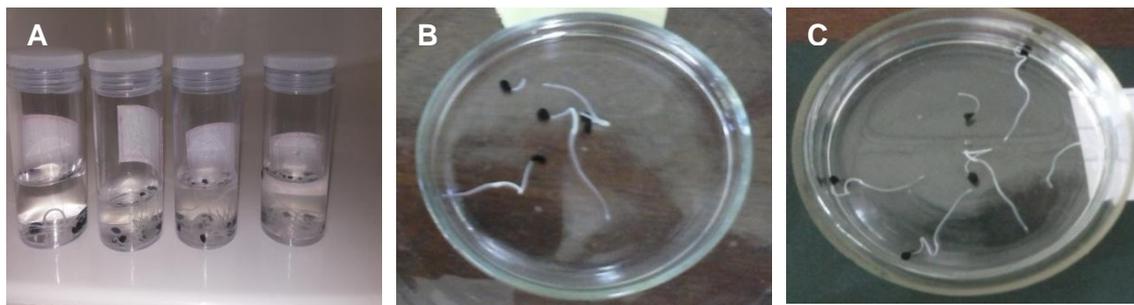
#### **4.6.1 Obtenção o tecido meristemático**

O tecido meristemático foi obtido de raízes, das sementes de cebola (*Allium cepa* L.) tratadas e submetidas ao processo de germinação segundo Zucconi et al. (1981) e adaptações de Mendes et al. (2016) e Gerber et al. (2017). Todas as raízes, das sementes germinadas, foram fixadas com solução de Carnoy, (Etanol e Ácido acético numa proporção de 3:1, v/v), acondicionadas em frascos de polipropileno de 15 mL e armazenadas em freezer a - 4 °C até a realização do exame microscópico do tecido meristemático (GUERRA e SOUZA, 2002, p.17-35), (Fig. 10).

#### **4.6.2 Exame de microscopia do tecido meristemático**

De cada bioensaio foram escolhidas aleatoriamente três raízes com comprimento acima de 1 cm. A lavagem e hidrólise das raízes foram realizadas na seguinte sequência 5 min água destilada, 10 min em solução de HCl a 5 N e 5 min água destilada em temperatura ambiente (Fig. 10, A, B e C).

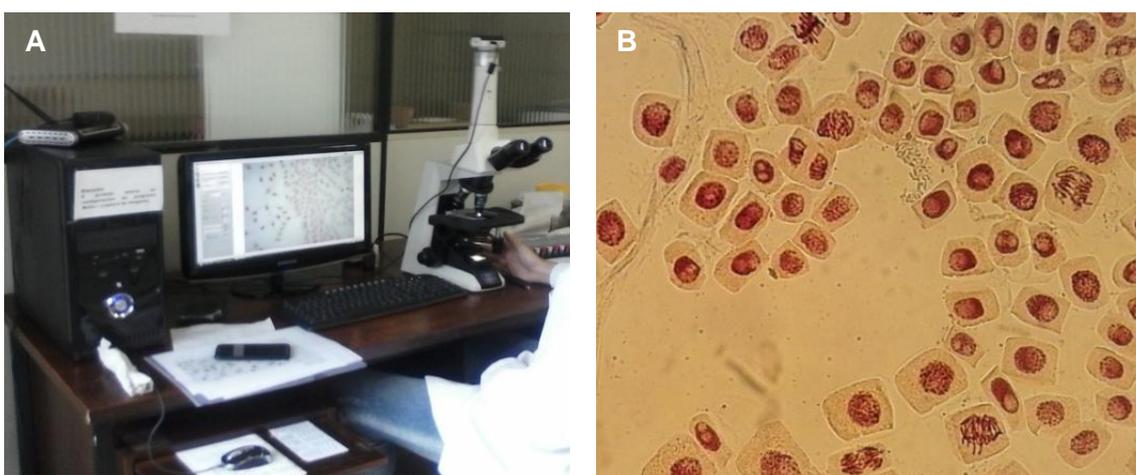
Com o tecido meristemático da ponta de cada raiz, foi confeccionada, uma lâmina citológica seguindo a técnica de Guerra e Souza (2002, p.17-35) utilizando-se Orceína Acética 2% como corante. As lâminas citológicas foram analisadas pela técnica de varredura e 500 células, de cada raiz, foram observadas com auxílio de um microscópio de luz incidente, NYKON ECLIPSE-E 200, equipado com câmera Multican 5 MPs operando com aumento de 400 X. As melhores imagens foram registradas com auxílio do software de captação de imagem Moticmegem Plus 2.0.



**Figura 10** - Imagens com a sequência das etapas operacionais de acondicionamento das raízes de *Allium cepa* L. fixadas em Carnoy, (A), lavagem das raízes com água destilada (B) e hidratação das raízes em solução de HCl a 5 N (C).

Fonte: Imagem do autor (2017).

As diferentes fases da divisão celular interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase e as aberrações cromossômicas foram identificadas e classificadas seguindo os registros fotográficos e critérios utilizados por Caritá (2010), Holan (2014) e Leme e Marin-Morales (2009) (Fig.11, A e B).



**Figura 11** - Imagens do equipamento de microscopia, com câmera, usado no exame citológico (A) e da fotomicrografia de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* exposta ao extrato aquoso de CCA, capturada com objetiva com 400 X e câmera Multican 5 MPs (B).

Fonte: Imagem do autor (2017).

#### 4.6.3 Delineamento experimental e cálculo das variáveis IM e AC bioindicador *Allium cepa* L.

O delineamento experimental constitui-se de 3 tratamentos (processos) x 5 amostras x 3 repetições x 3 raízes (lâminas) x 500 células por raiz num total

de 67.500 células, além de um TC x 5 repetições x 3 raízes (lâminas) x 500 células num total de 7.500 células.

O índice mitótico - IM (%), dado em porcentagem, foi obtido dividindo-se o número de células em divisão nas fases de prófase, metáfase, anáfase e telófase pelo número total de células observadas multiplicando-se por 100. A frequência de aberrações cromossômicas - AC (%) foi calculada pelo número de aberrações identificadas nas fases de prófase, metáfase, anáfase e telófase dividindo-se pelo número de células observadas vezes 100.

#### **4.7 Análise estatística**

Na análise estatística avaliou-se a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ) de probabilidade de erro. Foi realizada a ANOVA e a comparação das médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e Dunnett.

Para avaliarmos a similaridade entre as CCAs, dos diferentes processos, os dados dos componentes químicos e físicos das CCAs foram submetidos à análise de variância multivariada (MANOVA) usando-se o teste Wilks' Lambda ( $p < 0,05\%$ ).

Subsequentemente para identificar os componentes químicos e físicos da CCA que interferiram sobre a fitotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade os dados foram submetidos à técnica multivariável determinando-se o coeficiente de correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ) e análise de regressão, utilizando-se os procedimentos de Stepwise ( $p < 0,15\%$ ), para a seleção do modelo mais ajustado e à análise de Trilha.

No tratamento estatístico foram utilizados os pacotes dos softwares Rbio – RBIO, (BHERING, 2017), SAS<sup>®</sup>, versão 9.0, (2002) e Genes (Cruz, 2015).

## 5. Resultados e discussão

### 5.1 Avaliação dos resultados dos Elementos traços, U, MO e pH

No exame das concentrações e teores dos ETS constituintes da CCA, descritos na (Tabela 2), percebe-se que os valores médios das concentrações das variáveis Al, Fe, Mg, Mn, umidade - (U), matéria orgânica - (MO) e pH diferem ( $p < 0,05\%$ ) entre si na comparação entre os três processos. Já as concentrações das variáveis, Cu e Na do processo II, são superiores ( $p < 0,05$ ) as médias registradas nos processos I e III, que por sua vez, não se distingue ( $p < 0,05$ ) entre os processos I e III.

**Tabela 2 - Valores médios das análises dos ETs, U, MO e pH dos três processos de queima estudados (P - I, P - II, P - III) com os valores de (p) e VC (%)**

Variáveis	Unidade	LD	P - I	P - II	P - III	p	VC (%)
Al	mg kg <sup>-1</sup>	0,39	104,64 <sup>b</sup>	196,34 <sup>a</sup>	73,67 <sup>c</sup>	9,3611e-11	6,9
Cd	mg kg <sup>-1</sup>	6,64	<LD	<LD	<LD	0,39657	0
Cu	mg kg <sup>-1</sup>	0,4	33,48 <sup>b</sup>	87,94 <sup>a</sup>	36,28 <sup>b</sup>	8,92e-12	6,44
Fe	mg kg <sup>-1</sup>	2,05	484,96 <sup>b</sup>	892,36 <sup>a</sup>	330,16 <sup>c</sup>	2,1964e-09	9,01
Mg	mg kg <sup>-1</sup>	0,22	1047,30 <sup>b</sup>	2653,40 <sup>a</sup>	638,62 <sup>c</sup>	1,1221e-17	2,6
Mn	mg kg <sup>-1</sup>	0,31	559,72 <sup>b</sup>	1411,00 <sup>a</sup>	268,12 <sup>c</sup>	3,7725e-09	14,72
Mo	mg kg <sup>-1</sup>	1,29	<LD <sup>b</sup>	171,46 <sup>a</sup>	<LD <sup>b</sup>	5,614e-22	2,62
Na	mg kg <sup>-1</sup>	4,99	350,08 <sup>b</sup>	1610,80 <sup>a</sup>	268,10 <sup>b</sup>	1,1917e-13	7,77
Ni	mg kg <sup>-1</sup>	12,17	350,90 <sup>a</sup>	<LD <sup>b</sup>	<LD <sup>b</sup>	2,7768e-20	3,35
Ti	mg kg <sup>-1</sup>	12,45	563,14 <sup>a</sup>	495,62 <sup>b</sup>	484,48 <sup>b</sup>	4,3648e-05	3,63
U	(%)		1,54 <sup>b</sup>	2,12 <sup>a</sup>	1,08 <sup>c</sup>	1,7715e-05	13,25
MO	(%)		18,39 <sup>a</sup>	7,36 <sup>c</sup>	13,13 <sup>b</sup>	2,7973e-08	10,32
pH			9,09 <sup>a</sup>	3,74 <sup>c</sup>	7,94 <sup>b</sup>	5,7608e-14	2,94

(<sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup>) Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha, diferem significativamente entre os tratamentos pelo teste de Tukey, ( $p < 0,05$ ).

Acrônimos: p = valor de p; CV (%) = coeficiente de variância.

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Cabe considerar as excepcionalidades registradas com a variável Cd, por apresentar uma concentração abaixo do LD do aparelho nos três processos não sendo significativo ( $p > 0,05$ ), o Mo por assinalar valores abaixo LD para o

processo I e III e  $171,46 \text{ mg Kg}^{-1}$  no processo II, o Ni ao registrar uma concentração abaixo do LD para o processo II e III e de  $350,90 \text{ mg Kg}^{-1}$  no processo I e o Ti por apresentar uma concentração superior ( $p < 0,05$ ) de  $563,14 \text{ mg Kg}^{-1}$  no processo I e não apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os processos II e III.

Em face, os possíveis erros induzidos pelas discrepâncias observadas entre as médias das concentrações das variáveis Cd, Mo, Ni e Ti, as mesmas não serão consideradas nas análises dos dados.

Os dados revelam ainda que as CCAs do processo II apresentam valores superiores ( $p < 0,05$ ) aos registrados nos processos I e III nas variáveis Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, U e os menores valores das variáveis MO e pH.

A variabilidade dos valores médios das concentrações dos ETs, teores de U, MO e índice do pH presentes na composição das CCA em estudo estão de acordo com os registros dos trabalhos desenvolvidos por Angel et al. (2009), Costa et al. (2004), Della et al. (2001), Fernandes, 2015; Fernandes et al. (2016), Gonçalves e Bergmann (2007), Guidotti (2017), Islabão (2013), Olamide et al. (2012), Pouey (2006) e Sandrini (2010).

Na busca de identificar o grau de variabilidade existente entre as CCAs dos três processos, os valores médios dos componentes, das 15 amostras de CCA foram submetidos à análise multivariável, MANOVA pelo teste de Wilks' Lambda.

O resultado, resumido da análise multivariada de Wilks' Lambda, descrito na Tabela 3 sugere que as CCAs apresentam na sua composição elementos com concentrações significativamente diferentes. Ou seja, o resultado sugere que as cinzas apresentam na sua composição elementos com diferentes concentrações, teores e índice que lhes dão características que as tornam diferentes entre si.

As diferenças verificadas nas concentrações e teores são atribuídas a um conjunto de fatores, dentre os quais, cabe destacar os pedológicos, edafológicos, variedade de arroz cultivada (genótipo), tratos culturais aplicados no desenvolvimento da cultura, processo de queima da CA, tempo de queima CA, temperatura de queima CA, velocidade de resfriamento, preparo das amostras e métodos de análises (GUIDOTTI, 2017; ISLABÃO, 2013; POUHEY, 2006; QUESADA et al., 2017 e SANDRINI, 2010). FERNANDES et al. (2016)

salienta que as condições de operação dos diferentes processos de conversão (pirólise, gaseificação e/ou combustão) associadas aos fatores intrínsecos da CA vão determinar as características físico-químicas do produto final CCA.

**Tabela 3 - Resumo da análise multivariada de Wilks' Lambda entre as variáveis Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Ti, U, MO e pH presentes na composição das CCAs provenientes de três diferentes processos de queima.**

Teste Estatístico	Valor	Valor F	Num DF	Den DF	p	Comentário
Wilks' Lambda	0.000000	2093.08	24	2	0.0005	Significativo

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Por conseguinte, é possível conceber, a partir dos estudos do presente item, que além de outros fatores, não analisados e os atributos inerentes da CA, o processo de queima, contribui na diferenciação das características das CCAs, uma vez que, no processo I, a fornalha operava, no período dos estudos, a temperaturas que variava de 800 - 900 °C e o tempo de queima de até 5 min. No processo II, a temperatura de queima oscilou no intervalo de 800 – 900 °C e o tempo de queima de aproximadamente 15 a 20 min. Já no processo III, o sistema trabalhava com a temperatura próxima a 600° C - 700 °C e o tempo de queima de 15 a 20 min.

## 5.2 Avaliação da fitotoxicidade da CCA

Analisando os dados da (Tabela 4) constata-se que o valor médio do IGa, (alface) (160,16) das sementes submetidas ao tratamento do processo I é significativamente maior ao ser comparado com os resultados do processo II, IGa (63,66) e III, IGa (94,46) e que os valores dos IGAs do processo II e III não diferem entre si de forma significativa. Os dados revelam que as CCAs do processo II apresentaram, na sua composição, elementos bioativos que induziram a redução da germinação e o crescimento radicular na comparação com o processo I.

No tocante aos valores registrados no IGa do processo II (63.66) e processo III (94.46) que estatisticamente não diferem entre si, Belo (2011), nos seus estudos, relata que não há uma unanimidade para qualificar a

fitotoxicidade, entretanto, observou que na maioria dos autores consideram que para os valores do IG acima de 80% não há efeitos fitotóxicos. Assim, para o presente projeto o IGa 94.46% será considerado como não tóxico.

No que diz respeito ao bioensaio com cebola, (IGc) os resultados indicam que os valores do IGc (101.43) do processo I e do processo III IGc (93.68) não apresentam diferença entre si ( $p < 0.05$ ) e que o IGc, (30.87) do processo II é notadamente menor ao ser comparado com os IGs dos processos I e III. Os resultados confirmam os dados do bioensaio da alface e sugerem que a CCA do processo II apresenta na sua composição elementos inibidores da germinação e do crescimento radicular.

No exame das médias dos IGs, do bioindicador repolho (IGr) é possível evidenciar que o IGr (131.43) do processo I e IGr (108.71) do processo III não diferem estatisticamente entre si mas, diferem substancialmente ( $p < 0.05$ ) do IGr (37.55) do processo II. Os dados corroboram com as informações levantadas nos biotestes com alface e cebola, os quais sugerem que as CCAs do processo II restringem a germinação e o crescimento radicular.

**Tabela 4 - Valores das médias dos IGs %, valor de (p) e coeficiente de variação dos bioindicadores sementes de alface – (*Lactuca sativa* L), cebola – (*Allium cepa* L) e repolho – (*Brassica oleracea*, L) submetidas ao tratamento com extrato aquoso das CCA de diferentes processos de incineração, por 144 horas.**

Tratamento	Resultados das médias dos IGs (%) dos bioindicadores		
	Alface	Cebola	Repolho
Processo I	160,16 <sup>a</sup>	101,43 <sup>a</sup>	131,43 <sup>a</sup>
Processo II	63,66 <sup>b</sup>	30,87 <sup>b</sup>	37,55 <sup>b</sup>
Processo III	94,46 <sup>b</sup>	93,68 <sup>a</sup>	108,71 <sup>a</sup>
p	06.8564e-05	0.00012999	0.010658
CV%	21.36	25.25	45.41

As médias seguidas pelas mesmas letras minúscula, (<sup>a</sup> e <sup>b</sup>) em uma mesma coluna, não divergem entre si pelo teste de Tukey, ( $p < 0,05$ ).

Acrônimos: p = valor de p; CV% = coeficiente de variância.

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Com base nas investigações dos IGs, ressaltados é exequível assinalar que na composição das CCAs dos processos I e III não apresentam constituintes com ação fitotóxica para os bioindicadores alface, cebola e

repolho. Em compensação, os dados dos IGs, do processo II, indicam que na composição da CCA estão presentes, elementos bioativos, com ação fitotóxica capazes de inibir a germinação e o desenvolvimento das raízes dos bioindicadores estudados.

Na busca de identificar as variáveis independentes (ETs, U, MO e pH), que tiveram uma ação relevante sobre o comportamento das variáveis dependentes (IGa, IGc e IGr), foi realizada a análise de regressão linear múltipla via Stepwise ( $p < 0.05\%$ ) (Tabela 5), a análise de correlação de *Pearson* ( $p < 0.05\%$ ), (Tabela 6), além da análise de Trilha (Tabelas 7, 8 e 9) por separar as correlações entre as variáveis em efeitos diretos e indiretos.

Em função das razões já apontadas anteriormente as variáveis Cd, Ni, Mo e Ti não serão consideradas nas análises do presente item.

Ao se apurar os resultados das equações da análise de regressão de Stepwise ( $p < 15\%$ ), (Tabela 5) é factível aventar que a MO influenciou no resultado do IGa da alface com a probabilidade de acerto de 75% ( $R^2$ ) e com 77% ( $R^2$ ) no resultado do IGc da cebola. Já para o IGr do repolho os resultados apontam que o pH teve a maior atuação com 53% ( $R^2$ ).

**Tabela 5 - Equações lineares referentes a análise de regressão de Stepwise ( $p < 15\%$ ) entre as variáveis Al, Cu, Fe, Mg, Mn, MO, Na, Ni, Ti, U, MO e pH e as variáveis respostas IGa, IGc e IGr.**

IG	$R^2$	p	Equação
IGa	0,75	< ,0001	IGa = 6,48 +18,27 MO
IGc	0,77	< ,0001	IGc = 98,00 – 0,39 MO
IGr	0,53	< ,0019	IGr = -28,44 + 17,44 pH

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

No exame dos dados das correlações da matriz de *Pearson* ( $p < 0,05$ ) (Tabela 6), verifica-se uma correlação do IGa negativa com Cu, (-0,67), Mg, (-0,54) e Na (0,62) e positiva ( $p < 0,05$ ) com MO, (0,87) e o pH, (0,79). Com base nos dados é possível recomendar que as variáveis Cu e a MO, por apresentarem os maiores valores de correlação, interferiram com maior impetuosidade na inibição do IGa (63.66) do processo II na comparação com os processos I e III.

Com relação ao IGc (cebola) constata-se uma correlação negativa ( $p < 0,05$ ) com Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Na e U, bem como, uma correlação positiva ( $p < 0,05$ ) com MO e o pH. Os achados nos dispõem a aferir que as variáveis Cu, Na e o pH tiveram um relevante papel sobre o resultado registrado do IGc, (30,87%) do processo II tendo em vista que apresentam as maiores correlações, Cu (-0,87), Na (-0,87) e o pH (0,87).

No que se refere ao IGr (repolho) percebe-se uma correlação negativa ( $p < 0,05$ ) com as variáveis Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Na e U, assim como, uma correlação positiva ( $p < 0,05$ ) com as variáveis MO e pH sendo que os maiores valores das correlações foram registrados pelo Cu (-0,70) e o pH (0,73). Desta forma, é factível assinalar que o Cu e pH interferiram, entre outros, no resultado do IGr (37,55%) do processo II.

**Tabela 6 - Resumo com os valores significativos das correlações de Pearson ( $p < 0,5\%$ ) das variáveis Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Ti, U, MO, pH e dos IGs, das sementes dos bioindicadores alface, cebola e repolho submetidos ao tratamento das CCA de diferentes processos de incineração**

	Al	Cu	Fe	Mg	Mn	Na	Ti	U	MO	pH
<b>IGa</b>	-0,47***	<b>-0,67**</b>	-0,48***	-0,54**	-0,47***	-0,62**	<b>0,70**</b>	-0,35***	<b>0,87*</b>	0,79**
<b>IGc</b>	-0,82**	<b>-0,87*</b>	-0,82**	-0,84*	-0,81**	<b>-0,87*</b>	0,37***	-0,66**	0,74**	0,87*
<b>IGr</b>	-0,64**	<b>-0,70**</b>	-0,65**	-0,66**	-0,62**	-0,69**	0,37***	-0,58**	0,71**	<b>0,73**</b>

Valores seguidos por \* ( $p < 0001$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ) apresenta significativa correlação ( $p < 0,05$ ) e \*\*\* ( $p > 0,05$ ) não apresentam significativa correlação

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

De forma resumida é possível sugerir que, entre outros fatores, as variáveis que tiveram uma maior participação sobre o comportamento fitotóxico manifestado pelos bioindicadores foram: para alface o Cu (-0,67) e a MO (0,87); cebola Cu (-0,87), Na (-0,87) e o pH (0,87); e para o repolho Cu, (-0,70) e o pH (0,73).

Os resultados das análises de Trilha que separaram as correlações entre as variáveis em efeitos diretos e indiretos dos três bioindicadores estão relatados nas tabelas 7, 8 e 9.

Os dados da análise de Trilha do IGa (alface), (Tab. 7) revelam que o efeito direto positivo de maior relevância está representado pelo caractere explicativo pH, (0,3769), por apresentar a maior correlação de efeito direto

sobre o IGa e indicar uma relação de causa e efeito positiva com a correlação total ( $r$ ) (0,7871) motivada, pela ação indireta positiva da MO (0,3513) via pH e dos efeitos indiretos negativos do Cu (-0,3667) via pH e indireta positiva com a MO.

Os resultados demonstram existir uma relação de causa e efeito direta positiva da MO com pH e inversa negativa do Cu com o pH e a MO preconizando, desta forma, que a ação da MO é dependente do pH e que o aumento da MO e do pH reduz o efeito do Cu, além de, sugerir que as variáveis que tiveram o maior envolvimento sobre o resultado do IGa foram o pH, MO e o Cu.

Diante do exposto e considerando que as estimativas da análise de Trilha demonstram serem confiáveis devido ao alto valor obtido no coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,81$ ) e dos efeitos residuais (0,43) é factível propor que seus dados além de confirmar os resultados, em parte da análise de regressão de Stepwise ( $p < 15\%$ ) ao indicar a MO e da correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ) o Cu e a MO complementa o estudo ao revelar a participação do pH no resultado dos IGa.

No exame dos valores da análise de Trilha do IGc (cebola), (Tab. 8), verifica-se que o efeito direto positivo do caractere de maior importância foi o pH (0,2943), engendrado por uma correlação de causa e efeito positivo com a correlação total, ( $r$ ), (0,8727), estimulada pelo efeito indireto positivo da MO (0,2743) via pH e do efeito indireto negativo do Cu (-0,2863) via pH. Os resultados demonstraram existir uma relação direta positiva da MO com o pH, bem como, uma relação indireta do Cu com o pH e a MO o que, ratifica o mesmo comportamento evidenciado com o bioindicador alface.

As estimativas da análise de Trilha sugerem que pH, MO e o Cu intercederam no resultado do IGc, ao manifestarem um bom ajuste para o modelo adotado e confiáveis devido ao alto valor obtido no coeficiente de determinação ( $R^2=0,79$ ) e efeito da variável residual (0,45).

Na análise de trilha do IGr (repolho), (Tab. 9), apura-se que o caractere explicativo, reconhecido como relevante, é a MO (0,2977) por apresentar o maior valor de efeito direto positivo sobre o IGr. O efeito direto, positivo, da MO ostenta um vínculo de causa e efeito, de mesmo sinal, com a correlação total ( $r$ ) (0,7068) provocado pelo efeito indireto positivo do pH (0,2774) via MO e

indireto de sinal contrário do Cu (-0,2594) via MO. O resultado sinaliza que existe uma relação direta entre o pH e a MO e de forma semelhante uma relação indireta negativa do Cu com a MO. Os relatos preconizam que a ação da MO é pH dependente é que o aumento do pH e da MO suscita a uma redução dos efeitos do Cu.

Os dados propostos pela análise de Trilha revelam um comportamento análogo ao relatado nos bioensaios da alface e cebola em que apontam as variáveis pH, MO e Cu como sendo as que tiveram a maior participação sobre o resultado do IGr. Os dados da análise de Trilha do IGr demonstraram serem confiáveis, devido ao alto valor obtido no coeficiente de determinação ( $R^2=0,55$ ) e efeitos residuais (0,66).

Em face ao exposto, pode-se admitir, na forma de considerações gerais do item, que as variáveis que tiveram a maior participação sobre os resultados IGr dos bioindicadores alface, (63,66%), cebola (30,87%) e repolho (37,55%) foram a MO, o pH e o Cu.

As informações contribuíram na elucidação da fitotoxicidade revelada pelos bioindicadores tratados com extrato aquosos das CCAs do processo II, dado que, as mesmas apresentaram os menores registros da MO (7,36%) e do pH (3,74) e a maior concentração de Cu ( $87,94 \text{ mg kg}^{-1}$ ) na comparação com as CCA do processo I e III.

O comportamento da MO e do pH na integração com os ETs é referido nos estudos de Camargo, (2006), Costa, (2005), Costa (2006), Hackbarth (2014) e Pertusatti (2007) ao descreverem que a MO apresenta uma alta reatividade com os ETs por apresentar uma superfície de carga que é dependente do pH, sendo assim, as alterações no pH da solução influencia o balanço das cargas positivas e negativas.

Em geral, para valores de pH baixo, pode ocorrer competitividade entre íons  $H^+$  e os íons dos ETs pelas ligações de sítios ativos dos ácidos carboxílicos, (- COOH), hidroxila (- OH) da MO e, conseqüentemente a diminuição na capacidade de adsorção, uma vez que, os grupos funcionais estão protonados, o que significa que as maiorias dos locais de ligação estão ocupados por prótons.

**Tabela 7 - Estimativa dos efeitos diretos e indiretos das variáveis (Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Ti, U, MO, pH) avaliadas na composição das CCA de três diferentes processos de incineração sobre a variável principal IGa, alface.**

Efeitos	Caracteres explicativos											
	Al	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Ti	U	MO	pH
Efeito direto IGa	0.3032	0.0317	-0.1264	-0.0952	0.1618	-0.1526	-0.0068	0.2544	0.0231	-0.0705	0.3677	0.3769
Efeito indireto Al	-----	0.0303	-0.1240	-0.0937	0.1611	-0.1462	-0.0067	-0.0687	-0.0027	0.0596	-0.2615	-0.3321
Efeito indireto Cu	0.2902	-----	-0.1183	-0.0916	0.1544	-0.1512	-0.0068	-0.1361	-0.0085	0.0512	-0.3203	-0.3667
Efeito indireto Fe	0.2974	0.0296	-----	-0.0933	0.1586	-0.1442	-0.0066	-0.0618	-0.0009	0.0580	-0.2551	-0.3253
Efeito indireto Mg	0.2985	0.0305	-0.1240	-----	0.1579	-0.1496	-0.0067	-0.0823	-0.0038	0.0596	-0.2773	-0.3464
Efeito indireto Mn	0.3021	0.0302	-0.1240	-0.0929	-----	-0.1447	-0.0067	-0.0676	-0.0022	0.0595	-0.2611	-0.3287
Efeito indireto Mo	0.2905	0.0314	-0.1195	-0.0933	0.1534	-----	-0.0068	-0.1271	-0.0080	0.0536	-0.3143	-0.3681
Efeito indireto Na	0.2968	0.0315	-0.1220	-0.0938	0.1577	-0.1517	-----	-0.1144	-0.0065	0.0551	-0.3055	-0.3608
Efeito indireto Ni	-0.0819	-0.0169	0.0307	0.0308	-0.0430	0.0762	0.0030	-----	0.0209	0.0043	0.3035	0.2502
Efeito indireto Ti	-0.0359	-0.0117	0.0053	0.0158	-0.0158	0.0527	0.0019	0.2294	-----	0.0097	0.2284	0.1927
Efeito indireto U	-0.2564	-0.0230	0.1041	0.0805	-0.1364	0.1160	0.0053	-0.0156	-0.0031	-----	0.1609	0.2472
Efeito indireto MO	-0.2156	-0.0276	0.0877	0.0718	-0.1149	0.1304	0.0057	0.2100	0.0143	-0.0308	-----	0.3513
Efeito indireto pH	-0.2672	-0.0308	0.1091	0.0875	-0.1411	0.1490	0.0065	0.1689	0.0118	-0.0462	0.3427	-----
Correlação total	-0.4655	-0.6705	-0.4769	-0.5439	-0.4660	-0.6689	-0.6210	0.8459	0.6972	0.2051	0.8695	0.7871
Coeficiente de determinação = R2			0.81									
Valor de k usado na análise			5.25682067871094E-02									
Efeito da variável residual			0.431275104591979									
Determinante da matriz de correlação			0.0000000001578151685282949739									

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

**Tabela 8 - Estimativa dos efeitos diretos e indiretos das variáveis (Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Ti, U, CT, pH) avaliadas na composição das CCA de três diferentes processos de queima sobre a variável principal IGc, cebola.**

Efeitos	Caracteres explicativos											
	Al	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Ti	U	MO	pH
Efeito direto <b>IGc</b>	-0.0567	-0.1013	-0.2097	-0.1408	-0.0503	-0.2003	-0.1130	0.2429	0.0254	-0.1164	-0.3668	0.2943
Efeito indireto Al	-----	-0.0969	-0.2057	-0.1386	-0.0501	-0.1920	-0.1106	-0.0656	-0.0030	0.0984	0.2608	-0.2593
Efeito indireto Cu	-0.0543	-----	-0.1962	-0.1354	-0.0480	-0.1985	-0.1123	-0.1299	-0.0094	0.0846	0.3196	-0.2863
Efeito indireto Fe	-0.0556	-0.0947	-----	-0.1380	-0.0493	-0.1894	-0.1090	-0.0590	-0.0010	0.0958	0.2545	-0.2540
Efeito indireto Mg	-0.0559	-0.0974	-0.2056	-----	-0.0491	-0.1964	-0.1113	-0.0786	-0.0042	0.0984	0.2766	-0.2704
Efeito indireto Mn	-0.0565	-0.0967	-0.2056	-0.1374	-----	-0.1900	-0.1101	-0.0645	-0.0024	0.0982	0.2605	-0.2567
Efeito indireto Mo	-0.0544	-0.1003	-0.1982	-0.1380	-0.0477	-----	-0.1123	-0.1214	-0.0088	0.0885	0.3135	-0.2874
Efeito indireto Na	-0.0555	-0.1006	-0.2023	-0.1387	-0.0491	-0.1992	-----	-0.1093	-0.0071	0.0910	0.3048	-0.2817
Efeito indireto Ni	0.0153	0.0541	0.0509	0.0455	0.0133	0.1001	0.0508	-----	0.0229	0.0071	-0.3028	0.1954
Efeito indireto Ti	0.0067	0.0375	0.0088	0.0235	0.0049	0.0693	0.0318	0.2190	-----	0.0160	-0.2278	0.1504
Efeito indireto U	0.0480	0.0736	0.1727	0.1190	0.0424	0.1523	0.0883	-0.0149	-0.0035	-----	-0.1605	0.1930
Efeito indireto MO	0.0403	0.0882	0.1455	0.1061	0.0357	0.1712	0.0939	0.2005	0.0158	-0.0509	-----	0.2743
Efeito indireto pH	0.0500	0.0985	0.1810	0.1294	0.0439	0.1957	0.1081	0.1613	0.0130	-0.0763	-0.3418	-----
Correlação total (r)	-0.8226	-0.8731	-0.8208	-0.8425	-0.8147	-0.8777	-0.8670	0.5088	0.3672	0.5882	0.7350	0.8727
Coeficiente de determinação = R2	0.79											
Valor de k usado na análise	5.25682067871094E-02											
Efeito da variável residual	0.45											
Determinante da matriz de correlação	0.00000000015											

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

**Tabela 9 - Estimativa dos efeitos diretos e indiretos das variáveis (Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Ti, U, CT, pH) avaliadas na composição das CCA de três diferentes processos de queima sobre a variável principal IGr, repolho.**

Efeitos	Caracteres explicativos											
	Al	Cu*	Fe	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Ti	U	MO	pH
Efeito direto IGr	-0.0486	0.0930	-0.4365	0.0177	0.1554	-0.1261	0.0180	-0.0664	0.1095	-0.0905	0.2977	0.2097
Efeito indireto Al	-----	0.0890	-0.4281	0.0174	0.1549	-0.1208	0.0176	0.0179	-0.0129	0.0765	-0.2117	-0.1848
Efeito indireto Cu	-0.0465	-----	-0.4083	0.0170	0.1484	-0.1249	0.0179	0.0355	-0.0405	0.0657	-0.2594	-0.2041
Efeito indireto Fe	-0.0476	0.0870	-----	0.0173	0.1524	-0.1192	0.0173	0.0161	-0.0046	0.0745	-0.2065	-0.1810
Efeito indireto Mg	-0.0478	0.0895	-0.4280	-----	0.1517	-0.1236	0.0177	0.0215	-0.0182	0.0765	-0.2245	-0.1928
Efeito indireto Mn	-0.0484	0.0888	-0.4280	0.0172	-----	-0.1196	0.0175	0.0176	-0.0107	0.0763	-0.2114	-0.1829
Efeito indireto Mo	-0.0466	0.0922	-0.4126	0.0173	0.1474	-----	0.0179	0.0332	-0.0379	0.6882	-0.2544	-0.2048
Efeito indireto Na	-0.0476	0.0925	-0.4211	0.0174	0.1515	-0.1253	-----	0.0298	-0.0308	0.0707	-0.2473	-0.2008
Efeito indireto Ni	0.0131	-0.0497	0.1061	-0.0057	-0.0413	0.0630	-0.0081	-----	0.0988	0.0055	0.2457	0.1392
Efeito indireto Ti	0.0057	-0.0344	0.0183	-0.0029	-0.0152	0.0436	-0.0050	-0.0599	-----	0.0124	0.1849	0.1072
Efeito indireto U	0.0411	-0.0676	0.3594	-0.0149	-0.1311	0.0959	-0.0140	0.0040	-0.0151	-----	0.1302	0.1376
Efeito indireto MO	0.0345	-0.0811	0.3029	-0.0133	-0.1104	0.1078	-0.0149	-0.0548	0.0680	-0.0396	-----	0.1955
Efeito indireto Ph	0.0428	-0.0905	0.3768	-0.0162	-0.1356	0.1231	-0.0172	-0.0441	0.0560	-0.0593	0.2774	-----
Correlação total (r)	-0.6360	-0.7016*	-0.6521	-0.6595	-0.6205	-0.7117	-0.6921	0.4971	0.3697	0.4305	0.7068	0.7332
Coeficiente de determinação = R <sup>2</sup>	0.55											
Valor de k usado na análise	4.87560163225446E-02											
Efeito da variável residual	0.669129548551775											
Determinante da matriz de correlação	0.000000000884375879173984587											

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Complementando os autores sugerem que nestas condições, os ETs ficam mais disponíveis aos organismos vivos e suscetíveis aos mecanismos de lixiviação, resultando num aumento do potencial de risco de haver impactos ambientais. Em contrapartida, quando o valor do pH aumenta, a superfície da MO fica carregada negativamente e a adsorção dos íons metálicos com cargas positiva (prótons), a exemplo do  $\text{Cu}^{2+}$  é mais elevada. Nesta situação, os ETs permanecem retidos nos diferentes compartimentos constituintes do meio ambiente e seu potencial de impacto ecotoxicológico é reduzido.

Nesta mesma linha de análise, que enfatiza a importância da MO na interação com os ETs estão os relatados nos trabalhos de Gaivizzo (2001), Guilherme et al. (2005), Moreira (2004), Moreira e Siqueira (2006), Martins et al. (2011), Oliveira e Marins (2011) e Souza et al. (2015) ao descreverem que a MO, se compõem por uma mistura heterogênea de substâncias húmicas constituída por ácidos húmicos, fúlvicos e humina, responsáveis por lhe atribuir propriedade físicas-químicas e características de alta reatividade com os ETs. Camargo (2006), Hugen (2010), Silva (2014), Vinhal-Freitas et al. (2010) assinalam que os processos de adsorção/dessorção e precipitação/dissolução, que envolve reações físicas e químicas, ou mesmo a combinação de ambas, são os principais reguladores da concentração e da retenção dos ETs na solução, e por conseguinte, pela sua disponibilidade ou não aos organismos vivos, bem como, pelos possíveis riscos de contaminação ambiental quando lixiviados ou absorvidos pelos organismos.

Finalizando, os autores sugerem que as interações relativamente complexas são determinadas por uma série de fatores incluindo o número de átomos que formam a ligação com o metal, concentração de íon metálico, pH, potencial redox (Eh) do meio, força iônica da solução e tempo de complexação, além de sugerirem que a preferência de adsorção dos cátions no sentido decrescente se dá pela esfera interna > esfera externa > camada difusa.

Na avaliação da influência da variável pH, nos valem dos estudos de Vinhal-Freitas et al. (2010) os quais apontam que o pH é o principal fator que governa as reações de adsorção de ETs por coloides orgânicos ou inorgânicos, tendo em vista, que as mesmas são acompanhadas da liberação de prótons ( $\text{H}^+$ ) e redução do pH, considerado o maior competidor pelo sítios funcionais livres. Sobre o tema, Gerber et al. (2017), ao investigar efluentes industriais,

ênfatizam que o pH pode afetar a germinação de sementes (SG) devido à sua influência sobre: a disponibilidade de nutrientes e de oligoelementos contidos no efluente bruto; a mineralização da matéria orgânica; e sobre a capacidade de troca de cátions do solo.

A presença do Cu, elemento essencial aos organismos em doses não tóxicas (PEDIAL, 2008), segundo Camargo (2006), Souza (2016) e Zanello (2006) é no estado de valência  $\text{Cu}^{2+}$ , podendo existir nas formas iônicas  $\text{C}^0$  e  $\text{C}^{(+1, +2 \text{ e } +3)}$ , bem como, em pH abaixo de 8 nas fórmulas  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$ . Acrescentando, os autores sugerem que através de reações químicas, dependentes do pH, que envolvem os grupos funcionais dos ácidos carboxílicos, (-COOH), hidroxila (-OH), fenólicos, alcoólicos e alguns tios de carbonila, (-C=O) vão se dar as condições de formar complexos estáveis com a MO e, conseqüentemente, na biodisponibilidade ou não dos ETs.

A ação fitotoxicidade do Cu está amplamente relatada a exemplo dos estudos de Chen et al. (2004) que ao investigar o efeito da prolina no transporte do Cu em mudas de arroz submetidas ao excesso de Cu constaram a diminuição do fluxo de água e mau funcionamento da barreira de transporte do Cu nas raízes tendo em vista a redução dos teores de prolina nas raízes. Fiskesjö (1988), ao avaliar a ação toxicológica dos íons metálicos Hg, Cu, Ni, Cd, Be, Al, Mn e Li evidenciou que em concentrações acima de 1.5 mg/L o Cu causou efeitos prejudiciais graves às células, redução do crescimento radicular e do índice mitótico da cebola (*Allium cepa* L.). Hemachandra e Pathiratne (2015) ao avaliarem a toxicidade de efluentes industriais evidenciaram que o Cu promoveu a maior inibição do crescimento radicular e do IM além de aberrações cromossômicas na comparação com os efeitos do Cádmio e Cromo. Işeri et al. (2011) ao averiguarem o dano oxidativo e a fitotoxicidade induzida pelo Cu nas concentrações de  $\text{EC}_{50} = 30$  e  $5,5 \text{ ppm / L}$  e  $2 \times \text{EC}_{50} = 60$  e  $11 \text{ ppm / L}$ , tratadas durante 7 dias, em mudas de tomate (*Lycopersicum Esculentum* Mill) e pepino (*Cucumis sativus* L.) constataram o aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nas células das raízes indicando com isto haver um aumento do estresse oxidativo, bem como, uma inibição dose dependente do crescimento radicular e do índice mitótico na comparação com as mudas não tratadas. Qin et al. (2016) utilizando-se da tecnologia proteômica combinada com transcriptômica pesquisaram os efeitos do Cu sobre o

crescimento radicular de *Allium cepa* L. e verificaram uma dramática inibição do crescimento radicular após 12 horas de tratamento e a identificação de 27 proteínas envolvidas em múltiplos processos biológicos, incluindo respostas defensivas, de regulação da transcrição e síntese protéica, síntese da parede celular, ciclo celular e DNA.

No tocante ao comportamento dos bioindicadores destacamos os relatos dos estudos de revisão bibliográfica sobre ação dos ETs sobre as plantas de Emamverdian et al. (2015), Khan et al. (2015) e Alves, Reis & Gratão (2016) ao ressaltarem para a necessidade de se considerar que as plantas desenvolvem várias estratégias de defesa, tolerância e desintoxicação e que os vegetais folhosos como *Lactuca sativa* L. (alface) e os pertencentes à família das Brassicaceae *Brassica oleracea*, L. (repolho) são considerados como potenciais hiperacumuladores de ETs, bem como, as recomendações de Salles et al. (2016) ao destacarem, que os efeitos toxicológicos de misturas ambientais complexas, tema do presente projeto, não são causadas por compostos isolados, mas refletem, em geral, os efeitos cumulativos e / ou sinérgicos dos contaminantes presentes na mistura.

Ante o exposto, e nas condições limitadas do presente estudo, uma vez que outros fatores, não investigados podem ter atuado é factível admitir que as variáveis MO, pH e Cu foram os principais fatores que influenciaram na inibição dos IGs registrados nos biotestes da CCA do processo II.

### **5.3 Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade**

Os resultados da avaliação de citotoxicidade (IM) estão descritos na Tabela 10 do item 5.3.1 e da genotoxicidade (AC) na Tabela 11 do item 5.3.2.

#### **5.3.1 Avaliação da citotoxicidade**

No exame dos dados que constam na Tabela 10 apura-se que o IM (2.78%) das sementes submetidas à SEA das CCA do processo II difere significativamente na comparação com do IM (4.29%) das sementes expostas ao TC. Por sua vez, o IM, (4.20%) do tratamento do processo I e o IM, (4.19%)

do processo III não apresentam diferença ( $p>0.05$ ) na comparação com o IM (4.29%) do TC.

Os resultados observados demonstram que houve uma redução significativa do IM das células meristemáticas das raízes das sementes submetidas ao tratamento com extrato aquoso das CCAs do processo II em relação ao tratamento controle na ordem de 35.5%. E, sendo assim, sinaliza que na composição da CCA do processo II apresenta elementos com características bioativas que inibem a divisão celular e o desenvolvimento dos vegetais.

**Tabela 10 - Valores das médias do IM (%), observado em células meristemáticas de sementes de cebola (*Allium cepa* L) tratadas, com extrato aquoso de CCA proveniente de três diferentes processos de queima da CA, comparado os tratamentos pelo teste de Dunnett (5% de erro).**

Tratamentos	Células			IM* (%)	DP	Comparação Teste de Dunnett
	Total	Interfase	Divisão			
1. Processo I	22.500	21.553	947	4,20 <sup>a</sup>	±0,03	(1 - 4) = 0,2044
2. Processo II	22.500	21.873	627	2,78 <sup>b</sup>	±0,18	3 - 4) = 0,1964
3. Processo III	22.500	21.555	945	4,19 <sup>a</sup>	±0,0301	(2 - 4) = -1,2136**
4. Controle	7.500	7.178	322	4,29 <sup>a</sup>	±0,30	

\* (<sup>a, b, c</sup>) Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ( $p<0,05$ ). \*\* Comparação significativa ( $p < 0.05\%$ ) pelo Teste de Dunnett

Acônimos: Número de células; IM (%): Índice Mitótico da cebola; DP: Desvio padrão.

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Para Caritá e Marin-Morales (2008), Hoshina (2005), Leme e Marin-Morales (2009) e Iqbal (2016) a redução ou aumento da atividade mitótica pode ser utilizada como um indicador de efeitos citotóxicos, uma vez que, ação de um ou mais agente tóxico, pode induzir ao aumento ou diminuição dos valores do IM em relação a um tratamento controle. Os mesmos autores reportam que uma significativa redução do IM sinaliza que os agentes apresentam características bioativas de ação ecotoxicológica que interferem de forma negativa no desenvolvimento dos organismos exposto.

Entre as possíveis causas apontadas pelos autores estão às relacionadas às perturbações no ciclo celular ou à disfunção da cromatina induzida por interações ETs-DNA.

Pretendendo-se identificar a relação existente entre as variáveis independentes (ETs, U, MO e pH) e seus efeitos diretos e indiretos sobre a variável dependente (IM), os dados foram submetidos à análise de regressão linear múltipla via Stepwise ( $p < 0,15$ ), (Tabela 11), correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ), (Tabela 12), e análise de Trilha, (Tabela 13).

Na avaliação dos resultados da regressão linear múltipla via Stepwise ( $p < 0,15\%$ ), (Tabela 11) a equação assinala que a variável Cu, com 98% de probabilidade de acerto foi a variável que teve a maior interferência sobre a inibição do IM.

**Tabela 11 - Resumo dos dados da regressão, através dos procedimentos propostos por de Stepwise ( $p < 15$ ) entre as variáveis Al, Cu, Fe, Mg, Mn, MO, Na, Ni, Ti, U, MO e pH e a variável resposta IM.**

Variáveis	R <sup>2</sup>	p	Equação
IM	0,98	0,0001	IM = 5,116 – 0,026 Cu

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

No exame das respostas das correlações na Matriz de Pearson ( $p < 0,05\%$ ), (Tabela 12), apura-se uma correlação negativa ( $p < 0,05$ ) com Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Na e U e positiva ( $p < 0,05$ ) com MO e o pH sendo que, o maior valor de correlação negativa está representada pelo Cu (-0,99) e a correlação positiva pela variável pH (0,96). O resultado confirma os achados da regressão linear múltipla via Stepwise ( $p < 0,15$ ) ao apontar que, entre outros fatores, a variável Cu teve uma importante participação na inibição do IM.

Na investigação dos resultados da análise de Trilha (Tab. 13) foi considerado o caractere explicativo Cu (-0,1263) por ostentar o maior valor de associação de causa e efeito negativo com a correlação total (r) de (-0,991) motivada pelo efeito indireto negativo do Al (-0,1578) via Cu. O resultado revela a existência de uma relação de causa e efeito negativa entre a variável Al e a variável Cu com o IM que suscita, que quanto menor concentração do Al menor será o efeito direto negativo do Cu e do Al sobre o IM. O resultado confirma os dados evidenciados na correlação da regressão de Stepwise ( $p < 15$ ) e

correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ) que indicam que a variável Cu teve a maior participação sobre os resultados do IM e adiciona ao estudo a presença do Al na inibição do IM da cebola.

**Tabela 12 - Resumo dos valores da matriz de correlação de Pearson ( $p < 0,5$ ) entre as variáveis independentes Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Ti, U, MO e pH e a variável resposta IM das células meristemáticas de sementes de *Allium cepa* L. submetidas ao tratamento de extrato aquoso da CCAs provenientes de três diferentes processos de queima da CA.**

	Al	Cu	Fe	Mg	Mn	Na	Ti	U	MO	pH
IM	-0,96*	<b>-0,99*</b>	-0,94*	-0,97*	-0,95*	-0,98*	0,35***	-0,81**	0,85*	0,96*

Valores seguidos por \* ( $p < 0001$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ) apresenta significativa correlação e \*\*\* ( $p > 0.05$ ) não apresenta correlação significativa.

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Em fase do exposto, e considerando que as estimativas da análise de trilha mostraram ser confiáveis, devido ao alto valor ( $R^2=0.97$ ) e baixo efeito residual (0,14) nos induz a inferir que o Cu num efeito sinérgico com o Al interferiu na inibição do IM observado nas sementes submetidas a ST do processo II em comparação com o tratamento controle.

Entre, os fundamentos que nos levam a sugerir que os efeitos do Cu e do Al provocaram a inibição do IM estão os relatos de Achary, Parinandi e Panda (2012) que ao estudarem sobre a explosão oxidativa induzida pelo Al descrevem que a enzima NADPH-PX, ligada à parede celular e a NADPH-OX conectada a membrana plasmática demonstram ser as principais contribuintes para a exposição oxidativa, sendo que, a NADPH-PX, quando ativada pelo Al, é reconhecida como a principal fonte de geração de ROS ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H^2O^2$  e  $\cdot OH$ ) e consequentemente pela oxidação de proteínas, degradação de pigmentos de clorofila, danos ao DNA, redução do IM e morte celular.

Na mesma linha de investigação Qin et al (2010) obtiveram resultados que indicam que o Al é indutor indireto de radicais de superóxido - ROS, ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H^2O^2$  e  $\cdot OH$ ) responsáveis pelo aumento de produtos peroxidativos lipídicos e estresse oxidativo. Fiskesjö (1988) ao estudar o efeito dos íons metálicos Hg, Cu, Ni, Cd, Be, Al, Mn e Li usando como bioindicador *Allium cepa* L. evidenciou uma redução do IM e aumento de AC, sendo que, o Cu apresentou a maior

**Tabela 13 - Estimativa dos efeitos diretos e indiretos das variáveis (Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Ti, U, MO, pH) avaliadas na composição das CCA de três diferentes processos de incineração sobre a variável principal IM do bioindicador *Allium cepa* L.**

Efeitos	Caracteres explicativos											
	Al	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Ti	U	MO	pH
Efeito direto IMc	-0.1649	-0.1263	-0.0663	-0.0846	-0.1453	-0.0954	-0.0902	0.0119	0.0754	-0.0355	0.0751	0.1084
Efeito indireto Al	-----	-0.1578	-0.1617	-0.1624	-0.1642	-0.1579	-0.1614	0.0445	0.0194	-0.1443	0.1172	0.1452
Efeito indireto Cu	-0.1209	-----	-0.1181	-0.1215	-0.1206	-0.1252	-0.1255	0.0675	0.0467	-0.0999	0.1100	0.1229
Efeito indireto Fe	-0.0651	-0.0620	-----	-0.0650	-0.0650	-0.0627	-0.0640	0.0161	0.0027	-0.0602	0.0460	0.0572
Efeito indireto Mg	-0.0834	-0.0814	-0.0829	-----	-0.0826	-0.0830	-0.0834	0.0274	0.0141	-0.0746	0.0638	0.0778
Efeito indireto Mn	-0.1448	-0.1388	-0.1424	-0.1419	-----	-0.1379	-0.1417	0.0386	0.0142	-0.1257	0.1032	0.1267
Efeito indireto Mo	-0.0914	-0.0945	-0.0901	-0.0936	-0.0905	-----	-0.0948	0.0477	0.0330	-0.0785	0.0815	0.0932
Efeito indireto Na	-0.0883	-0.0897	-0.0871	-0.0890	-0.0880	-0.0897	-----	0.0406	0.0254	-0.0753	0.0750	0.0863
Efeito indireto Ni	-0.0032	-0.0063	-0.0028	-0.0038	-0.0031	-0.0059	-0.0053	-----	0.0107	-0.0007	0.0098	0.0079
Efeito indireto Ti	-0.0089	-0.0279	-0.0031	-0.0125	-0.0073	-0.0261	-0.0212	0.0680	-----	0.0052	0.0468	0.0385
Efeito indireto U	-0.0310	-0.0280	-0.0322	-0.0312	-0.0307	-0.0292	-0.0296	0.0021	-0.0024	-----	0.0181	0.0252
Efeito indireto CT	-0.0534	-0.0654	-0.0521	-0.0566	-0.0533	-0.0642	-0.0624	0.0620	0.0466	-0.0384	-----	0.0700
Efeito indireto pH	-0.0955	-0.1055	-0.0935	-0.0996	-0.0945	-0.1059	-0.1037	0.0720	0.0554	-0.0769	0.1010	-----
Correlação total	-0.960	-0.991	-0.937	-0.967	-0.954	-0.990	-0.990	0.499	0.345	-0.806	0.852	0.967
Coefficiente de determinação = R <sup>2</sup>	0.97											
Valor de k usado na análise	5.44743129185268E-02											
Efeito da variável residual	0.14											
Determinante da matriz de correlação	1.99288957050573E-											

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

toxicidade na comparação com os íons inorgânicos testados. Por sua vez, Yildiz et al. (2009) utilizaram *Allium cepa* L. para avaliar os efeitos genotóxicos dos produtos químicos sulfato de cobre (CS) e cloreto de cobalto (CC) preparados em duas concentrações (EC50, 2xEC50). Os resultados dos tratamentos, na comparação com o controle positivo, demonstraram uma redução do índice mitótico e um aumento da frequência de aberrações cromossômicas com o aumento da concentração do (CS) e (CC) corroborando com os dados evidenciados por Fiskesjö (1988).

Acrescenta-se, os trabalhos realizadas com soluções complexas contendo Cu, Al e Mn de Barbério et al. (2009) ao avaliarem o potencial citotóxico e genotóxico da água do rio Paraíba do Sul, no Brasil, com o teste *Allium cepa* L. verificaram um efeito mitodepressivo, cuja a hipótese sugerida está relacionada à presença de ETs no corpo d'água. Radić et al. (2010) ao investigarem, num período de três meses, os possíveis efeitos genotóxicos das águas do rio Sava (Croácia) usando como bioindicador *Allium cepa* L. observaram modificações morfológicas e inibição do crescimento das raízes de mais de 50%, bem como, uma redução dos índice mitótico da orde de 40% além do aumento de frequência de aberrações cromossômicas. Salles et al. (2016) ao investigar a citotoxicidade e genotoxicidade das águas superficiais do Estado de São Paulo, Brasil constataram uma inibição do IM nos tratamentos com amostras das águas dos arroios Ribeirão Lavapé e Jaguari na estação chuvosa causada pela ação tóxica dos ETs. Bhat et al. (2015), ao investigar a influência da vermicompostagem no processo de compostagem, apuraram uma redução do IM nos ensaios sem tratamento pré-vermicompostagem debitada à existência de ETs no composto. Hemachandra e Pathiratne (2015) ao avaliarem os efeitos tóxicos de efluentes industriais aferiram uma maior depressão do IM causada pelo Cu. Abubacker e Sathya (2017) ao estudarem o efeito genotóxico dos metais pesados Cr, Cu, Pb e Zn tendo como bioindicador *Allium cepa* L. constataram uma redução do índice mitótico atribuída a distúrbios no celular ou disfunção da cromatina induzida pela interação metal-DNA.

Com base ao exposto e em face às evidências apontadas na avaliação da citotoxicidade da CCA pode-se considerar como hipótese que as variáveis Cu e Al tiveram a maior participação sobre o efeito mitodepressivo de 35.5%,

na comparação com o tratamento controle, revelado no exame das células meristemáticas, das raízes das sementes de *Allium cepa* L., tratadas com a solução aquosa das CCAs do processo II.

### 5.3.2 Avaliação da genotoxicidade

Na averiguação dos dados da avaliação da genotoxicidade descritos na tabela 14, apura-se que o percentual de aberrações cromossômicas presentes nas células do tecido meristemático de sementes de *Allium cepa* L., tendo

**Tabela 14 - Valores médios, em porcentagem, da frequência de AC nas diferentes fases da divisão celular, em células meristemáticas de sementes de cebola - (*Allium cepa* L.) submetidas à germinação num período de 144 horas, em meio aquoso das CCA procedentes de diferentes processos de queima, coeficiente de variação - CV e valor de p.**

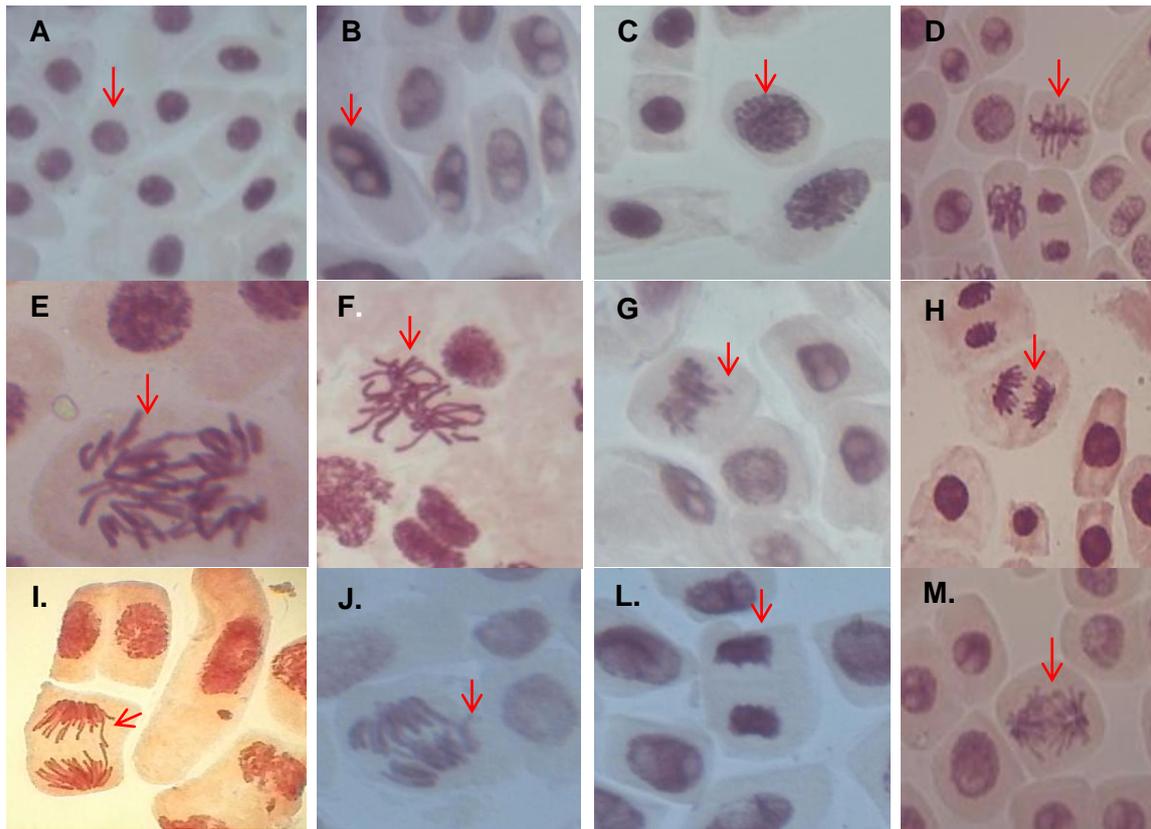
Tratamentos	Frequência de Aberrações Cromossômicas						Total AC	ACc (%)
	Total	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	Total AC		
<b>Controle</b>	7.500	1	2	13	0	16	0,21	
<b>Processo I</b>	22.500	0	7	44	0	51	0,22	
<b>Processo II</b>	22.500	4	27	25	1	57	0,25	
<b>Processo III</b>	22.500	5	5	30	1	41	0,18	
<b>p</b>							0,36%	
<b>CV (%)</b>							27,46	

Médias não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ( $p > 0,05$ ).

Acrônimos: AC (%): Aberrações cromossômicas; CV: coeficiente de variação; p: valor de ( $p > 0,05$ ).

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

como variável resposta a frequência de aberrações cromossômicas - AC, não foram estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ) e, sendo assim, é possível alvitrar pela inexistência de elementos biativos com potencial genotóxico na composição das CCAs. Na Figura 12 estão registradas células normais e AC encontradas no exame citológico, realizado no tecido meristemático, de sementes de *Allium cepa* L. submetidas ao tratamento aquoso de CCA por um período de 144 horas.



**Figura 12** – Imagens de observações realizadas em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L procedentes da germinação de sementes expostas ao extrato aquoso de CCA por 144, realizadas com microscópio de luz incidente, NYKON ECLIPSE-E 200, com aumento de 400 X: (A), Interfase normal (seta); (B), nucleos interfásico (seta); (C), prófase normal (seta); (D), metáfase normal (seta); (E), C-metáfase (seta); (F), metáfase polinucleada (seta); (G), metáfase com perda de cromossomo (seta); (H), anáfase normal (seta); (I), anáfase com ponte de cromossomo (seta); (J), anáfase com quebra de cromossômica (seta); (L), telófase normal (seta) e (M), telófase polinucleada (seta).

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Segundo, Hoshina (2005) Caritá e Marin-Morales (2007), Caritá (2010) as alterações cromossômicas são divididas em duas categorias. As AC genotóxicas, de ação aneugênica, representadas por anomalias do tipo, perda cromossômica, C-metáfase, ponte cromossômica, aderência cromatídica na região terminal dos cromossomos e célula binucleada que estão relacionadas a fenômenos que podem ser derivados de problemas nos microtúbulos citoplasmáticos. Outro conjunto de AC mutagênicas, de ação clastogênica, são as perturbações presente por quebras de cromossomo, atraso e ponte cromossômica. Para os mesmos autores os micronúcleos podem ser resultantes tanto de efeitos aneugênico quanto clastogênica.

## **6. Conclusões**

A partir dos objetivos propostos, dos resultados obtidos nas investigações realizadas, dentro dos limites e condições que a pesquisa foi desenvolvida, uma vez que outros elementos não analisados podem estar presentes e interferindo e das discussões efetivadas com o suporte das análises estatísticas permitem sugerir sobre os temas:

### **6.1 Hipótese**

A acertiva formulada na hipótese, em parte foi respondida, tendo em vista que, a CCA do processo II apresentou na sua composição elementos com características bioativas de ação fitotóxica sobre os bioindicadores alface, cebola e repolho e citotóxica para o bioindicador cebola. Em contrapartida as cinzas dos processos I e III não apresentaram na sua composição elementos com características bioativas de ação fitotóxica e citotóxica.

### **6.2. Objetivos específicos**

#### **6.2.1 Os dados da caracterização dos elementos traços e os teores de U, MO e pH nos induz a sugerir:**

- a) as CCAs procedentes de três diferentes processos de queima (I, II e III) apresentam na sua composição elementos com diferentes concentrações, teores e índices que lhes dão características que as tornam diferentes entre si;
- b) o processo de queima ou a mistura de outros resíduos na queima, além da casca de arroz, estão entre as possíveis causas que contribuíram na diferenciação da CCA do processo II, uma vez que, nos três processos a queima foi realizada em caldeira com grelha deslizante.

#### **6.2.2 Avaliação da ação fitotóxica da CCA usando como parâmetro o índice de germinação de sementes (% IG) e como bioindicadores**

***Lactuca sativa* L (alface), *Allium cepa* (cebola) e *Brassica oleracea* (repolho).**

- a) os menores valores dos IGs da alface, cebola e repolho registrados no processo II, na comparação com os IGs dos processos I e III, preconizam que a MO, pH e o Cu, entre outros fatores, tiveram a maior participação nos efeitos fitotóxicos manifestados pelos bioindicadores alface, cebola e repolho. Da mesma forma que os maiores registros dos IGs no processo I e III da alface, cebola e repolho sinalizam que na composição das CCAs do processo I e III não estão presentes elementos bioativos inibidores da germinação e do crescimento radicular dos bioindicadores alface, cebola e repolho;
- b) os menores valores dos IGs registrados nos bioensaios com *Allium cepa* L. (cebola) preconizam que a mesma seja mais sensível aos efeitos da MO, pH e o Cu na comparação com os bioindicadores *Lactuca sativa* L (alface) e *Brassica oleracea* (repolho).

### **6.2.3 Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade**

- a) os dados do exame de citotoxicidade registram que houve uma redução de 35.5% do IM do processo II, em relação ao controle, ensejado pelo efeito tóxico do Al e do Cu presentes na composição da CCA do processo II, em maiores concentrações, na comparação com os processos I e III;
- b) os achados do exame de genotoxicidade indicaram que as frequências de AC não foram estatisticamente significativas, em comparação com o controle, sugerindo, que na composição da CCA não estão presentes elementos bioativos com propriedades genotóxicas, de ação aneugênicas e clastogênicas sobre o bioindicador cebola.

#### **6.2.4. Gerar informações que possam contribuir para definição de alternativas estratégicas de uso sustentável da CCA e no aumento da competitividade da indústria arroseira.**

Pretende-se que a abordagem sobre o potencial toxicológico da CCA poderá contribuir na compreensão dos mecanismos de interação com o meio ambiente, bem como, na definição de alternativas de destino final adequado e sustentáveis.

### **7. Sugestões futuras.**

Após este estudo podemos recomendar que a queima da casca de arroz para fins energéticos, quando feita de forma controlada, é uma alternativa que pode contribuir na melhoria da imagem e competitividade da indústria arroseira.

Para tanto, e considerando a importância de se aprofundar os conhecimentos e compreensão dos mecanismos de interação da CCA com o ambiente, pressuposto necessário para se desenvolver estratégias de manejo e uso mais competitivo da casca de arroz e cinza de casca de arroz, recomendamos para trabalhos futuros os temas a seguir descritos.

- a) Executar estudos que visem o desenvolvimento de um processo de queima, de casca de arroz, controlado com vistas a se obter uma CCA padronizada, de melhor qualidade e valor agregado;
- b) Ampliar as investigações na perspectiva de tornar a cinza de casca de arroz um fertilizante de uso agrícola;
- c) Aprofundar os estudos de longo prazo a fim de avaliar a capacidade suporte do solo em reciclar a cinza de casca de arroz e os possíveis efeitos dos ETs sobre os ecossistemas;
- d) Desenvolver estudos com objetivo de melhorar o processo de armazenagem, transporte e incorporação da CCA no solo.

## 8. Referências bibliográficas

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 10004, 2004**: Resíduos sólidos - Classificação, Rio de Janeiro, 2004, 77 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 15350:2012**: Ecotoxicologia aquática, Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea, Rio de Janeiro, 2012.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 15537:2014**: Ecotoxicologia terrestre - Toxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas (Lumbricidae). Rio de Janeiro, 2012.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 15.499: 2016**: Ecotoxicologia aquática, Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes; Rio de Janeiro, 2016, 23 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 12.713:2016**: Ecotoxicologia aquática, Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2016, 23 p.

ABUBACKER, M.N. e SATHYA, C. Genotoxic Effect of Heavy Metals Cr, Cu, Pb and Zn using *Allium cepa* L. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, Vol. 14 (3), p.1181-1186, 2017.

ACHARY, V. M. M.; PARINANDI, N. L.; PANDA, B. B. Aluminum Induces Oxidative Burst, CellWall NADH Peroxidase Activity, and DNA Damage in Root Cells of *Allium cepa* L. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 53, p. 550-560, 2012.

ALVES. L. R.; REIS. A. R. dos; GRATÃO. P. L. Heavy metals in agricultural soils: from plants to our daily life (a review). **Científica**, Jaboticabal, v.44, n.3, p.346-361, 2016.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, sixteenth ed. Arlington, USA. 1995.

ANEEL - AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA. Matriz Energética do Brasil. **Banco de informações de geração** Disponível em: <http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/OperacaoGeracaoTipo.asp?tipo=13&ger=Combustivel&principal=Biomassa> acesso em setembro de 2016.

ANGEL, J. M.; VÁSQUEZ, T. G. P.; JUNKES, J. A.; HORZA, D. Caracterização de cinza obtida por combustão de casca de arroz em reator de leito fluidizado. **Química Nova**, Vol. 32, Nº. 5, p. 1110-1114, 2009.

ARENZON, A; PEREIRA NETO, T. J.; GERBER, W. **MANUAL SOBRE TOXICIDADE EM EFLUENTES INDUSTRIAIS**. Federação das Indústrias do

Rio Grande do Sul – FIERGS. Conselho de Meio Ambiente – CODEMA. Porto Alegre. 2011.

ATHANÁSIO, C. G.; PRÁ D. e RIEGER. A. Water Quality of Urban Streams: The *Allium cepa* Seeds/Seedlings Test as a Tool for Surface Water Monitoring. **Scientific World Journal**. Article ID 391367, 7 p. Volume. 2014.

BAGATINI, M. D.; SILVA . A. C. F. Da; TEDESCO. S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 17(3): 444-447, 2007.

BARBÉRIO, A; BARROS, L.; VOLTOLINI. J. C.; MELLO. M. L. S. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the River Paraíba do Sul, in Brazil, with the *Allium cepa* L. test. **Brazilian Journal of Biology**, 69 (3): p. 837-842, 2009.

BARBÉRIO, A; VOLTOLINI. J. C.; MELLO. M. L. S. Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test. **Ecotoxicology**, 20: p. 927-935, 2011.

BAZARGAN, A.; BAZARGAN, M.; MCKAY, G. Optimization of rice husk pretreatment for energy production. **Renewable Energy**. 77, p. 512-520, 2015.

BELO, Sara Rodrigues Santos. **Avaliação de fitotoxicidade através de *Lepidium sativum* no âmbito de processos de compostagem**. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente na Especialidade de Tecnologia e Gestão do Ambiente) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.

BERNARDES, P. M. et al. Toxicity of Difenoconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. **Water Air Soil Pollut**. p. 207-226, 2015.

BETTIOL, C. et al. Assessment of phenolic herbicide toxicity and mode of action by different assays. **Environmental Science and Pollution Research**, 23, p. 7398-7408, 2016.

BHAT, S. A.; SINGH, J.; VIG, A. P. Vermistabilization of sugar beet (*Beta vulgaris* L) waste produced from sugar factory using earthworm *Eisenia fetida*: Genotoxic assessment by *Allium cepa* test. **Environmental Science and Pollution Research**, 22, p. 11236-11254, 2015.

BHERING, L. L. Rbio: A Tool For Biometric And Statistical Analysis Using The R Platform. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.17, p.187-190, 2017.

BIANCHI, Jaqueline. **Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida malation, utilizando os sistemas teste de *allium cepa* L. e células de mamíferos**. 2008. 152 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, Rio Claro, São Paulo, 2008.

BILO, F. et al. Research Article Evaluation of Heavy Metals Contamination from Environment to Food Matrix by TXRF: The Case of Rice and Rice Husk. **Journal of Chemistry**, p. 12, 2015.

BUSCHLE, Brenda Novaes. **Valores de referência de qualidade para elementos-traço em solos da planície litorânea do Estado do Paraná**. 2013. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo, Área de Concentração Solo e Ambiente) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – Conselho Nacional de Meio Ambiente. **RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357, de 17 de março de 2005**, Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – Conselho Nacional de Meio Ambiente. **RESOLUÇÃO Nº 430, de 13 de maio de 2011**. Correlações: Complementa e altera a Resolução nº 357/2005. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.

BRASIL. MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 6**. Aprovar o Regulamento Técnico do Arroz. 16/-2/2009. Disponível em <<https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1687046295m>> acesso em dezembro de 2016.

BRASIL. MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **REGRAS PARA ANÁLISE DE SEMENTES**. 1º EDIÇÃO. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. Disponível em [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br), acesso em maio de 2014.

CAMARGO, de O. A. **Reações e interações de micronutrientes no solo**. Artigo em Hypertexto, p. 27, 2006. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2006\\_3/micronutrientes/Index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/micronutrientes/Index.htm)>. Acesso em novembro de 2017.

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

CARITÁ, Renata. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da cidade de Santa Gertrudes – SP**. 2010. 187 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas e Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, Rio Claro, 2010.

CASTRO, Flávia Junqueira de. **Avaliação ecotoxicológica dos percolados das colunas de cinza de carvão e de solos com cinza de carvão utilizando *Lactuca sativa* e *Daphnia similis* como organismos testes**. 2013. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CHANDRASEKHAR, S. et al. Review Processing, properties and applications of reactive silica from rice husk-an overview. **Journal of Materials Science**, 38, p. 3159-3168, 2003.

CHEN, Chien-Teh et al. Effects of proline on copper transport in rice seedlings under excess copper stress. **Plant Science**, 166, p.103-111, 2004.

CHEN, G. et al. Production of amorphous rice husk ash in a 500 kW fluidized bed Combustor. **Fuel**, 144, p. 214-221, 2015.

CIGĀRČI, B. H. et al. Genotoxicity of indium tin oxide by Allium and Comet tests. **Cytotechnology**, 67, p. 157-163, 2015.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 4, Safra 2016/17, Décimo levantamento**, Brasília, p. 1-166, 2017.

COSTA, H. M. da et al. Rice husk ash filled natural rubber. Compounds - the use of rheometric data to qualitatively estimate optimum filler loading. **International Journal of Polymeric Materials**, 53, p. 475-497, 2004.

COSTA, Cláudia das Neves. **Biodisponibilidade de metais pesados em solos do rio grande do sul**. 2005. 111 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

COSTA, Herique Rinck da Costa. **Estudo de mistura solo-carvão ativado como barreira reativa no tratamento de lixiviados de resíduos sólidos urbanos**. 2006. 103 f. Dissertação (mestrado em Geologia concentração Gerenciamento Ambiental) - Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2006.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, vol. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COSTA, Cristina Henning da. **Estudo ecotoxicológico para valorização do resíduo produzido no processo de polimento de piso porcelanato na indústria cerâmica**. 2010. 153 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

CORDOVA, Victor Hugo Schaly. **Avaliação da genotoxicidade em *Mus musculus* (Linnaeus) tratados com *Brassica oleracea* L. var. itálica (Plenck) cultivada em área de exploração de carvão**. 2013. 41 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, CRICIÚMA, SC, 2013.

CRUZ, C.D. GENES a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.35, p. 271-276, 2013, Acesso em novembro de 2017: <<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>>.

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. de S.; BOBROWSKI V. L. Sensibilidade de sementes de hortaliças na avaliação da qualidade da água em bioensaios. **Biotemas**, 25 (3), p. 19-27, 2012.

DELLA, V. P. et al. Caracterização de cinza de casca de arroz para uso como matéria-prima na fabricação de refratários de sílica. **Química Nova**, v. 24, n. 6, 778-782, 2001.

DELLA, V. P.; KÜHN. I.; HOTZA D. **Reciclagem de Resíduos Agro-Industriais: Cinza de Casca de Arroz como Fonte Alternativa de Sílica**. *Cerâmica Industrial*, 10 (2), p. 22-25, 2005.

DÖR, Fabianne et al. Ecotoxicologia. In: OGA. Seizi; CAMARGO. Márcia Maria de A. e BATISTUZZO. José Antonio de O. (Org.). **FUNDAMENTOS DE TOXICOLOGIA**. 4º ED. São Paulo: Atheneu Editora, 2014. p. 134-147.

EATON, D. L. e GILBERT, S. G. Princípios de Toxicologia. In: KLAASSEN, C.D. e WATKINS III, J.B. (Org.). **FUNDAMENTOS em TOXICOLOGIA de Casarett e Doull**. 2º Ed. Tradução VAZ, A, J. et al. Revisão Técnica THIESEN, F. e CHASIN, A. A. da M. Porto Alegre - RS: AMGH Editora Ltda. 2012. P. 5 - 17.

ELIAS, Denise. Globalização, agricultura e urbanização no Brasil. **ACTA Geográfica, Boa Vista, Ed. Esp. Geografia Agrária**, p.13-32, 2013. Disponível em: <http://saes2010.ufrr.br/index.php/actageo/article/view/1937/1225>. Acesso em junho de 2014.

EMAMVERDIAN, A. et al. Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response, Review Article. **The Scientific World Journal**, 18 p, 2015.

FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura., 2016. **Seguimiento del Mercado del Arroz de la FAO (SMA)**, v. XIX, edición n. 2, 131 p. 2016.

FERNANDES, Iara Janaína. **Desenvolvimento e caracterização de compósitos de cinza de casca de arroz em matriz epóxi**. 2015. 175 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Engenharia Civil, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2015.

FERNANDES, I. J. et al. Characterization of rice husk ash produced using different biomass. **Fuel**, v.165, p. 351-359, 2016.

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

FISKEJÖ, G. The Allium test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutatation Research**, v. 197, p. 243-260, 1988.

FOLETTTO, E. L. et al. Aplicabilidade das cinzas da casca de arroz. *Química Nova*, v. 28, n. 6, p. 1055-1060, 2005.

FOO, K.Y.; HAMEED B.H. Utilization of rice husk ash as novel adsorbent: A judicious recycling of the colloidal agricultural waste. *Advances in Colloid and Interface Science*, 152, p. 39-47, 2009.

GALLO, M. A. História e Abrangência da Toxicologia. In: KLAASSEN, C.D. e WATKINS III, J.B. (Org.). **FUNDAMENTOS em TOXICOLOGIA** de Casarett e Doull. 2º Ed. Tradução VAZ, A, J. et al. Revisão Técnica THIESEN, F. e CHASIN, A. A. da M. Porto Alegre - RS: AMGH Editora Ltda, 2012.1-4 p.

GAIVIZZO, Larisa Ho Bech. **Fracionamento e mobilidade de metais pesados em solo com descarte de Iodo industrial**. 2001. 125 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. RS. Brasil, 2001.

GERBER, M.; LUCIA, T.; CORRÊA, L. B.; PEREIRA NETO, J. E.; CORRÊA, É. K. Phytotoxicity of effluents from swine slaughterhouses using lettuce and cucumber seeds as bioindicators. *Science of the Total Environment*, v. 592, p. 86-90, 2017.

GERHARDT, Tatiana Engel e SILVEIRA, Denise Tolfo (org.). **Métodos de pesquisa**. **Universidade Aberta do Brasil – UAB/UFRGS** Coordenador: Luis Alberto Segovia Gonzalez. Curso de Graduação Tecnológica Planejamento e Gestão para o Desenvolvimento Rural. Coordenação Acadêmica: Lovois de Andrade Miguel Coordenação Operacional: Eliane Sanguiné. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2009.120 p.

GIL, Antônio Carlos. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 6ª ed. São Paulo: Atlas, 2017. 192 p.

GIULIO, R. T. de e NEWMAN, M. C. Ecotoxicologia. In: KLAASSEN, C.D. e WATKINS III, J.B. (Org.). **FUNDAMENTOS em TOXICOLOGIA de Casarett e Doull**. 2º Ed. Tradução VAZ, A, J. et al. Revisão Técnica THIESEN, F. e CHASIN, A. A. da M. AMGH Editora Ltda. Porto Alegre – RS, 2012. p. 391-399.

GOMES, G. M. F. et al. Aspects for a cleaner production approach for coal and biomass use as a decentralized energy source in southern Brazil. *Journal of Cleaner Production*, 47, p. 85-95, 2013.

GONÇALVES, M. R. F.; BERGMANN, C. P. Thermal insulators made with rice husk ashes: Production and correlation between properties and microstructure. *Construction and Building Materials*, 21, p. 2059-2065, 2007.

GOUJON, E. et al. Genotoxicity of sulcotrione pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristema. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 113, p. 47-54, 2014.

GRANT, W. F. **The presente status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens**. *Mutat. Res - Fund. Mol. Mechan. Mutagen*. 1994. p. 175 - 185.

GREGUS, Z. Mecanismos de Toxicidade. In: KLAASSEN, C.D. e WATKINS III, J.B. (Org.). **FUNDAMENTOS em TOXICOLOGIA de Casarett e Doull**. 2º Ed. Tradução VAZ, A, J. et al. Revisão Técnica THIESEN, F. e CHASIN, A. A. da M. AMGH Editora Ltda. Porto Alegre - RS, 2012. p. 21 - 46.

GUARATINI, T. et al. Toxicologia Ambiental - Ecotoxicologia. Parte 2. In: KLAASSEN, C.D. e WATKINS III, J.B. (Org.). **Fundamentos de TOXICOLOGIA**. 3º Ed. São Paulo: Atheneu Editora. São Paulo, 2008, p. 125-141.

GUILHERME, L. R. G. et al. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. **Tópicos Ciências do Solo**, 4, p. 345-390, 2005.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. de. **Como observar cromossomos**: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana. Editora, FUNPEC - Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2002.

GRYCZAK, M. **Compósito sustentável casca de arroz/resina de óleo de mamona de baixa densidade**. 2016. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2016.

GUIDOTTE, Rosane Maria Morales. **Métodos de análise de silício, fósforo, potássio, cálcio e magnésio disponíveis às plantas na cinza de casca de arroz**. 2017. 99 f. Tese (Doutorado em Manejo e Conservação do Solo e da Água) - Faculdade de Agronomia Eliceu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

HACKBARTH, Fabíola Vignola. **Remoção de metais de efluentes petroquímicos utilizando biomassa de macroalga marinha *pelvetia canaliculata* como adsorvente**. 2014. 216 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.

HACON, S. de S. AVALIAÇÃO E GESTÃO DE RISCO ECOTOXICOLÓGICO À SAÚDE HUMANA. In: AZÉVEDO, F. A. de e CHASIN, A. A. da M. **AS BASES TOXICOLÓGICAS DA ECOTOXICOLOGIA**. São Carlos, RiMA, InterTox. São Paulo, 2004, p. 245 - 322.

HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, A. Assessing toxicity of copper, cadmium and chromium levels relevant to discharge limits of industrial effluents into inland surface waters using common onion, *Allium cepa* L. bioassay. **Bull Environ Contam Toxicol**, 94, p.199-203, 2015.

HERNÁNDEZ, J. R. et al. Revisión Propuesta de una nueva clasificación de los oligoelementos para su aplicación en nutrición, oligoterapia, y otras estrategias terapêuticas. **Nutrición Hospitalaria**, 31 (3), p. 1020-1033, 2015.

HOSHINA, Márcia Miyuki. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxico e mutagênicos de efluentes de refinaria de petróleo, por meio dos sistemas testes de *Allium cepa* e *Oreochromis Niloticus***. 2005. 173 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Biologia Celular) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista "JÚLIO DE MESQUITA FILHO", Rio Claro, 2005.

HOLAN, Ida Øverås. **Toxic and genotoxic effects of fast pyrolysis oils generated from three different feedstocks evaluated in na *Allium cepa* chromosome aberration assay.** 2014. 120 f. This master's project (in Environmental Toxicology) - Department of Biology, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, 2014.

HUGEN, Camila. **Valores de referência para teores de Cr, Cu, Ni, Pb e Zn em solos do estado de santa catarina.** 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Manejo do Solo) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2010.

IQBAL, M. *Vicia faba* bioassay for environmental toxicity monitoring: A review. **Chemosphere**, 144, p. 785-802, 2016.

IRGA - Instituto Rio Grandense do Arroz, **Dados da Safra ano 2015/2016**, 1 p., 2017. Disponível em: <[http://www.irga.rs.gov.br/upload/20170713143631produtividade\\_municipios\\_safra\\_16\\_17\\_final.pdf](http://www.irga.rs.gov.br/upload/20170713143631produtividade_municipios_safra_16_17_final.pdf)>. Acesso em janeiro de 2017.

IŞERI, Ö. D. et al. Copper-induced oxidative damage, antioxidant response and genotoxicity in *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Cucumis sativus* L. **Plant Cell Reports**, 30, p.1713-1721, 2011.

ISLABÃO, Gláucia Oliveira. **Uso da cinza de casca de arroz como corretivo e condicionador do solo.** 2013, 84 f. Dissertação (Mestrado Ciências dos Solos) - Faculdade de Agronomia Eliceu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

JIANG, H. et al. Gasification of rice husk in a fluidized-bed gasifier without inert additives. **Industrial e Engineering Chemistry Research**, 42, p. 5745-5750, 2003.

JIANG, Z. et al. Determination of Pb genotoxic effects in *Allium cepa* root cells by fluorescent probe, microtubular immunofluorescence and comet assay. **Plant and Soil**, 383, p. 357-372, 2014.

KHAN, A. et al. The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, 22, p. 13772-13799, 2015.

LAKATOS, E. M.; MARCONI, M. A. **Metodologia do trabalho científico: procedimentos básicos, pesquisa bibliográfica, projeto e relatório, publicações e trabalhos científicos.** São Paulo: Atlas, 2007. 228 p.

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

LIM, J. S. et al. A review on utilisation of biomass from rice industry as a source of renewable energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 16, p. 3084-3094, 2012.

LIM, J. S. et al. Towards an integrated, resource-efficient rice mill complex. **Resources, Conservation and Recycling**, 75, p. 41-51, 2013.

LIM, J. S. et al. Synthesis of a sustainable integrated rice mill complex. **Journal of Cleaner Production**, 71, p. 118-127. 2014.

LIMA, C. V.S.; HOEHNE, L.; MEURER, E. J. Cádmio, cromo e chumbo em arroz comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 45, n. 12, p. 2164-2167, 2015.

LOHA, C et al. Energy generation from fluidized bed gasification of rice husk. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, 5, p. 043111-1-043111-10, 2013.

LOPES, Paulo Renato Matos. **Biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante pela aplicação de diferentes soluções de surfactante químico e biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI**. 2014. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

LOPES, E. R. et al. Caracterização elementar da casca de arroz e suas cinzas por MIP OES após decomposição ácida com sistema de refluxo. **Química Nova**, v. 40, n. 9. p.1009-1017, 2017.

LUNA, J. M. et al. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 102, p. 202-209, 2013.

MAGALHÃES, Angélica Margaret. **Interação entre sistema agroindustriais, modelos alimentares e saúde da população: Estudo aplicado ao arroz**. 2010. 185 f. Tese (Doutorado em Agronegócios) - Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MARCONDES, Ayrton César. **Ecologia**. 3<sup>o</sup> Edição. Atual Editora Ltda. São Paulo, 1992. 210 p.

MARTINS, C. A. da S. A dinâmica de metais-traço no solo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.17, n.3-4, p.383-391, 2011.

MASOOD, F.; MALIK. A. Mutagenicity and genotoxicity assessment of industrial wastewaters. **Environmental Science and Pollution Research**, 20, p. 7386-7397, 2013.

MAZZEO, D. E. C. et al. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecological Indicators**, 56, p. 60-69, 2015.

MENDES, P. M. et al. Phytotoxicity as an indicator of stability of broiler production residues. **Journal of Environmental Management**, v. 167, p. 156-159, 2016.

MESI, A.; KOPLIKU. D. Cytotoxic and Genotoxic Potency Screening of Two Pesticides on *Allium cepa* L. **Procedia Technology**, 8, p. 19-26, 2013.

MORAES, C. A. M. et al. Review of the rice production cycle: Byproducts and the main applications focusing on rice husk combustion and ash recycling. **Waste Management e Research**, v. 32(11), p. 1034-1048, 2014.

MOREIRA, Cindy Silva. **Adsorção competitiva de cádmio, cobre, níquel e zinco em solos**. 2004. 120 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração: Solo e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiros", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MOREIRA, Fátima M.S. e SIQUEIRA, José Oswaldo. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2ª edição atualizada. Editora UFA. Universidade Federal de Lavras. Lavras. MG. 2006. 730 p.

MIRITZ, P. D.; WAQUIL, L. D. Diferenciação e diversificação na agroindústria arrozeira do Rio Grande do Sul. **Organizações Rurais e Agroindustriais**, v. 14, n. 2, p. 190-198, 2012.

NASCIMENTO, G. C. et al. Caracterização físico-química da cinza de casca de arroz oriunda do processo termelétrico do sul de Santa Catarina - Brasil. **Ciência e Natura**, v. 37 n. 4, p. 634-640, 2015.

OECD - Organização de Cooperação Econômica e Desenvolvimento. **LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES. 208**. Adoptée. 19, juillet, 2006. Disponível em <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070066-en.pdf?expires=1523495113&id=id&accname=guest&checksum=B82F971A72E46C4384C50B383D883107> .Acesso em março de 2015.

OGA, Seizi; CAMARGO, Márcia Maria de A. e BATISTUZZO, José Antonio de O. **FUNDAMENTOS DE TOXICOLOGIA**, 4ª ED. Atheneu Editora,. São Paulo. 2014. pg. 704.

OLAMIDE, O. et al. Characterization of Rice Husk via Atomic Absorption Spectrophotometer for Optimal Silica Production. **International Journal of Science and Technology**, v. 2 n.4, p. 210-213, 2012.

OLIVEIRA, R. C. B. de; MARINS, R. V. Dinâmica de metais-traço em solo e ambiente sedimentar estuarino como um fator determinante no aporte desses contaminantes para o ambiente aquático: Revisão. **Revista Virtual Química** 3 (2), p. 88-102, 2011.

ONU - *Organização das Nações Unidas*. **O relatório "Perspectivas da População Mundial: Revisão de 2012"**, publicado em 13 de junho de 2013, Disponível em : <<http://www.onu.org.br/populacao-mundial-deve-atingir-96-bilhoes-em-2050-diz-novo-relatorio-da-onu/>>, Acesso em janeiro de 2014.

ORESTE, E. Q. et al. New design of cold finger for sample preparation in open system: Determination of Hg in biological samples by CV-AAS. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 5–9, 2013.

OZAKCA, D. U.; SILAH, H. Genotoxicity effects of Flusilazole on the somatic cells of *Allium cepa*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 107, p. 38-43. 2013.

ÖZKARA, A; AKYIL, D; EREN, Y; ERDOĞMUS, S. F. Potential cytotoxic effect of Anilofos by using *Allium cepa* assay. **Cytotechnology**, 67, p. 783-791, 2015.

PAKRASHI, S. et al. In vivo genotoxicity assessment of titanium dioxide nanoparticles by *Allium cepa* root tip assay at high exposure concentrations. **Plos one**, v. 9,12 p. 2014.

PALMIERI, M. J. et al. Cytogenotoxic effects of spent pot liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water Air Soil Pollut**, 227:156,10 p. 2016.

PANDEY, H.; KUMAR, V.; ROY, B. K. Assessment of genotoxicity of some common food preservatives using *Allium cepa* L. as a test plant. **Toxicology Reports**, 1, p. 300-308, 2014.

PATHIRATNE, A.; HEMACHANDRA, C. K.; SILVA, N. de Efficacy of *Allium cepa* test system for screening cytotoxicity and genotoxicity of industrial effluents originated from different industrial activities. **Environmental Monitoring and Assessment**, 187:730,12 p., 2015.

PEDIAL, Paula Regina. **Qualidade, heterogeneidade espacial e biodisponibilidade de metais no sedimento de um reservatório tropical urbano eutrofizado, Reservatório Guarapiranga - SP**. 2008. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Ecologia de Ecossistemas Terrestres e Aquáticos) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PERTUSATTI, Jonas. **Aspectos físico-químicos da protonação e desprotonação da superfície do ácido húmico**. 2007. 48 f. Dissertação (mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de Brasília, 2007.

PODE, R. Potential applications of rice husk ash waste from rice husk biomass power plant. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 53, p. 1468-1485, 2016.

POUEY, T. F. **Beneficiamento da cinza de casca de arroz residual com vistas à produção de cimento composto e/ou pozolânico**. 2006. 345 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Escola de Engenharia, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PRASARA-A, J.; GHEEWALA., S. H. Sustainable utilization of rice husk ash from power plants: A review. **Journal of Cleaner Production**, xxx, p. 1-9, 2016.

QUESADA, D. E et al. Characterization and evaluation of rice husk ash and wood ash in sustainable clay matrix bricks. **Ceramics International**, 43, p. 463-475, 2017.

QIN, R. Effects of aluminum on nucleoli in root tip cells and selected physiological and biochemical characters in *Allium cepa* var. *agrogarum* L. **BMC Plant Biology**, 10:225, p. 1-11, 2010.

QIN, R. et al. Proteomic analysis of *Allium cepa* var. *agrogarum* L. roots under copper stress. **Plant Soil**, 401:197, p. 197-212, 2016,

RADIĆ, S. et al. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, 408, p. 1228-1233. 2010.

RAMOS, N. F. L. **Avaliação da fitotoxicidade de correctivos orgânicos**. 2016. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente)- Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, PT. 2016.

RAYMUNDO, L. M. **Desenvolvimento de uma planta laboratorial de pirólise rápida em leito fluidizado aplicado à casca de arroz**. 2016. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

RIGON, Magali Rejane. **Avaliação ambiental do uso da casca de arroz como biomassa para fins energéticos e dos coprodutos cinza aplicada ao concreto**. 2015. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2015.

RIO GRANDE DO SUL - Secretaria do Ambiente e Desenvolvimento Sustentável - Conselho Estadual do Meio Ambiente. **Resolução Nº129/2006**. Dispõe sobre a definição de Critérios e Padrões de Emissões para Toxicidade de Efluentes Líquidos lançados em águas superficiais do Estado do Rio Grande do Sul. Disponível em <[http://www.laboratoriogreenlab.com.br/images/legislacoes/CONSEMA\\_n128\\_2006.pdf](http://www.laboratoriogreenlab.com.br/images/legislacoes/CONSEMA_n128_2006.pdf)>. Acesso em junho de 2015.

SAIDELLES, F. L. F. et al. Casca de arroz carbonizada como substrato para produção de mudas de tamboril-da-mata e garapeira. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, suplemento 1, p. 1173-1186, 2009.

SANDRINI, W. C. **Alterações químicas e microbiológicas do solo decorrentes da adição de cinza de casca de arroz**. 2010, 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, área do conhecimento: Solos) - Faculdade de Agronomia Eliceu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

SANTELLI, M. M. e SIVIERO, F.S. Mutagênese e Carcinogênese. In: OGA, S.; CAMARGO, M.M de A. e BATISTUZZO, J. A. de O. **Fundamentos de Toxicologia**. 4º edição. São Paulo. Atheneu Editora. 2014.71 p.

SALLES, F. J. et al. Cytotoxic and genotoxic assessment of surface water from São Paulo State, Brazil, during the rainy and dry seasons. **Ecotoxicology**, 25, p. 633-645, 2016.

SAS®, SAS institute, The SAS system for windows. Version 9.0. Cary, NC. 2002.

SHAFIE, S. M. A review on paddy residue based power generation: Energy, environment and economic perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 59, p. 1089-1100, 2016.

SILVA, Alison Alexandrino Lima da. **Avaliação da fitotoxicidade do lodo de curtume compostado através de bioensaios**. 2014. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2014.

SILVA, Valéria de Cássia. **Avaliação do potencial genotóxico de matrizes ambientais sólidas contaminadas uso da espécie *Vicia faba* como indicadora da qualidade ambiental**. 2014. 153 f. Tese (Doutora em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2014.

SOLTANI, N. et al. Review on the physicochemical treatments of rice husk for production of advanced materials. **Chemical Engineering Journal**, 264, p. 899-935, 2015.

SOUZA, V. L. B. et al. Biodisponibilidade de metais-traço em sedimentos: uma Revisão. **Brazilian Journal of Radiation Sciences**, 03-1A, p. 01-13, 2015.

SOUZA, M. J. B. de. Toxicidade dos metais pesados. 2016, Disponível em **ResearchGate**, <<https://www.researchgate.net/publication/311559332>>, Acesso em agosto de 2017.

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

TIQUIA, S. M. Reduction of compost phytotoxicity during the process of decomposition. **Chemosphere**, 79, p. 506-512, 2010.

THAKKAR, M. et al. In bed catalytic tar reduction in the autothermal fluidized bedgasification of rice husk: Extraction of silica, energy and cost analysis. **Industrial Crops and Products**, 87, p. 324-332, 2016.

VINHAL-FREITAS I. C. et al. Adsorção e dessorção de metais no solo e coeficientes de isotermas de Freundlich e Langmuir. **Agropecuária Técnica**, v. 31, n. 2, p. 153-163, 2010.

YILDIZ, M. et al. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, 75, p. 934-938, 2009.

ZUCCONI, F. et al. Evaluating toxicity of immature compost. **BioCycle, Emmaus**, v.22, p. 27-29, 1981.

ZANELLO S. **Caracterização mineralógica e avaliação dos teores de Cr, Ni, Cu, Zn e Pb dos solos do entorno do aterro sanitário da Caximba em Curitiba (PR)**. 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Departamento de Solos e Engenharia Agrícola do Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

## APÊNDICE 1

Tabelas de dados dos cálculos do teor de umidade (matéria seca) (T. 105 °C) e matéria orgânica (T. 105 °C - 550 °C.) da cinza de casca de arroz procedentes de três diferentes processos de queima.

**Tabela 1 - Processo I**

Amostra	P/cadinho	P/amostra	P/105°C	P/Mufla 550°C	U (%)	M.O (%)
I-Z-1	40,505	2,004	42,4719	42,1508		
	37,5768	2,0123	39,552	39,2292		
	39,7088	2,0095	41,6795	41,3441	1,87	18,12
I-Z-2	31,352	2,0052	33,3349	33,0586		
	41,4173	2,0099	43,3993	43,1202		
	39,2697	2,0075	41,2446	40,961	1,35	15,30
I-Z-3	40,5028	2,1862	42,6634	42,3053		
	37,5753	2,0065	39,5578	39,2069		
	39,707	2,1416	41,8272	41,4412	1,08	19,46
I-Z-4	39,2667	2,0302	42,6634	42,3053		
	39,9092	2,0026	39,5578	39,2069		
	41,4189	2,0317	41,8272	41,4412	1,62	19,88
I-Z-5	32,2152	2,0516	34,2333	33,8778		
	39,8721	2,0148	41,8505	41,4892		
	37,7718	2,0313	39,7649	39,4197	1,77	19,19
<b>MÉDIA</b>					<b>1,54174</b>	<b>18,39</b>

**Tabela 2 - Processo II**

Amostra	P/cadinho	P/amostra	P/105°C	P/Mufla 550°C	U (%)	M.O (%)
II-Z-1	37,5418	2,0383	39,5364	39,3348		
	40,6048	2,0073	42,5694	42,3678		
	39,8789	2,003	41,8389	41,6376	2,13	7,06
II-Z-2	41,4169	2,0091	43,3837	43,149		
	40,5048	2,0165	42,4754	42,2405		
	37,117	2,0492	39,118	38,8816	2,24	7,46
II-Z-3	39,1264	2,0083	41,0958	40,8736		
	38,8309	2,0175	40,8057	40,579		
	39,2677	2,0016	41,2276	41,0074	2,04	7,63
II-Z-4	37,5764	2,0096	39,548	39,3441		
	37,2027	2,0228	39,1872	38,978		
	32,1919	2,0113	34,1646	33,9576	1,9	7,15
II-Z-5	41,4244	2,0477	43,4228	43,1764		
	37,5853	2,1116	39,6472	39,3925		
	32,1922	2,0099	34,1582	33,9148	2,31	7,52
<b>MÉDIA</b>					<b>2,12</b>	<b>7,94</b>

**Tabela 3 - Processo III**

<b>Amostra</b>	<b>P/cadinho</b>	<b>P/amostra</b>	<b>P/105°C</b>	<b>P/Mufla 550°C</b>	<b>U (%)</b>	<b>M.O (%)</b>
II-Z-1	39,1277	2,0096	41,1151	41,0002		
	39,877	2,0112	41,8658	41,75		
	40,5187	2,0209	42,515	42,3877	1,14	12,13
II-Z-2	38,8469	2,0082	40,8332	40,712		
	37,2236	2,0091	39,2135	39,0812		
	39,2809	2,0093	41,2686	41,1347	1,03	13,86
II-Z-3	37,152	2,1908	39,3193	39,1696		
	32,2279	2,0492	34,256	34,1215		
	37,588	2,1076	39,6703	39,5394	1,09	13,14
II-Z-4	32,1975	2,0587	34,2319	34,1031		
	37,5525	2,0114	39,5449	39,4262		
	39,7288	2,0218	41,7264	41,6051	1,1	12,15
II-Z-5	40,6263	2,1664	42,7675	42,6309		
	41,4525	2,1552	43,5878	43,4466		
	39,9264	2,0403	41,9464	41,811	1,02	14,38
<b>MÉDIA</b>					<b>1,08</b>	<b>13.13</b>

## APÊNDICE 2

Tabelas com os valores médios das triplicatas, em  $\text{mg kg}^{-1}$ , das análises dos elementos traços presentes nas cinzas de casca de arroz provenientes de três diferentes processos de queima.

### Processo I

Amostras	Al	Cd	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Ti
PI-1	103,90	6,64	33,65	614,80	1098,00	597,00	1,29	382,20	360,70	605,20
PI-2	105,00	6,64	33,25	462,90	1083,00	581,60	1,29	371,70	353,90	580,40
PI-3	102,90	6,64	33,48	451,00	1066,00	568,30	1,29	345,40	348,60	554,60
PI-4	105,60	6,64	33,42	477,80	1001,00	537,10	1,29	330,50	350,40	541,40
PI-5	105,80	6,64	33,62	418,30	988,50	514,60	1,29	320,60	340,90	534,10
<b>Médias</b>	<b>104,64</b>	<b>6,64</b>	<b>33,48</b>	<b>484,96</b>	<b>1047,30</b>	<b>559,72</b>	<b>1,29</b>	<b>350,08</b>	<b>350,90</b>	<b>563,14</b>
LD	0,39	6,64	0,40	2,05	0,22	0,31	1,29	4,99	12,17	12,45

### Processo II

Amostras	Al	Cd	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Ti
PII-1	201,50	6,64	92,01	927,90	2657,00	1536,00	168,00	1675,00	12,17	502,40
PII-2	205,60	6,64	91,21	919,20	2605,00	1533,00	170,70	1674,00	12,17	497,50
PII-3	184,40	6,64	81,26	864,90	2696,00	1196,00	170,70	1511,00	12,17	495,00
PII-4	212,50	6,64	93,32	906,50	2639,00	1572,00	172,90	1693,00	12,17	499,60
PII-5	177,70	6,64	81,91	843,30	2670,00	1218,00	175,00	1501,00	12,17	483,60
<b>Médias</b>	<b>196,34</b>	<b>6,64</b>	<b>87,94</b>	<b>892,36</b>	<b>2653,40</b>	<b>1411,00</b>	<b>171,46</b>	<b>1610,80</b>	<b>12,17</b>	<b>495,62</b>
LD	0,39	6,64	0,40	2,05	0,22	0,31	1,29	4,99	12,17	12,45

### Processo III

Amostras	Al	Cd	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Ti
PIII-1	74,14	6,64	36,49	332,10	674,50	285,40	1,29	280,10	12,17	500,20
PIII-2	76,78	6,64	36,07	359,40	618,70	262,50	1,29	267,30	12,17	489,70
PIII-3	70,95	6,64	36,26	355,60	655,50	271,70	1,29	275,00	12,17	484,30
PIII-4	72,82	6,64	36,16	308,80	617,70	261,00	1,29	260,10	12,17	477,90
PIII-5	72,38	6,64	36,43	294,90	626,70	260,00	1,29	258,00	12,17	470,30
<b>Médias</b>	<b>73,41</b>	<b>6,64</b>	<b>36,28</b>	<b>330,16</b>	<b>638,62</b>	<b>268,12</b>	<b>1,29</b>	<b>268,10</b>	<b>12,17</b>	<b>484,48</b>
LD	0,39	6,64	0,40	2,05	0,22	0,31	1,29	4,99	12,17	12,45

### APÊNDICE 3

Tabelas com os valores médios das triplicatas dos IGs% das sementes dos bioindicadores alface, cebola e repolho e o IM% do bioindicador cebola tratadas com extrato aquoso das cinzas de casca de arroz provenientes de três diferentes processos de queima e do tratamento controle.

**Tabela 1 - Processo I**

Amostras	IG e IM das sementes tratadas com extrato aquoso de CCA					IM tratamento controle	
	IG-a	IG-c	IG-r	IMc	AC	IM	AC
PI - 1	139,70	92,39	137,85	3,62	0,22	4,60	0,20
PI - 2	141,63	117,55	103,05	3,91	0,26	3,86	0,33
PI - 3	165,29	90,20	195,07	3,53	0,28	4,33	0,13
PI - 4	198,10	75,33	57,98	3,33	0,15	4,13	0,20
PI - 5	156,10	130,67	163,16	4,17	0,22	4,53	0,20
<b>Médias</b>	<b>160,16</b>	<b>101,23</b>	<b>131,42</b>	<b>3,71</b>	<b>0,23</b>	<b>4,29</b>	<b>0,21</b>

**Tabela 2 - Processo II**

Amostras	IG e IM das sementes tratadas com extrato aquoso de CCA					IM tratamento controle	
	IG-a	IG-c	IG-r	IMc	AC	IM	AC
PII - 1	68,93	43,86	58,96	2,88	0,15	4,60	0,20
PII - 2	76,10	25,51	41,62	2,75	0,24	3,86	0,33
PII - 3	77,20	36,25	51,05	3,02	0,31	4,33	0,13
PII - 4	74,21	24,19	28,71	2,51	0,24	4,13	0,20
PII - 5	21,84	24,58	7,39	2,75	0,31	4,53	0,20
<b>Médias</b>	<b>63,66</b>	<b>30,88</b>	<b>37,55</b>	<b>2,78</b>	<b>0,25</b>	<b>4,29</b>	<b>0,21</b>

**Tabela 2 - Processo II**

Amostras	IG e IM das sementes tratadas com extrato aquoso de CCA					IM tratamento controle	
	IG-a	IG-c	IG-r	IMc	AC	IM	AC
PIII - 1	127,86	85,54	127,89	3,62	0,22	4,60	0,20
PIII - 2	92,48	82,27	61,61	3,68	0,24	3,86	0,33
PIII - 3	71,24	116,37	69,57	3,77	0,13	4,33	0,13
PIII - 4	90,69	117,65	111,53	3,88	0,15	4,13	0,20
PIII - 5	90,02	66,61	172,96	3,02	0,17	4,53	0,20
<b>Médias</b>	<b>94,46</b>	<b>93,69</b>	<b>108,71</b>	<b>3,59</b>	<b>0,18</b>	<b>4,29</b>	<b>0,21</b>

## APÊNDICE 4

**Tabela 1 - Matriz de correlações de Pearson ( $p < 0,05$ ) das variáveis Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Ti, U, CT, pH, das CCA de diferentes processos de incineração e os IG, IM e AC dos bioindicadores sementes de alface - *Lactuca sativa* L, cebola - *Allium cepa* L. e repolho - *Brassica oleracea* L submetidas ao tratamento do extrato aquoso das CCA por 144 horas.**

	Al	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Ti	U	CT	pH	IGa	IGc	IGr
<b>Al</b>	1,00														
<b>Cu</b>	0,96 <.0001	1,00													
<b>Fe</b>	0,98 <.0001	0,94 <.0001	1,00												
<b>Mg</b>	0,98 <.0001	0,96 <.0001	0,98 <.0001	1,00											
<b>Mn</b>	1,00 <.0001	0,95 <.0001	0,98 <.0001	0,98 <.0001	1,00										
<b>Mo</b>	0,96 <.0001	0,99 <.0001	0,95 <.0001	0,98 <.0001	0,95 <.0001	1,00									
<b>Na</b>	0,98 <.0001	0,99 <.0001	0,96 <.0001	0,99 <.0001	0,97 <.0001	0,99 <.0001	1,00								
<b>Ni</b>	-0,27 0,33	-0,53 0,04	-0,24 0,38	-0,32 0,24	-0,27 0,34	-0,50 0,06	-0,45 0,09	1,00							
<b>Ti</b>	-0,12 0,67	-0,37 0,17	-0,04 0,88	-0,17 0,55	-0,10 0,73	-0,35 0,21	-0,28 0,31	0,90 <.0001	1,00						
<b>U</b>	0,87 <.0001	0,79 0,00	0,91 <.0001	0,88 <.0001	0,87 <.0001	0,82 0,00	0,84 0,00	-0,06 0,83	0,07 0,80	1,00					
<b>CT</b>	-0,71 0,00	-0,87 <.0001	-0,69 0,00	-0,75 0,00	-0,71 0,00	-0,85 <.0001	-0,83 0,00	0,83 0,00	0,62 0,01	-0,51 0,05	1,00				
<b>pH</b>	-0,88 <.0001	-0,97 <.0001	-0,86 <.0001	-0,92 <.0001	-0,87 <.0001	-0,98 <.0001	-0,96 <.0001	0,66 0,01	0,51 0,05	-0,71 0,00	0,93 <.0001	1,00			
<b>IGa</b>	-0,47 0,08	-0,67 0,01	-0,48 0,07	-0,54 0,04	-0,47 0,08	-0,67 0,01	-0,62 0,01	0,85 <.0001	0,70 0,00	-0,35 0,21	0,87 <.0001	0,79 0,00	1,00		
<b>IGc</b>	-0,82 0,00	-0,87 <.0001	-0,82 0,00	-0,84 <.0001	-0,81 0,00	-0,88 <.0001	-0,87 <.0001	0,51 0,05	0,37 0,18	-0,66 0,01	0,74 0,00	0,87 <.0001	0,56 0,03	1,00	
<b>IGr</b>	-0,64 0,01	-0,70 0,00	-0,65 0,01	-0,66 0,01	-0,62 0,01	-0,71 0,00	-0,69 0,00	0,50 0,06	0,37 0,18	-0,58 0,02	0,71 0,00	0,73 0,00	0,59 0,02	0,64 0,01	1,00

## APÊNDICE 5

**Tabela 1 - Matriz de correlações de Pearson < 0,5% das variáveis Al, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Ti, U, CT, pH, das CCA de diferentes processos de incineração e os IGS, dos bioindicadores cebola.**

	Al	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Ti	U	CT	pH	IMc
<b>Al</b>	-----												
<b>Cu</b>	0,96**	-----											
<b>Fe</b>	0,98**	0,94**	-----										
<b>Mg</b>	0,98**	0,96**	0,98**	-----									
<b>Mn</b>	1,00**	0,95**	0,98**	0,98**	-----								
<b>Mo</b>	0,96**	0,99**	0,95**	0,98**	0,95**	-----							
<b>Na</b>	0,98**	0,99**	0,96**	0,99**	0,97**	0,99**	-----						
<b>Ni</b>	-0,27	-0,53*	-0,24	-0,32	-0,27	-0,50	-0,45	-----					
<b>Ti</b>	-0,12	-0,37	-0,04*	-0,17	-0,10	-0,35	-0,28	0,90**	-----				
<b>U</b>	0,87**	0,79*	0,91**	0,88**	0,87**	0,82*	0,84*	-0,06	0,07	-----			
<b>CT</b>	-0,71*	-0,87**	-0,69*	-0,75*	-0,71*	-0,85**	-0,83*	0,83*	0,62*	-0,51*	-----		
<b>pH</b>	-0,88**	-0,97**	-0,86**	-0,92*	-0,87**	-0,98**	-0,96**	0,66*	0,51*	-0,71*	0,93**	-----	
<b>IMc</b>	-0,96**	-0,99**	-0,94**	-0,97**	-0,95**	-0,99**	-0,99**	0,50	0,34	-0,81*	0,85**	0,97**	-----

Valores seguidos por\*\* (P < 0001) e \*(P < 0.00) apresentam significativa correlação.

Fonte: Autor, 2017.

## APÊNDICE 6

Análise de similaridade dos componentes das CCA através da análise de variância multivariada MANOVA usando o teste de Wilks' Lambda.

MANOVA Test Criteria and F Approximations for the Hypothesis of No Overall trat Effect

H = Type III SSCP Matrix for trat  
E = Error SSCP Matrix

**S=2 M=4.5 N=-0.5**

Statistic	Value	F Value	Num DF	Den DF	Pr > F
<b>Wilks' Lambda</b>	0.000000	2093.08	24	2	0.0005
<b>Pillai's Trace</b>	1.999874	2650.51	24	4	<.0001
<b>Hotelling-Lawley Trace</b>	79337.546291	.	24	0	.
<b>Roy's Greatest Root</b>	70373.489276	11728.9	12	2	<.0001

**NOTE: F Statistic for Roy's Greatest Root is an upper bound.**

**NOTE: F Statistic for Wilks' Lambda is exact.**

Bibliografia

Bhering, L.L. Rbio: A Tool For Biometric And Statistical Analysis Using The R Platform.

Crop Breeding and Applied Biotechnology, v.17: 187-190p, 2017.

## APÊNDICE 7

Avaliação de normalidade e comparações das médias dos dados do exame do citotoxicidade (IM)

SOFTWARE Rbio - BIOMETRIA NO R

Procedimento: ANOVA -DIC

Laboratorio de Biometria [www.biometria.ufv.br](http://www.biometria.ufv.br)

Autor: BHERING, L.L.

Data: 08/2016

\*\*\*\*\*

Data da Analise: Thu Sep 28 15:08:41 2017

-----  
Variavel = 1 IM  
-----

Analysis of Variance Table

	DF	SS	MS	Fc	Pr>Fc
Treatment	3	5.7884	1.92947	22.132	6.1387e-06
Residuals	16	1.3949	0.08718		
Total	19	7.1833			

-----  
CV = 8.21 %  
-----

Shapiro-Wilk normality test

p-value: 0.7945605

According to Shapiro-Wilk normality test at 5% of significance, residuals can be considered normal.

-----  
Tukey's test  
-----

Groups Treatments Means

a	4	4.29
b	1	3.712
b	3	3.594
c	2	2.782

-----  
Variavel = 2 AC  
-----

Analysis of Variance Table

	DF	SS	MS	Fc	Pr>Fc
Treatment	3	0.012095	0.0040317	1.1301	0.36657
Residuals	16	0.057080	0.0035675		
Total	19	0.069175			

-----  
CV = 27.46 %  
-----

Shapiro-Wilk normality test

p-value: 0.3967398

According to Shapiro-Wilk normality test at 5% of significance, residuals can be considered normal.

-----  
According to the F test, the means can not be considered distinct.

Levels Means

1 1 0.226

2 2 0.250

3 3 0.182

4 4 0.212

-----  
> proc.time()

user system elapsed

0.31 0.09 0.40

## APÊNDICE 8

### Dados da análise de regressão de Stepwise

The SAS System

The REG Procedure  
 Model: MODEL1  
 Dependent Variable: IGa  
 Number of Observations Read 15  
 Number of Observations Used 15

#### Stepwise Selection: Step 1

Variable CT Entered: R-Square = 0.7561 and C(p) = -4.4109

Analysis of Variance				
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value Pr > F
Model	1	23032	23032	40.29 <.0001
Error	13	7430.71754	571.59366	
Corrected Total	14	30463		

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Type II SS	F Value	Pr > F
Intercept	6.48113	16.86289	84.43552	0.15	0.7069
MO	18.27288	2.87863	23032	40.29	<.0001

Bounds on condition number: 1, 1

#### Stepwise Selection: Step 2

Variable Ni Entered: R-Square = 0.8076 and C(p) = -3.8020

Analysis of Variance				
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value Pr > F
Model	2	24601	12300	25.18 <.0001
Error	12	5861.98951	488.49913	
Corrected Total	14	30463		

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Type II SS	F Value	Pr > F
Intercept	30.32324	20.49468	1069.38109	2.19	0.1648
Ni	0.11346	0.06332	1568.72802	3.21	0.0984
MO	11.29582	4.71598	2802.56101	5.74	0.0338

Bounds on condition number: 3.1405, 12.562

All variables left in the model are significant at the 0.1500 level.

No other variable met the 0.1500 significance level for entry into the model.

#### Summary of Stepwise Selection

Step	Variable Entered	Variable Removed	Number Vars In	Partial R-Square	Model R-Square	C(p)	F Value	Pr > F
1	MO		1	0.7561	0.7561	-4.4109	40.29	<.0001
2	Ni		2	0.0515	0.8076	-3.8020	3.21	0.0984

#### The SAS System

The REG Procedure  
 Model: MODEL1  
 Dependent Variable: IGc  
 Number of Observations Read 15  
 Number of Observations Used 15

#### Stepwise Selection: Step 1

Variable Mo Entered: R-Square = 0.7705 and C(p) = -4.4663 ( $R^2$ )

#### Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	14832	14832	43.63	<.0001
Error	13	4419.09798	339.93061		
Corrected Total	14	19251			

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Type II SS	F Value	Pr > F
Intercept	98.00237	5.87460	94604	278.30	<.0001
MO	-0.39194	0.05933	14832	43.63	<.0001

Bounds on condition number: 1, 1

All variables left in the model are significant at the 0.1500 level.

No other variable met the 0.1500 significance level for entry into the model.

#### Summary of Stepwise Selection

Step	Variable Entered	Variable Removed	Number Vars In	Partial R-Square	Model R-Square	C(p)	F Value	Pr > F
1	MO		1	0.7705	0.7705	-4.4663	43.63	<.0001

#### The SAS System

The REG Procedure  
 Model: MODEL1  
 Dependent Variable: IG\_r  
 Number of Observations Read 15  
 Number of Observations Used 15

Stepwise Selection: Step 1

Variable pH Entered: R-Square = 0.5376 and C(p) = 225.4362 ( $R^2$ )

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	24291	24291	15.11	0.0019
Error	13	20895	1607.28994		
Corrected Total	14	45186			

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Type II SS	F Value	Pr > F
Intercept	-28.25991	32.75712	1196.25644	0.74	0.4039
pH	17.44440	4.48723	24291	15.11	0.0019

Bounds on condition number: 1, 1

All variables left in the model are significant at the 0.1500 level.

No other variable met the 0.1500 significance level for entry into the model.

Summary of Stepwise Selection

Step	Variable Entered	Variable Removed	Number of Vars In	Partial R-Square	Model R-Square	C(p)	F Value	Pr > F
1	pH		1	0.5376	0.5376	225.436	15.11	0.0019

The SAS System

The REG Procedure  
 Model: MODEL1  
 Dependent Variable: IMc  
 Number of Observations Read 15

CORREGIDA EM 14-12-17

Stepwise Selection: Step 1

Variable Cu Entered: R-Square = 0.9819 and C(p) = 56.6361 ( $R^2$ )

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	6.69164	6.69164	706.46	<.0001
Error	13	0.12314	0.00947		
Corrected Total	14	6.81477			

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Type II SS	F Value	Pr > F
Intercept	5.11685	0.05809	73.48159	7757.67	<.0001
Cu	-0.02648	0.00099637	6.69164	706.46	<.0001

Bounds on condition number: 1, 1

Stepwise Selection: Step 2

Variable Mo Entered: R-Square = 0.9856 and C(p) = 44.8115

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	6.71680	3.35840	411.36	<.0001
Error	12	0.09797	0.00816		
Corrected Total	14	6.81477			

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Type II SS	F Value	Pr > F
Intercept	4.71130	0.23719	3.22106	394.54	<.0001
Cu	-0.01461	0.00682	0.03743	4.58	0.0535
Mo	-0.00377	0.00215	0.02517	3.08	0.1046

Bounds on condition number: 54.422, 217.69

All variables left in the model are significant at the 0.1500 level.

No other variable met the 0.1500 significance level for entry into the model.

#### Summary of Stepwise Selection

Step	Variable Entered	Variable Removed	Number of Variables In	Partial R-Square	Model R-Square	C(p)	F Value	Pr > F
1	Cu		1	0.9819	0.9819	56.6361	706.46	<.0001
2	Mo		2	0.0037	0.9856	44.8115	3.08	0.1046

#### The SAS System

The REG Procedure  
 Model: MODEL1  
 Dependent Variable: ACc  
 Number of Observations Read 15

Stepwise Selection: Step 1

Variable U Entered: R-Square = 0.2871 and C(p) = 146.6201

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.01375	0.01375	5.24	0.0395

Analysis of Variance						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	
Error	13	0.03414	0.00263			
Corrected Total	14	0.04789				

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Type II SS	F Value	Pr > F	
Intercept	0.32196	0.04676	0.12450	47.41	<.0001	
U	-0.06490	0.02836	0.01375	5.24	0.0395	

Bounds on condition number: 1, 1

All variables left in the model are significant at the 0.1500 level.

No other variable met the 0.1500 significance level for entry into the model.

Summary of Stepwise Selection								
Step	Variable Entered	Variable Removed	Number Vars In	Partial R-Square	Model R-Square	C(p)	F Value	Pr > F
1	U		1	0.2871	0.2871	146.620	5.24	0.0395

