

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**ÁDILA CRISTINA KRUKOSKI FILIPPI**

**TOXICIDADE DE LODO DE ESGOTO SANITÁRIO: SUBSÍDIOS PARA TOMADA  
DE DECISÃO AMBIENTALMENTE CORRETA ANTES DA INCORPORAÇÃO EM  
SOLOS AGRÍCOLAS**

**FRANCISCO BELTRÃO**

**2022**

**ÁDILA CRISTINA KRUKOSKI FILIPPI**

**TOXICIDADE DE LODO DE ESGOTO SANITÁRIO: SUBSÍDIOS PARA TOMADA DE DECISÃO  
AMBIENTALMENTE CORRETA ANTES DA INCORPORAÇÃO EM SOLOS AGRÍCOLAS**

**Toxicity of calcined sewage sludge: subsidies for environmentally correct decision  
making before incorporation into agricultural soils**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental – Análise e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Dra Ana Paula Peron.

Coorientador(a): Dra Fernanda Batista de Souza.

**FRANCISCO BELTRÃO**

**2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Campus Francisco Beltrão



ADILA CRISTINA KRUKOSKI FILIPPI

**TOXICIDADE DE LODO DE ESGOTO SANITÁRIO: SUBSÍDIOS PARA TOMADA DE DECISÃO  
AMBIENTALMENTE CORRETA ANTES DA INCORPORAÇÃO EM SOLOS AGRÍCOLAS.**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Engenharia Ambiental: Análise E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Meio Ambiente.

Data de aprovação: 19 de Outubro de 2022

Ana Paula Peron, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Marcia Maria Mendes Marques, Doutorado - Universidade Federal do Piauí (Ufpi)

Dra. Thalita Grando Rauen, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 19/10/2022.

Dedico este trabalho a todos os envolvidos que ajudaram  
na realização desta pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

Sozinhos nada somos. Não seria diferente com esta produção. Quero agradecer a todos os que dispuseram do tempo e esforço para ajudar nesse estudo. Peço desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas elas podem estar certas que fazem parte do meu pensamento e de minha gratidão.

Agradeço, primeiramente, a Deus, que guiou a todos para esse maravilhoso resultado.

A minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula Peron, sem a qual eu jamais poderia chegar onde cheguei. Pela sabedoria com que me guiou nesta trajetória, por todo o seu esforço e, principalmente, por acreditar que era possível.

A minha coorientadora Profa. Dra. Fernanda Batista de Souza, sempre disponível para ajudar.

A Profa. Dra. Elisangela Dusman, docente do PPGEA, pelo esforço para que tudo ocorresse da melhor forma.

A Profa. Dra. Débora Cristina de Souza, da UTFPR de Campo Mourão, pela ajuda com os experimentos de estresse oxidativo.

Aos meus colegas de pesquisa que me ajudaram com os testes e sempre dispostos.

Minha amiga Patrícia Aline Bressiani, que sempre esteve comigo nos momentos de pesquisa, me ajudando e colaborando com esta pesquisa.

A Companhia de Saneamento do Paraná – SANEPAR pela disponibilização de técnicos que me receberam e esclareceram dúvidas fundamentais para a realização deste estudo.

Aos professores do Programa de Mestrado, sempre solícitos às dúvidas e presentes.

Aos meus colegas de turma, que mesmo nesse período de pandemia, nos mantemos unidos, torcendo pela vitória de cada um.

A Secretaria do Curso, pela cooperação, apoio e ajuda nos momentos que precisei.

Ao COEXP, uma ajuda especial nos laboratórios.

Gostaria de deixar registrado também, o meu reconhecimento à minha família, pois acredito que sem o apoio deles seria muito difícil vencer esse desafio.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

“Os dois mais importantes dias da sua vida são: o dia que você nasce e o dia que você descobre o porquê”

*Mark Twain*

## RESUMO

No Estado do Paraná, Brasil, é recorrente o uso de lodo de esgoto calcinado (biossólido) sem remediação como fertilizante para o cultivo de milho e soja. No presente estudo, avaliou-se a composição química, o potencial patogênico e o potencial tóxico em sistema vegetal e *Eisenia fetida* de biossólido produzido por uma unidade geradora de lodo localizada no sudoeste do estado. A análise de metais pesados e de patógenos, com base na Resolução 498/2020 do Conselho Nacional Brasileiro do Meio Ambiente, demonstrou que o resíduo pode ser incorporado em solos de cultivos no Brasil. As concentrações 100; 50; 25; 12,50 e 6,25% do biossólido causaram fitotoxicidade a *Lactuca sativa*, *Cucumis sativus*, *Triticum aestivum* e *Allium cepa*, porém, foram benéficas a germinação e alongamento de raízes em *Zea mays* L. Em meristemas de raízes de bulbos de *A. cepa*, as cinco concentrações causaram distúrbios a divisão celular e a concentração 100% causou expressiva morte celular. Todas as concentrações promoveram intumescimento em raízes de bulbos de cebola, além de inibição drástica das enzimas ascorbato peroxidase e superóxido redutase, ativação da enzima guaiacol peroxidase e peroxidação lipídica em seus meristemas. Em minhocas, as concentrações de biossólido no solo apresentaram alta porcentagem de fuga. No teste de mortalidade, as três maiores concentrações causaram a morte de todas as minhocas, e a 12,50% a morte de 41% dos animais. Em relação a produção de EROs, nos animais sobreviventes a catalase e a guaiacol estiveram ativas. Os resultados de toxicidade sugerem potente periculosidade do biossólido a plantas e organismos de solo. É impreterível que as unidades geradoras de lodo no Paraná subsidiem manejo adequado do resíduo antes da disponibilização a agricultores, uma vez que, a sua utilização recorrente pode impactar drasticamente na sobrevivência de diferentes espécies e comprometer toda a cadeia trófica associada.

Palavras-chave: biossólido; fitotoxicidade; citogenotoxicidade; estresse oxidativo; evasão mortalidade; periculosidade.

## ABSTRACT

In the State of Parana, Brazil, the use of calcined sewage sludge (biosolids) without remediation as a fertilizer by corn producers is recurrent. In the present study, the chemical composition, pathogenic potential and toxic potential to vegetal system and *Eisenia fetida* of biosolid produced by a sludge generating unit located in the southwest of the state were evaluated. The analysis of heavy metals and pathogens, based on Resolution 498/2020 of the Brazilian National Council for the Environment, classified the residue as suitable for incorporation into crop soils in Brazil. Concentrations 100; 50; 25; 12.50 and 6.25% of the biosolid caused phytotoxicity to *Lactuca sativa*, *Cucumis sativus*, *Triticum aestivum* and *Allium cepa*, however, germination and root elongation were beneficial in *Zea mays* L. In root meristems of *A. cepa* bulbs, the five concentrations caused disturbances in cell division and the 100% concentration caused significant cell death. All concentrations promoted swelling in onion bulb roots, in addition to drastic inhibition of the enzyme's ascorbate peroxidase and superoxide reductase, activation of the enzyme guaiacol peroxidase and lipid peroxidation in their meristems. In earthworms, biosolid concentrations in the soil scared away animals in high percentages. In the mortality test, the three highest concentrations caused the death of all earthworms, and at 12.50% the death of 41% of the animals. In the surviving animals, catalase and guaiacol were active, demonstrating ample production of ROS in their tissues. The toxicity results suggest a potent hazard of the biosolid to plants and soil organisms. It is imperative that the sludge generating units in Parana subsidize adequate management of the residue before its availability to farmers, since its routine use can drastically impact the survival of different species and compromise the entire associated trophic chain.

Keywords: biosolid; phytotoxicity; cytogenotoxicity; oxidative stress; evasion mortality; hazard.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Fluxograma 1 – Representação de fluxograma de processo de tratamento de esgoto ....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 1 – Localização da unidade geradora de lodo no sudoeste do Estado do Paraná, Brasil, onde o lodo de esgoto sanitário calcinado foi produzido .....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 2 - Intumescimento em raízes de <i>Allium cepa</i> expostas por 72 horas a lodo de esgoto sanitário calcinado solubilizado (nas concentrações 100, 50, 25, 12.5 e 6.25%) produzido no Estado do Paraná, Brasil. ....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 3 - Alterações celulares observadas em células meristemáticas de raízes de <i>Allium cepa</i> L. obtidas de bulbos expostos por 72 horas a lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Estado do Paraná, Brasil, nas concentrações 100, 50, 25, 12.5 e 6.25%. ...</b>	<b>42</b>
<b>Figura 4 - Efeito de lodo de esgoto sanitário calcinado solubilizado produzido no Estado do Paraná, Brasil, nas concentrações 100; 50; 25; 12,50 e 6,25%, sobre a viabilidade celular em meristemas de raízes de bulbos de <i>Allium cepa</i> L. expostos por 72 horas ao resíduo. ....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 5- Atividade das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), superóxido redutase (SOD) e guaiacol peroxidase (GPOX) em raízes de bulbos de <i>Allium cepa</i> L. expostas por 72 horas a lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Estado do Paraná, Brasil, nas concentrações 100, 50, 25, 12.5 e 6.25%. ....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 6 - Peroxidação lipídica em raízes de bulbos de <i>Allium cepa</i> L. expostos por 72 horas a lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Estado do Paraná. Brasil, nas concentrações 100, 50, 25, 12,50 e 6,25%. ....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 7 - Distribuição de minhocas <i>E. fetida</i> nos diferentes grupos avaliados entre os compartimentos solo controle e solo com lodo de esgoto calcinado solubilizado produzido no Paraná, Brasil nas concentrações 100; 50; 25; 12,5 e 6,25%.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 8 – Taxa de fuga de minhocas <i>E. fetida</i> nos diferentes grupos avaliados com lodo de esgoto calcinado solubilizado produzido no Paraná, Brasil nas concentrações 100; 50; 25; 12,5 e 6,25%. ....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 9 - Atividade das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPOX) e Superóxido redutase (SOD) em <i>Eisenia fetida</i> Sav. expostas por 14 dias a lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Estado do Paraná. Brasil, nas concentrações 12,50 e 6,25%. ....</b>	<b>48</b>

**Figura 10- Peroxidação lipídica em *Eisenia fetida* Sav expostas por 14 a lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Estado do Paraná. Brasil, nas concentrações 12,50 e 6,25%. .....49**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 - Metodologias realizadas das análises químicas e microbiológicas do lodo de esgoto calcinado realizadas pelo LABB Análises Ambientais, conforme laudo técnico 32747/2022.0. ....</b>	<b>24</b>
<b>Tabela 2 - Análise química e de patógenos de lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Estado do Paraná, Brasil. ....</b>	<b>35</b>
<b>Tabela 3 - Fitotoxicidade de lodo de esgoto sanitário calcinado solubilizado produzido no Estado do Paraná, Brasil, a sementes e raízes de <i>Allium cepa</i> L., <i>Lactuca sativa</i> L., <i>Cucumis sativus</i> L., <i>Zea mays</i> e <i>Triticum aestivum</i>, nas concentrações 100; 50; 25; 12,50 e 6,25%.38</b>	<b>38</b>
<b>Tabela 4 - Índices mitóticos, número, tipos e índice de alterações celulares observados em meristemas de raízes de bulbos de <i>Allium cepa</i> L. expostos por 72 horas a lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Estado do Parana, Brasil, nas concentrações 100; 50; 25; 12,5 e 6,25%. ....</b>	<b>41</b>

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
2.1	<b>Características do lodo de esgoto</b> .....	15
2.2	<b>Tratamento e higienização do lodo de esgoto</b> .....	16
2.3	<b>Aplicação do lodo de esgoto pós tratamento</b> .....	17
2.4	<b>Legislação sobre a aplicação de biossólido a cultivos agrícolas</b> .....	17
2.5	<b>Fatores limitantes para aplicação de lodo de esgoto em cultivos agrícolas</b> .	18
2.6	<b>Uso de testes bioindicadores para avaliação de toxicidade</b> .....	19
2.6.1	<i>Lactuca sativa</i> e <i>Allium cepa</i> .....	20
2.6.2	<i>Cucumis sativus</i> .....	21
2.6.3	<i>Zea mays</i> e <i>Triticum</i> sp .....	21
2.6.4	<i>Eisenia fetida</i> Sav. ....	22
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
3.1	<b>Informações sobre o biossólido, a UGL produtora do resíduo e a região do Paraná onde o lodo foi produzido</b> .....	23
3.2	<b>Análises química e microbiológicas do lodo de esgoto sanitário</b> .....	24
3.3	<b>Solubilização do lodo de esgoto e obtenção das concentrações de estudo</b> ...	26
3.4	<b>Teste de fitotoxicidade em sementes e raízes de <i>A. cepa</i>, <i>L. sativa</i>, <i>C. sativus</i>, <i>T. aestivum</i> e <i>Zea mays</i></b> .....	26
3.5	<b>Avaliação de fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, e viabilidade celular em meristemas de raízes de bulbos de <i>A. cepa</i></b> .....	28
3.6	<b>Testes de toxicidade em <i>E. fetida</i></b> .....	29
3.6.1	Obtenção das minhocas e composição do solo tropical.....	29
3.6.2	Teste de fuga.....	30
3.6.3	Taxa de mortalidade .....	31
3.7	<b>Análise enzimática de raízes de bulbos de <i>A. cepa</i> e em <i>E. fetida</i></b> .....	32
3.7.1	Preparação das amostras .....	32
3.7.2	Análises enzimáticas.....	32
3.8	<b>Análise de peroxidação lipídica em raízes de bulbos de <i>A. cepa</i> e em <i>E. fetida</i></b> 33	
3.9	<b>Análises estatísticas</b> .....	34
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	50
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	51

## 1 INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, o lodo de esgoto sanitário, por ser constituído de matéria orgânica e macro e micronutrientes importantes para plantas, tem sido continuamente e em larga escala utilizado como condicionante e fertilizante de solos (ZHUANG *et al.*, 2017; YOSHIDA *et al.*, 2018). No entanto, esse resíduo é constituído por uma variedade de metais pesados, além de poluentes orgânicos e patógenos (BABIC *et al.*, 2016; SIQUEIRA *et al.*, 2021). Esses elementos no lodo, quase sempre, estão em baixas concentrações, mas a diversidade e o sinergismo entre eles podem formar uma mistura complexa, com potencial em causar efeitos tóxicos e irreversíveis a diferentes ecossistemas (ROIG *et al.* 2012; MARTINS, SOUZA E SILVA, 2016; SOUZA *et al.*, 2020).

No Brasil, a incorporação de lodo sanitário calcinado (biossólido) em solos agrícolas é amparada pela Resolução 498 de 2020 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) (BRASIL, 2020). Este documento estabelece limites numéricos para metais pesados e concentrações de patógenos, e tem como principal exigência o monitoramento desses parâmetros no biossólido antes da destinação. Contudo, a lei brasileira não prevê o sinergismo entre os elementos que constituem o resíduo e seu potencial tóxico. Conforme citam Ramirez *et al.* (2008), somente avaliações químicas e de organismos patogênicos não determinam os impactos biológicos de biossólidos a organismos terrestres e aquáticos, independentemente da diversidade, precisão e sensibilidade dessas análises.

No estado do Paraná, Brasil, o lodo de esgoto sanitário calcinado proveniente de estação ou de um complexo de estações de tratamento de efluentes é de forma recorrente incorporado a solos agrícolas para cultivo de soja e milho (POGERRE, 2012; AESB, 2022). Nos últimos dois anos, 26 mil toneladas desse tipo de resíduo foram destinadas às propriedades rurais no Paraná que tem a maior parte da economia voltada a agricultura (AESB, 2022). Nesse estado, até onde se sabe, o lodo destinado a agricultura, além da higienização com óxido de cálcio, não é submetido a nenhum outro tipo de remediação antes da destinação. Também não há registros de avaliações toxicológicas de biossólidos produzidos no estado a plantas e organismos de solo.

As espécies *Lactuca sativa* L., *Allium cepa* L., *Zea mays* L., *Cucumis sativus* L. e *Triticum aestivum* L. são regularmente usadas para avaliação de fitotoxicidade de poluentes orgânicos e inorgânicos, e recomendadas pela OECD (1987 e 2006), USEPA (1987) e USFDA (1987). Por meio de raízes de *A. cepa* ainda é possível avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo causado por diferentes poluentes ambientais (USEPA 1987; OECD 1987,

2006; LEME e MARIN-MORALES, 2009, HERRERO *et al.*, 2012, SALES *et al.*, 2017, KUMAR *et al.*, 2022, FRÂNCICA *et al.*, 2022). Os dados obtidos por meio desse bioensaio apresentam relevante correlação aos testes de toxicidade *in vitro* e com animais (HERRERO *et al.*, 2012; SALES *et al.*, 2017; MENDES *et al.*, 2021). A minhoca *Eisenia fetida* Sav. é elementar na cadeia alimentar trófica terrestre e amplamente utilizada em testes ecotoxicológicos (SCHUTZ *et al.*, 2021; DATTA *et al.*, 2021; LISBOA *et al.*, 2021; SANTO *et al.*, 2022).

Portanto, ao considerar que a incorporação de lodo em solos agrícolas promove o contato direto de plantas cultivadas e não cultivadas, bem como de animais edáficos, com um mix de substâncias, objetivou-se avaliar lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Paraná quimicamente, microbiologicamente e quanto a toxicidade a plantas e a *E. fetida* e verificar se sua incorporação em solos agrícolas representa risco ambiental. Almeja-se que os resultados alcançados contribuam para melhor entendimento do risco biológico associado a incorporação de lodo dessa natureza sem nenhum processamento biológico e/ou físico prévio em solos paranaenses e no mundo, bem como, estimulem Unidades Geradoras de Lodo (UGL) no Paraná a tornarem o resíduo ambientalmente seguro antes da destinação.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Características do lodo de esgoto

A Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA nº. 498 de 19 de agosto de 2020, define o lodo de esgoto (LE) como “*resíduo sólido gerado no processo de tratamento de esgoto sanitário, por processos de decantação primária, biológico ou químico, não incluindo resíduos sólidos removidos de desarenadores, de gradeamento e peneiramento*” (BRASIL, 2020).

O tratamento dos efluentes de origem doméstica e industrial tem como subproduto o lodo de esgoto. Esse resíduo *in natura* é a porção sedimentada dos efluentes coletados de origem urbana e industrial. É composto de material rico em matéria orgânica, possuindo elevada concentração de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio, elementos esses nutritivos para o desenvolvimento das plantas (D’OLIVEIRA, 2006).

Considerando sua origem, a sazonalidade e o tratamento a que é submetido, o lodo de esgoto tem sua composição variável. Segundo Berttiol e Camargo (2006), geralmente 52% do lodo é representada por macro e micronutrientes, nitrogênio (cerca de 4%), fósforo (cerca de 2%) e os outros 40% são matéria orgânica.

No lodo de esgoto *in natura*, há presença de ovos de helmintos, assim como cistos de protozoários, vírus entéricos e bactérias, além de metais pesados. Na pesquisa de Guimarães, Cordeiro e Vitorino (2018) aponta dentre os patógenos presentes mais mencionados se destacam *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens*. A resistência desses agentes representa riscos, em caso de destinação inadequada deste resíduo. Conforme Rossmann *et al*, (2014), considerando a aplicação do lodo sanitário em áreas agrícolas, estes patógenos podem permanecer no solo durante meses e resistindo a temperaturas de até 30°C.

A presença de metais pesados no lodo de esgoto e o acúmulo desses metais em cultivos agrícolas desperta preocupação pelos impactos que podem ser causados às culturas e ao meio ambiente (NOGUEIRA *et al*, 2008). Yakameran, Ari, Aygün (2021) e Pires, Martiazzo e Andrade (2005) citam zinco, cobre, cromo, chumbo, níquel, molibdênio, arsênio, cádmio e selênio como os principais metais pesados encontrados no lodo de esgoto.

A carga patogênica do lodo de esgoto que chega às Estações de Tratamento de Esgoto, depende das características da população e dos efluentes que são conduzidos pela tubulação de esgoto à estação de tratamento (DE PAULA *et al.*, 2009).

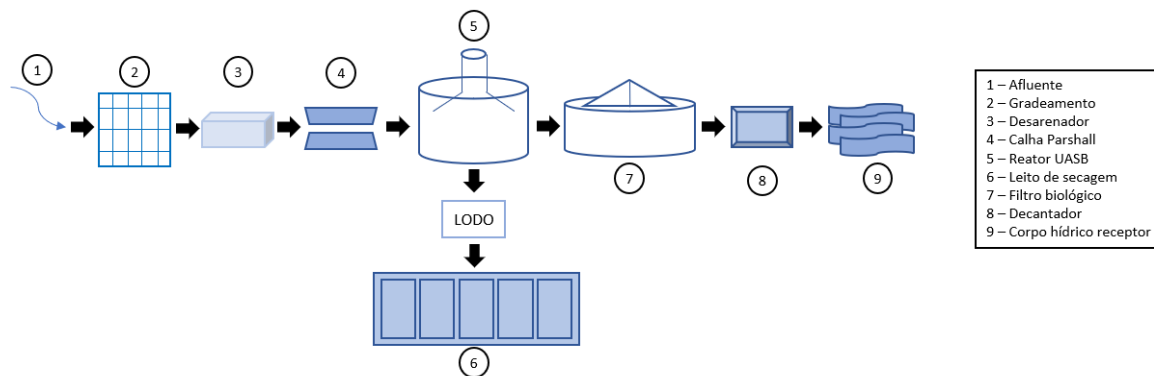
## 2.2 Tratamento e higienização do lodo de esgoto

Segundo Spicker (2021), a implementação de tratamento para resíduos é crescente, considerando a produção de efluentes causada pelo crescimento da população. Há necessidade de amenizar e eliminar os poluentes envolvidos no processo de tratamento além de destiná-lo de forma adequada, evitando a poluição de solo, águas e as saúde da população.

O processo para o tratamento de esgoto sanitário aborda a separação de frações líquidas e sólidas, por meio de tratamento físico, biológico e químicos. Como processo físico, é comum a utilização de grades para a separação de materiais em suspensão. Os processos biológicos podem ser realizados pela oxidação biológica ou digestão do esgoto, geralmente associados a processos aeróbios ou anaeróbios (CHAGAS, 2000).

Por se tratar do lançamento de material fecal e efluentes domésticos, o lodo de esgoto passa pelos processos de estabilização e higienização. Um dos processos mais utilizados em ETE é o processo de adição de cal (CaO) que tem como objetivos a redução do número dos microrganismos patogênicos do seu conteúdo e a minimização do seu potencial de putrefação (MAZZEO *et al*, 2015).

**Fluxograma 1 – Representação de fluxograma de processo de tratamento de esgoto**



**Fonte: Autoria própria (2022)**

O lodo gerado no processo de tratamento necessita de estabilização, visando reduzir a concentração de microrganismos patogênicos e odor (FERNANDES e SOUZA, 2001). O processo de digestão anaeróbia realizada no tratamento, permite que o lodo de esgoto seja estabilizado biologicamente pela ação dos microrganismos presentes no lodo sem a presença de oxigênio. A estabilização química, após o tratamento anaeróbio, com a adição de CaO, é utilizada para fixação de metais pesados, diminuição de odores e destruição de microrganismos (FERNANDES e SOUZA, 2001).



### 2.3 Aplicação do lodo de esgoto pós tratamento

Com carga patogênica reduzida, ou eliminada, o lodo calcado passa a chamar-se biossólido e tem características que favorecem sua aplicação na agricultura. Esta opção para sua destinação é incentivada pelo custo relacionado a outros métodos de disposição, redução dos custos na agricultura e presença de matéria orgânica e diversos nutrientes (NASCIMENTO *et al*, 2015).

Utilizado principalmente pela facilidade de aplicação e baixo custo, o processo de caleação ou calcinação do lodo de esgoto contém algumas desvantagens como a perda de nitrogênio e a imobilização de fósforo (TAVARES *et al.*, 2019).

A aplicação de biossólido na agricultura apresenta uma opção de baixo custo para a destinação, tendo em vista o volume de produção de áreas urbanizadas e atendidas por sistema de tratamento de esgotos. Avaliações do potencial tóxico do lodo de esgoto anterior à sua aplicação no solo podem evitar a contaminação do solo, águas superficiais e subterrâneas (MAZZEO *et al*, 2015).

A utilização de lodo de esgoto em regiões com atividade agrícola é uma prática popularmente utilizada em diferentes países (MAKIYAMA, PIRES e POLETTI, 2019). Um dos fatores que influenciou a pesquisa e a prática de uso do lodo de esgoto tratado na agricultura no mundo, foi a proibição de lançamento deste subproduto do tratamento de esgoto em oceanos, nos Estados Unidos em 1992 e na Europa em 1998, conforme descrito por Nascimento *et al* (2015).

Entretanto, sua disposição agronomicamente adequada depende do controle de fatores que assegurem a utilização sem riscos à saúde humana e animal, além a contaminação do solo, águas superficiais e subterrâneas (RODRIGUES *et al*, 2013).

Knopik *et al* (2018) apresentou estudo no nordeste do estado do Paraná, avaliando a destinação e uso agrícola do biossólido de lodo de esgoto, demonstrando benefícios quanto aos nutrientes do solo, porém, apresentou variação na concentração de metais no solo, dentro do limite permitido pela legislação vigente.

### 2.4 Legislação sobre a aplicação de biossólido a cultivos agrícolas

No Brasil, a Resolução nº 498 de 19 de agosto de 2020, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA define sobre os critérios e procedimentos para a produção e aplicação de biossólido em solos e considera como alternativa ambientalmente correta do lodo de esgoto em solos (BRASIL, 2020). Esta resolução classifica o biossólido que é definido como o

*“produto do tratamento do lodo de esgoto sanitário que atende aos critérios microbiológicos e químicos estabelecidos nesta Resolução, estando, dessa forma, apto a ser aplicado em solos”.* (BRASIL, 2020).

Considerando os processos de tratamento utilizados pela Companhia de Saneamento do Paraná - SANEPAR, o bio sólido é classificado como Classe B. Essa classe que envolve processos de tratamento com redução significativa de patógenos por estabilização com CaO, elevando o pH até 12 pelo período mínimo de duas horas (BRASIL, 2020). Nesta resolução são estabelecidos valores máximos para arsênio, bário, cádmio, cobre, chumbo, cromo, mercúrio, molibdênio, níquel, selênio e zinco, de modo a limitar o uso do bio sólido em solos.

A Resolução do Estado do Paraná, da Secretaria Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos – SEMA, nº. 21 de 22 de abril de 2009 dispõe sobre o licenciamento ambiental que estabelece condições e padrões ambientais e dá outras providências, para empreendimentos de saneamento. Dentre as disposições desta resolução, são especificados os critérios para a utilização agrícola do Lodo de Estação de Tratamento de Esgoto – ETE. Vários critérios são descritos nesta legislação visando a aplicabilidade do lodo de esgoto pós tratamento, como: Qualidade do lodo de esgoto, potencial agrônômico, caracterização pela presença de substâncias orgânicas e inorgânicas, presença de agentes patogênicos e indicadores bacteriológicos, parâmetros de estabilidade do composto, instruções para o licenciamento, monitoramento dos lotes de lodo utilizados, aptidão dos solos para receber o lodo de esgoto tratado, diretrizes de manuseio e aplicação e elaboração de documentos por parte de Unidade de Gerenciamento de Lodo – UGL (PARANÁ, 2009).

## **2.5 Fatores limitantes para aplicação de lodo de esgoto em cultivos agrícolas**

A presença de microrganismos patogênicos, poluentes orgânicos persistentes e metais pesados é fator limitante para a aplicação de lodo de esgoto em solo agricultável, considerando os riscos de contaminação do solo, transferência de contaminantes pela cadeia alimentar, lixiviação de nutrientes e infecção por patógenos (PAGANINI, SOUZA, E BOCCHIGLIERI, 2004).

Dentre os elementos que podem ser contaminantes ao solo, Guimarães, Cordeiro e Vitorino (2018) aponta como os mais citados: zinco (Zn), cobre (Cu), cádmio (Cd), chumbo (Pb), níquel (Ni), cromo (Cr), manganês (Mg), ferro (Fe), cobalto (Co), mercúrio (Hg), arsênio (As), selênio (Se), alumínio (Al), molibdênio (Mo), bromo (Br) e boro (B). A principal causa de contaminação é a concentração elevada de elementos, não somente a presença, conforme

Coscione, Nogueira e Pires (2010), que ressalta que são micronutrientes para o desenvolvimento das plantas os elementos arsênio, cobalto, cromo, selênio, zinco, ferro e cobre.

Cobre e zinco podem ter características fitotóxicas nas plantas podendo acumular-se em raízes, restringindo o crescimento radicular. Altos níveis de matéria orgânica também estão associados a concentrações maiores de zinco no solo (PAGANINI, SOUZA, E BOCCHIGLIERI, 2004).

O cádmio, por não ser essencial para o crescimento das plantas, é rapidamente absorvido pelas plantas o que aumenta o nível de acúmulo do elemento (GUIMARÃES, CORDEIRO E VITORINO, 2018). O mercúrio é altamente tóxico, embora haja volatilidade por parte do elemento, não possuindo característica para lixiviação, eximindo a contaminação de águas subterrâneas, pode fixar-se nas plantas. O chumbo pode concentrar-se principalmente nas raízes das plantas, inibindo o desenvolvimento radicular, dificilmente transportado para a parte aérea da planta. O níquel em baixas concentrações já apresenta toxidez às plantas, principalmente quanto ao crescimento aéreo e dificuldade de fixação de ferro, causando clorose (ausência de clorofila) (PAGANINI, SOUZA e BOCCHIGLIERI, 2004).

Conforme Fijalkowski *et al.* (2017), os oligoelementos metálicos são registrados em contaminação, seja pela bioacumulação no meio ambiente, acumulação no solo e entrada na cadeia alimentar, por se tratar de contaminantes inorgânicos biodegradáveis. Em seu estudo comparativo, Fijalkowski *et al.* (2017) observou a presença de metais pesados, metalóides e não metais, utilizando-se o termo oligoelementos metálicos para compreendê-los.

## **2.6 Uso de testes bioindicadores para avaliação de toxicidade**

Por definição, os testes de toxicidade são procedimentos que submetem organismos-testes a diferentes concentrações de uma ou mais substâncias, em condições que tentam simular o ambiente natural, para avaliação de efeitos adversos destas substâncias, que podem ser letais ou não (LAITANO e MATHIAS, 2006).

O uso de testes de germinação é importante para a avaliação de toxicidade de substâncias considerando que os bioindicadores geralmente são plantas indicadoras de alelopatia, que são o resultado de interações bioquímicas destas plantas com organismos ou compostos, sendo estes prejudiciais ou não para a germinação e desenvolvimento da semente testada (MAY *et al.*, 2011).

### 2.6.1 *Lactuca sativa* e *Allium cepa*

A utilização de organismos como *A. cepa* e *L. sativa* para avaliar a toxicidade é baseada em como se comportam em relação a outros organismos, seu relacionamento no meio em que está presente e suas características fisiológicas (BERTAN *et al*, 2020).

Outras características que facilitam a escolha por estes bioindicadores são: a facilidade de cultivo em laboratório, ciclo de vida curto e resistência (VILAS-BOAS, SENRA E DIAS, 2020). Considerando um comportamento diferente do comum, pode ser avaliado como bem sucedido o teste em que foram inseridos. Esses resultados podem apresentar variabilidade, por isso é importante a utilização de mais de um tipo de bioindicador (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Experimentos de toxicidade realizados com plantas, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento, visam detectar o efeito causado à germinação das sementes e no crescimento das raízes (ZANATTA, 2014). Muito utilizada para este tipo de testes, a *L. sativa*, que é conhecida popularmente como alface, é adotada pela sua sensibilidade e rapidez de desenvolvimento. Como organismo teste, a *L. sativa* é utilizada para verificação de toxicidade por ter baixo custo de cultivo em laboratório e não necessita ter um tratamento anterior à aplicação do teste, o que demonstra sua eficiência (FRÂNCICA *et al*, 2022).

Tavares *et al.* (2019) realizou estudo sobre a toxicidade de lodo de estação de tratamento de água e de esgoto, associando a técnica de vermicompostagem e os efeitos em sementes de *L. sativa* onde demonstrou que o índice de germinação foi menor em concentrações maiores de lodo e quando não submetido ao tratamento de vermicompostagem, além de maiores concentrações de metais nesses casos. Ao contrário, o maior índice de germinação demonstrou que após o tratamento de vermicompostagem, onde houve diminuição do nível de metais pesados, como alumínio, em concentrações de lodo a 10%, concluindo que o lodo utilizado, mesmo com o tratamento ainda apresentava nível de metais pesados que inibia o crescimento das sementes.

Popularmente conhecida como cebola, *A. cepa* é utilizada nos testes de toxicidade, assim como a *L. sativa* por sua sensibilidade à substâncias, facilidade no manuseio e baixo custo para análises em laboratório, demonstrando eficiência para análises macroscópicas quanto à germinação e crescimento radicular (BARBOSA, 2016).

Ensaio realizado por Martins, Souza e Silva (2016) analisaram os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do lodo de esgoto tratado, provindo de duas estações de tratamento

no estado do Espírito Santo, embora com nível de metais pesados dentro dos padrões regulamentados pela legislação, apresentaram efeitos tóxicos e mutagênicos para *A. cepa*.

Bertan *et al* (2020) avaliou o potencial de citotoxicidade de lodo in natura a *cepa* e observou que a exposição foi citotóxica considerando a diminuição do índice mitótico em comparação ao crescimento do controle negativo.

### 2.6.2 *Cucumis sativus*

*Cucumis sativus*, de nome popular pepino, é amplamente utilizado em testes de toxicidade como bioindicador, por sua sensibilidade à presença de agentes com potencial tóxico (Franco *et al*, 2017). As sementes de *C. sativus* são utilizadas em testes de fitotoxicidade por vantagens na sua implementação, facilidade e rapidez na germinação e crescimento, valor acessível para aquisição das sementes e também pela recomendação como uma das espécies mais utilizadas para detectar efeitos ecotoxicológicos, conforme US Environmental Protection Agency (EPA U.S., 1996).

Em seu experimento, Guevara *et al* 2019, utilizou sementes de *C. sativus* e outros bioindicadores para avaliar a fitotoxicidade de águas residuais domésticas de município do Rio Grande do Sul. Eid *et al* (2017) avaliou o crescimento e biomassa de *C. sativus* quanto a sua bioacumulação de metais pesados em diferentes concentrações de lodo de esgoto. Os resultados da exposição de *C. sativus*, nas maiores concentrações, apresentaram níveis fitotóxicos dos metais em raízes (Cr e Fe), folhas (Fe) e frutos (Cu).

### 2.6.3 *Zea mays* e *Triticum* sp

O milho *Zea mays* é uma das culturas mais importantes do mundo, considerando sua produção e consumo. Da mesma forma, o trigo, *Triticum* sp, é matéria prima para alimentos humanos, animais e para a indústria (TIAN *et al*, 2014). Para o atendimento das demandas destes produtos é necessário o aproveitamento otimizado de processos produtivos, envolvendo custos e qualidade de culturas. A utilização de fertilizantes nestas culturas, permite o aproveitamento como também pode possibilitar a bioacumulação de metais presentes (Gonzaga *et al* 2020).

Bremm *et al* (2012) utilizou lodo de esgoto para avaliação de uso em cultura de milho. Considerando a presença de metais pesados, os autores concluíram que é uma alternativa viável economicamente. Gomes, Nascimento e Biondi (2007) estudaram a aplicação do lodo de esgoto avaliando a germinação e crescimento de plântulas de milho. O estudo obteve resultados

positivos quanto a aproveitamento do bioossólido, com eficiência agrônômica às condições aplicadas.

#### 2.6.4 *Eisenia fetida* Sav.

Minhocas da espécie *Eisenia fetida* Sav, assim como outras espécies do mesmo gênero, são amplamente utilizadas como bioindicadores pela sua sensibilidade química e facilidade de manutenção em laboratório. O comportamento destes organismos pode ser afetado, devido aos quimiorreceptores contidos no prostômio e tubérculos sensoriais, fazendo com que solos quimicamente contaminados sejam evitados (AZEVEDO e CORONAS, 2019).

Para Cesar *et al* (2008), os testes de toxicidade utilizando minhocas é importante pelo seu papel de base na cadeia alimentar, servindo de alimento a outros animais e sua capacidade de ingestão de solo, o que pode alterar características físicas e químicas do ambiente que estão inseridas. Para Lisboa *et al*, 2021, o ciclo curto de vida, alta taxa de reprodução e sensibilidade a substâncias tóxicas, são as vantagens na utilização de *Eisenia* spp. em testes de toxicidade.

Cesar *et al* (2008) realizou em sua pesquisa, teste de fuga com minhocas em dois tipos de solo acrescidos de lodo de esgoto, avaliando o comportamento, efeitos letais e perda de biomassa. Nesta pesquisa, 98,3% dos organismos testados foram estimulados à fuga pelos solos acrescidos de LE.

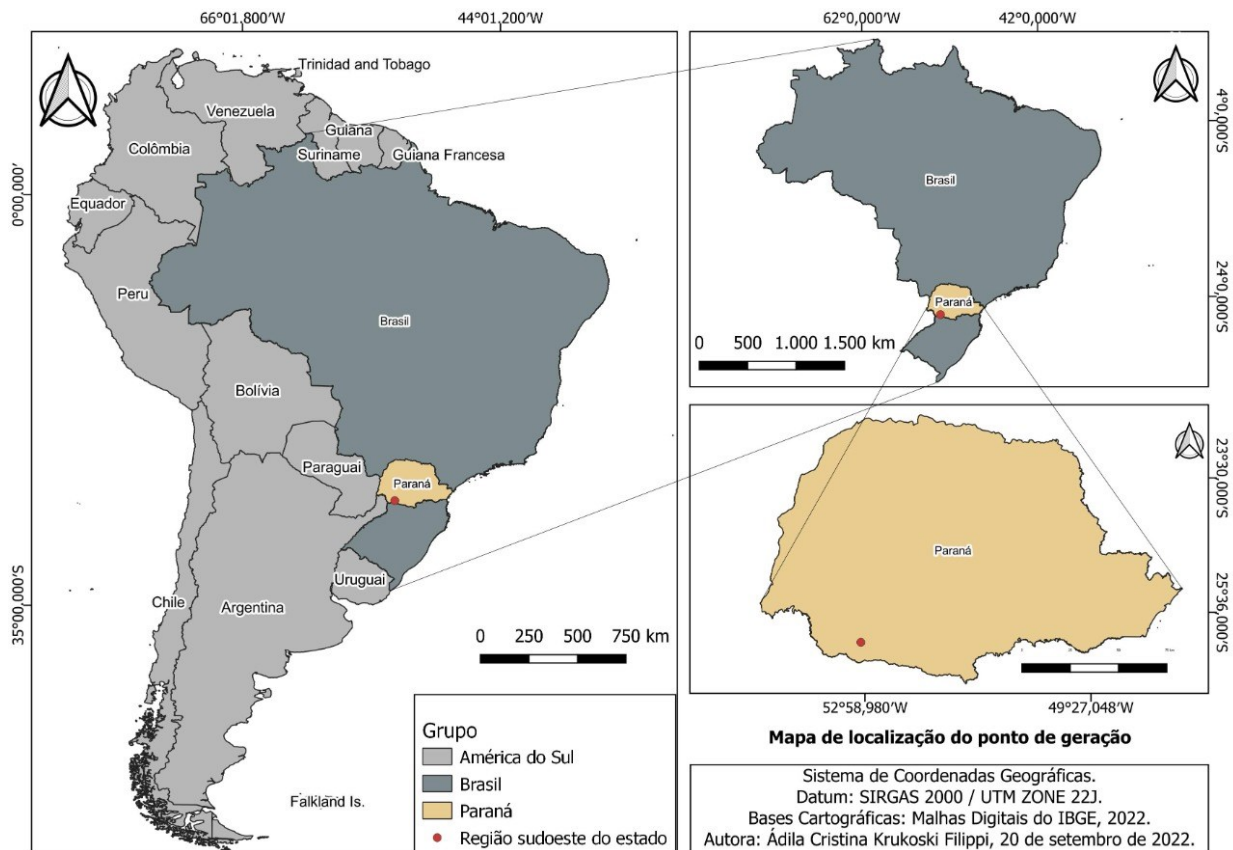
Em pesquisa realizada por Lisboa *et al* (2021), os bioensaios apresentaram que as minhocas contribuem para a indicação de solos contaminados por LE considerando sua sensibilidade a componentes tóxicos presentes, o que foi demonstrado por alterações de dinâmica populacional, mesmo que os limites de parâmetros estivessem contidos no que regulamenta a legislação vigente, considerando tóxico àquele ambiente para os organismos presentes.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Informações sobre o bioossólido, a UGL produtora do resíduo e a região do Paraná onde o lodo foi produzido

O resíduo avaliado no presente estudo é referente ao montante de lodo de esgoto sanitário calcinado produzido ao final do segundo semestre de 2021 por UGL devidamente licenciada por órgãos ambientais, localizada no sudoeste do Estado do Paraná, Brasil (Figura 1). Essa unidade geradora é a maior da região e realiza tratamento anaeróbico em reator fechado de esgoto sanitário de 66.634 pontos (residências e comércios), tratando em média 110 litros de esgoto por segundo, com média mensal de 270.000 m<sup>3</sup>. O lodo produzido por ela, assim como por outras UGL no Estado do Paraná, é destinado a áreas agrícolas para o cultivo de milho e soja. Segundo AESBE (2022), o sudoeste do Paraná é um dos principais produtores de soja e milho no Brasil - com produção anual média de 60 mil toneladas de soja e 50 mil toneladas de milho - com grandes, médias e pequenas propriedades rurais, e também um grande exportador desses grãos para Europa e Ásia.

**Figura 1 – Localização da unidade geradora de lodo no sudoeste do Estado do Paraná, Brasil, onde o lodo de esgoto sanitário calcinado foi produzido**



**FONTE: Autoria própria (2022).**

O lodo de esgoto sanitário acumulado semestralmente pela UGL em questão é higienizado com óxido de cálcio (CaO) e armazenado em condições controladas de temperatura e umidade. Durante o armazenamento, o montante de biossólido é avaliado quanto a composição e estabilidade química e o potencial patogênico, e somente é disponibilizado a áreas agrícolas se esses resultados atenderem a Resolução brasileira 498/2020 do CONAMA.

A unidade geradora forneceu laudos de análises químicas e de potencial de patógenos de montantes de biossólidos produzidos por ela no período 2016 a 2021. Observou-se grande semelhança entre os resultados das análises de compostos orgânicos persistentes e não persistentes, de metais pesados e de patógenos, detectando-se apenas variações na quantidade de carbono e nitrogênio. Isso demonstra homogeneidade dos biossólidos produzidos pela UGL entre os períodos analisados. Apesar do acesso aos laudos, realizou-se análises químicas e de patógenos do resíduo disponibilizado para a pesquisa em laboratório independente da unidade fornecedora do lodo (item 4.2).

### 3.2 Análises química e microbiológicas do lodo de esgoto sanitário

O lodo de esgoto sanitário calcinado foi analisado pelo laboratório LABB Análises Ambientais, localizado em Blumenau, Estado de Santa Catarina, Brasil - laudo técnico 32747/2022.0.

**Tabela 1 - Metodologias realizadas das análises químicas e microbiológicas do lodo de esgoto calcinado realizadas pelo LABB Análises Ambientais, conforme laudo técnico 32747/2022.0.**

(continua)		
Metodologia	Parâmetros	Classificação
Determinação: EPA 8270 E1:2018 Preparo: EPA 3550 C:2007	Cis-clordano	Organoclorados sintéticos
EPA - 300.1 Revisão 1:1999	Nitrato Nitrito	
EPA - 8270D - Revisão 5:2014	Di(2-etilhexil)ftalato Aldrin DDT Dieldrin Dodecacloro Endrin Heptacloro	Ésteres de Ftalato    Organoclorados sintéticos
EPA - 8270D - Revisão 5:2014 e Preparação: EPA - 5021 A - Revisão: 1:2003; Determinação: EPA Method 8260D – Revisão 4: 2018	1,3 diclorobenzeno	Benzenos Clorados



**Tabela 1 - Metodologias realizadas das análises químicas e microbiológicas do lodo de esgoto calcinado realizadas pelo LABB Análises Ambientais, conforme laudo técnico 32747/2022.0.**

(continua)

	1,4 diclorobenzeno	
	1,2,3,4 Tetraclorobenzeno	
EPA - 8270D - Revisão 5:2014 e Preparação: EPA - 5021 A - Revisão: 1:2003; Determinação: EPA Method 8260D – Revisão 4: 2018	1,2,3,5 Tetraclorobenzeno	
	1,2,4,5 Tetraclorobenzeno	Benzenos Clorados
	1,3,5 triclobenzeno	
	1,2 diclorobenzeno	
	Hexaclorobenzeno	
EPA - 8270D - Revisão 5:2015	Dimetilftalato	
	Di-n-butilftalato	Ésteres de Ftalato
	Di(2-etilhexil)ftalato	
EPA - 8270D - Revisão 5:2014	2,4,6 triclorofenol	Fenóis Clorados
	Pentaclorofenol	
	Benzo(a)antraceno	
	Benzo(a)pireno	Hidrocarbonetos
	Benzo(k)fluorantreno	Poliaromáticos (PAH)
	Fenantreno	
EPA 3050B - Rev 02, 1996	Cobre	
	Cromo	
	Molibdênio	Metais
	Níquel	
	Selênio	
	Zinco	
	Cálcio	
	Potássio	Minerais
	Sódio	
EPA 3051a	Fósforo total	
EPA SW-846 – 8270 D	2,4 diclorofenol	Fenóis Clorados
	Cresóis	Fenóis Não Clorados
Gravimétrico	Umidade	
ISO 6579	<i>Salmonella</i> spp.	Patógenos
Meyer et al. (1978) EPA	Ovos de helmintos viáveis	Patógenos
Preparação: EPA 3050 B (1996); Determinação: SMEWW - 3120 B	Mercurio	Metais
Preparação: SMEWW - 3030 E. Determinação: SMEWW - 3120 B	Enxofre total	
SMEWW	pH	

**Tabela 1 - Metodologias realizadas das análises químicas e microbiológicas do lodo de esgoto calcinado realizadas pelo LABB Análises Ambientais, conforme laudo técnico 32747/2022.0.**

		(conclusão)
SMEWW - 2540 B e 2540 E	Sólidos Totais	
	Sólidos Totais Voláteis	
SMEWW - 4500 - N C	Nitrogênio Kjeldahi	
	Nitrogênio Total	
SMEWW - 9221 B, C, E, F	Coliformes	Patógenos
	termotolerantes	
SMEWW 5310D	Carbono Orgânico Total	
SMWW, 23ª Edição, Método 4500NH3 D	Nitrogênio Amoniacal	

**Fonte: Laudo técnico 32747/2022.0 – Laboratório LABB (2022)**

Os resultados de análises de metais pesados e de patógenos foram avaliados com base nos limites estabelecidos pela Resolução 498/2020 do CONAMA (Brasil, 2020). Os parâmetros pH; umidade, sólidos, carbono orgânico total; nitrogênio total e compostos nitrogenados, enxofre total, fósforo total e minerais são considerados por essa resolução, porém, o documento não estabelece limite máximo para a sua presença. Esses compostos foram classificados na Tabela 2 desse manuscrito como NE – estabelecido pela resolução. Os compostos orgânicos persistentes no lodo não são considerados pela lei brasileira e foram classificados na Tabela 2 como NC – não considerados pela resolução.

### **3.3 Solubilização do lodo de esgoto e obtenção das concentrações de estudo**

Para avaliação da toxicidade nos diferentes bioensaios fez a solubilização do biossólido (BS) de acordo com a ABNT NBR 10.006 (2004), em que 250 g de lodo calcinado foi adicionado em 1000 mL de água destilada, agitado mecanicamente por 5 minutos e deixado em repouso por sete dias. Após a decantação dos sólidos, o sobrenadante foi removido e filtrado em membrana de 0,45 mm para obtenção de extrato contendo substâncias solúveis em água. A concentração de 250g/L foi denominada de 100%. Também se avaliou o BS nas concentrações 50; 25; 12,50 e 6,25%.

### **3.4 Teste de fitotoxicidade em sementes e raízes de *A. cepa*, *L. sativa*, *C. sativus*, *T. aestivum* e *Zea mays***

As análises de potencial germinativo e alongamento de raízes foram realizadas de acordo com a OECD (2006), com pequenas modificações.

Sementes de *A. cepa* (cebola, variedade baia periforme), *L. sativa* (alface, variedade crespa), *C. sativus* (pepino, variedade comprido) e *T. aestivum* (trigo, variedade parrudo), da marca Isla®, foram adquiridas em casa agropecuária e estavam isentas de pesticidas e inibidores de crescimento. A taxa de germinação do lote informada pelos fornecedores para as cinco espécies estava entre 94 e 99%.

Para as quatro espécies, sementes de tamanhos semelhantes foram selecionadas em lupa estereoscópica. Em seguida, foram esterilizadas superficialmente em 0,1% (p/v) de HgCl<sub>2</sub> por 2 minutos, seguido de lavagens repetidas com água destilada, no intuito de isentá-las de qualquer contaminação microbiana. Em todo o experimento, para cada espécie, utilizou-se sementes do mesmo lote.

De cada espécie, sementes foram distribuídas em placas de Petri de 90 mm de diâmetro (previamente autoclavadas), sobre uma dupla folha de papel filtro. Cada placa recebeu 20 sementes que foram espaçadas a distâncias semelhantes. Fez-se cinco repetições (cinco placas), totalizando 100 sementes para todo controle e concentrações, denominados aqui de tratamentos. Utilizou-se água destilada como controle.

Toda placa foi irrigada com 2,0 mL de seu respectivo tratamento, quantidade suficiente para umedecer o papel filtro sem encharcá-lo. Em seguida, foram seladas com parafilme para evitar o ressecamento e incubadas em BOD (Biochemical Oxygen Demand), sem fotoperíodo, com temperatura controlada de 25 ± 1°C por 120 horas. Durante a incubação, quando necessário, acrescentou-se 0,5 mL de solução nas placas que apresentavam leve ressecamento. Uma semente foi considerada germinada quando a aparência visível da radícula foi detectada. Calculou-se a porcentagem de germinação por meio da equação 1:

$$G(\%) = \frac{\text{número de sementes germinadas}}{\text{total de sementes avaliadas}} \times 100 \quad (1)$$

Os comprimentos das radículas foram medidos com paquímetro digital e os dados de alongamento foram usados para calcular o Índice de Crescimento Relativo (RGI) e o Índice de Germinação (IG%), segundo Young *et al.* (2012), Biruk *et al.* (2017) e Santo *et al.* (2022). O cálculo dos índices para determinação da fitotoxicidade foi realizado por meio das equações 2 e 3:

$$RGI = \frac{RLI}{RLC} \quad (2)$$

$$GI(\%) = \frac{RLI \times GSI \times 100}{RLC \times GSC} \quad (3)$$

Onde:

RLI é o comprimento médio de radícula tratadas com as concentrações de lodo;

RLC é o comprimento de radícula do controle;

GSI é o número de sementes germinadas na concentração de lodo;

GSC é o número de sementes germinadas no controle.

Os valores de ICR foram diferenciados em três categorias de acordo com os efeitos tóxicos observados: a) Inibição do alongamento da raiz (I):  $0 < ICR < 0,8$ ; b) Sem efeitos significativos (NSE):  $0,8 \leq ICR \leq 1,2$  e c) Estimulação do alongamento radicular (S):  $ICR > 1,2$ .

Os outros sinais de fitotoxicidade considerados foram alterações na consistência, espessura e cor das raízes e na presença de raízes em gancho ou torcidas.

### **3.5 Avaliação de fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, e viabilidade celular em meristemas de raízes de bulbos de *A. cepa***

O ensaio de toxicidade em *A. cepa* foi desenvolvido conforme de Fiskesjö (1985), com algumas modificações. Para obtenção das raízes, bulbos de *A. cepa* (variedade beta cristal, obtida de horta orgânica) foram colocados para enraizar em frascos com água destilada até a obtenção de raízes com cerca de 2,0 cm. Para a análise do controle e de cada concentração de BS, denominados aqui de tratamentos, foi estabelecido um grupo experimental com cinco bulbos de cebola.

Antes de colocar os bulbos enraizados em contato com seus respectivos tratamentos, algumas raízes foram coletadas e fixadas para servirem de controle do próprio bulbo, que foi identificado como tempo de análise 0 hora. Em seguida, as raízes restantes de cada bulbo foram postas em contato com suas respectivas soluções por 72 horas. Após esse tempo, raízes foram coletadas e fixadas. A fixação se deu em Carnoy 3:1 (metanol:ácido acético) por 24 horas. Após a fixação, as raízes foram hidrolisadas em HCl 1N, e suas regiões meristemáticas foram excisadas para confecção de lâminas por meio da técnica de esmagamento conforme *Herrero et al.* (2012). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico em aumento de 400 x.

A citotoxicidade foi estabelecida com base na proliferação celular dos meristemas, onde se contabilizou células em intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase, e calculou-se o Índice Mitótico (IM) (Equação 4). De cada bulbo contou-se 2.000 células, totalizando 10.000 células analisadas por tratamento.

$$IM: \frac{\text{Total de células em divisão}}{10,000} \times 100 \quad (4)$$

A genotoxicidade foi definida com base no Índice de Alterações Celulares (IAC) calculado a partir do número de alterações celulares observado nos meristemas (equação 5). De cada bulbo observou-se 200 células, totalizando 1.000 células analisadas por tratamento. As categorias de células aberrantes consideradas foram micronúcleo, viscosidade, metáfase com desorganização cromossômica e ana/telófases anormais, que incluem pontes, cromossomos vagantes, desagregação cromossômica e fusos multipolares.

$$\text{IAC: } \frac{\text{Total de alterações celulares}}{1000} \times 100 \quad (5)$$

A fitotoxicidade das raízes de bulbos de *A. cepa* foi determinada com base no entumecimento, consistência, espessura e cor das raízes após 72 horas de exposição as concentrações de BS.

Para análise de viabilidade celular raízes de cada bulbo após 72 horas em contato com os seus respectivos tratamentos foram postas em solução a 0,25% do corante Azul de Evans por 60 minutos. Em seguida, foram lavadas com água destilada por 30 minutos, suas regiões meristemática foram excisadas e embebidas em 3 mL de N,N-dimetilformamida por 60 minutos. Em seguida, a absorbância do Azul de Evans por tratamento foi determinada em espectrofotômetro utilizando água destilada como branco. A viabilidade celular foi expressa como a absorbância a 600 nm, conforme Zanardo *et al.* (2009).

### 3.6 Testes de toxicidade em *E. fetida*

#### 3.6.1 Obtenção das minhocas e composição do solo tropical

As minhocas foram obtidas do minhocário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus de Francisco Beltrão, Paraná, Brasil, onde nasceram e se desenvolveram em substrato de esterco de cavalo com pó de fibra de casca de coco, na proporção de 1:1 (v:v). Para os experimentos selecionou-se organismos com idade superior a dois meses, com clitelo bem desenvolvido e peso individual entre 300 e 600 mg.

O solo artificial (SAT) utilizado nos testes de mortalidade, fuga e estresse oxidativo consistiu de uma mistura de areia fina seca e peneirada (70%), pó de caulim (20%) e fibra de coco na forma de grânulos (10%). Para todo experimento com anelídeos utilizou-se duas repetições com 10 minhocas cada. Como controle negativo utilizou-se água destilada, e como

controle positivo ácido bórico (750 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/kg de solo). O ácido bórico nessa concentração estimula o sistema nervoso e causa desidratação em *E. fetida* (NIEMEYER *et al.* 2019).

### 3.6.2 Teste de fuga

O ensaio de fuga foi realizado com base na normativa NBR ISO 17.512-1 (ABNT, 2011). Adaptou-se o solo artificial (SAT) proposto pela OECD (1987) para solo para teste de fuga. O SAT foi constituído por uma mistura de areia fina seca e peneirada (70%), caulim em pó (20%) e fibra de coco formato de clips (10%).

Para a realização do experimento distribuiu-se o SAT em recipientes retangulares de polipropileno, com altura 115 mm e dimensões 175 x 132 mm. A tampa dos recipientes foi perfurada, e o interior de cada pote foi separado com um divisor plástico removível. Para cada tratamento, em uma lateral do recipiente foi disposto 300 g de SAT com umidade ajustada para 60% da capacidade máxima de retenção de água utilizando água destilada (solo controle – Co negativo). Na outra lateral do recipiente foi disposto 300 g de SAT com umidade ajustada para 60% da capacidade máxima de retenção de água utilizando as concentrações de lodo solubilizado (solo teste) ou uma solução de ácido bórico (750 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/kg de solo) (controle positivo – Co+).

Além disso, realizou-se o controle dual, onde a solução controle (Co-) foi disposta nas duas seções do recipiente. Por meio do controle dual se verifica o atendimento a um dos critérios de validação do ensaio: a distribuição homogênea dos organismos nos recipientes testes na ausência de contaminantes. Nesse ensaio analisou-se o número de minhocas mortas durante o período de exposição. O teste é válido somente se este número for igual ou menor a 10% em cada recipiente.

Após a montagem de duas repetições biológicas para cada grupo, retirou-se o divisor plástico e colocou-se 10 minhocas na linha divisória entre os dois lados de cada recipiente, lado a lado. Os recipientes com as minhocas foram mantidos no escuro durante 48 horas e após esse período se recolocou o divisor plástico em todos os frascos, separando o solo controle e tratado. Então, realizou-se a contagem dos organismos de cada seção dos recipientes.

A análise dos dados foi realizada em termos de porcentagem de fuga, de acordo com a equação 6:

$$\% = [(N_c - N_t) / N] \times 100 \quad (6)$$

Onde:

% = porcentagem de fuga;

n<sub>C</sub> = número de minhocas encontrada da seção B (solo-controle);

nT= número de minhocas encontrada da seção A (solo-teste);

N= número total de minhocas (soma das replicadas por tratamento).

O solo é considerado muito tóxico quando 80% dos organismos expostos ou mais preferem o solo controle. Respostas negativas (ou seja, as minhocas preferiram o solo teste) são consideradas como 0% de fuga.

### 3.6.3 Taxa de mortalidade

A taxa de mortalidade em *E. fetida* foi avaliada conforme a ABNT NBR 15537 (ABNT, 2014), com algumas modificações.

Previamente, minhocas foram aclimatadas em recipientes retangulares de polipropileno, com altura de 115 mm e dimensões de 175 x 132 mm, contendo 600 g de SAT mais 8 g de esterco bovino para a alimentação dos organismos. Em cada pote colocou-se água destilada (até 60% da capacidade máxima de retenção) e 10 minhocas. Em seguida, os recipientes foram cobertos com tampas perfuradas para facilitar a oxigenação. Os potes foram incubados em estufa BOD a temperatura de  $22 \pm 2$  °C com ciclo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, por 7 dias.

Após a aclimação, as minhocas foram transferidas para outros potes com 600 g de SAT acrescidos de 8 g de esterco bovino, que continham água destilada (controle negativo – Co-) ou solução de ácido bórico (750 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/Kg de solo) (controle positivo – Co+) ou cada concentração de lodo solubilizado.

Os potes foram incubados em estufa BOD por 14 dias com a mesma temperatura e o mesmo ciclo claro/escuro que o período de aclimação. No sétimo dia os potes foram novamente pesados e a umidade foi corrigida para 60%, com o controle ou com as concentrações dos três compostos. Ademais, no sétimo dia de experimento adicionou-se mais 8 g de esterco bovino aos recipientes. No décimo quarto dia contou-se o número de minhocas mortas, transferindo o SAT dos recipientes para uma bandeja e aplicando um estímulo mecânico aos organismos para se certificar que estavam mortos. Os dados foram expressos em termos do percentual de mortalidade (Equação 7):

$$\% \text{ Mortalidade} = [nM/N] \times 100 \quad (7)$$

Onde:

% mortalidade= percentual de mortalidade;

nM= número de minhocas mortas;

N= número total de minhocas.

### **3.7 Análise enzimática de raízes de bulbos de *A. cepa* e em *E. fetida***

#### **3.7.1 Preparação das amostras**

Em *A. cepa*, para cada bulbo de cada tratamento, foi macerado a frio 50 mg de pontas de raízes em solução de 1 mL de HCl a 0,38% e 1 mL de ácido diethylenetriamino-penta acético (DTPA) a 5 mmol.L<sup>-1</sup>. As amostras foram centrifugadas a 3.700 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 3 mL do sobrenadante foi coletada e mantida congelada a -26 °C até a realização das análises. Considerou-se cinco repetições de bulbos, conforme item 2.5.

Em minhocas, os organismos sobreviventes ao teste de mortalidade (item 2.6.3) nas concentrações 12,5 e 6,25% foram triturados e homogeneizados individualmente a 10.000 rpm com triturador Ultra Turrax IKA T18 Basic durante 60 segundos em 2 mL de solução salina balanceada (LBSS). Os homogeneizados foram centrifugados durante 5 minutos. Uma alíquota de 3 mL do sobrenadante foi coletada e mantida congelada a -26 °C até a realização das análises.

#### **3.7.2 Análises enzimáticas**

##### **3.7.2.1 Atividade enzimática da catalase (CAT)**

Do extrato enzimático, foi utilizado 150 µL em solução de 2 mL de tampão fosfato de potássio (0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5), e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,0 mmol.L<sup>-1</sup>) adicionado no momento da leitura por espectrofotometria a 240 nm, por dois minutos com intervalos de dois segundos. A atividade foi determinada de acordo com a decomposição do peróxido de hidrogênio e calculada pelo coeficiente de extinção de 2,8 mmol.L<sup>-1</sup>, com resultados expressos em µmol/min/µg de proteína, método de Kraus, McKersie e Fletcher (1995) com contribuições de Azevedo *et al.* (1998).

##### **3.7.2.2 Atividade enzimática da ascorbato peroxidase (APX)**

Foram utilizados 150µL do extrato enzimático em 2 mL de solução tampão de fosfato de sódio (25 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, com 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> de EDTA), 0,5 mL de ascorbato (0,25 mmol.L<sup>-1</sup>) e acrescentado no momento da leitura 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,0 mmol.L<sup>-1</sup>). A atividade enzimática foi determinada por espectrofotometria durante dois minutos, com intervalo de dois segundos a 290 nm, e calculado com o coeficiente de extinção de 2,8 mmol.L<sup>-1</sup>, com resultados em µmol/min/µg de proteína (ZHU *et al.* 2004).



### 3.7.2.3 Atividade enzimática de guaiacol peroxidase (GPOX)

Em solução tampão de 250  $\mu\text{L}$  de fosfato-citrato (fosfato de sódio dibásico 0,2  $\text{mmol.L}^{-1}$  e ácido cítrico 0,1  $\text{mmol.L}^{-1}$ , com pH 5,0) adicionou-se 150 $\mu\text{L}$  de extrato enzimático e 25  $\mu\text{L}$  de guaiacol (0,5%), misturados em vórtex com 25  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%). A solução foi levada à estufa a 30°C por 15 minutos, adicionados 25  $\mu\text{L}$  de solução de meta bissulfito de sódio a 2%, e novamente agitado em vórtex, seguido por repouso de 10 minutos, determinado em espectrofotômetro a 450  $\text{nm}$ , por um minuto com intervalo de dois segundos. O coeficiente de extinção utilizado para os cálculos foi de 26,6  $\text{mmol.L}^{-1}$  (MATSUNO e URITANI, 1972). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$  de proteína.

### 3.7.2.4 Atividade enzimática da Superóxido Peroxidase

Em solução tampão de 2000 $\mu\text{L}$  de fosfato de potássio (fosfato de potássio dibásico e monobásico, com pH 7,5) adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático, 50  $\mu\text{L}$  de NTB (Cloro de Azul Nitrotetrazólio), 50  $\mu\text{L}$  de EDTA (0,1  $\text{mmol.L}^{-1}$ ); 50  $\mu\text{L}$  de metionina e 50 $\mu\text{L}$  de riboflavina. O extrato foi preparado em duplicata, com metade mantido no escuro e a outra metade exposta a lâmpada fluorescente de 80 W por 10 minutos. Em seguida determinadas em 560  $\text{nm}$  em espectrofotômetro, e calculado pela diferença entre amostras mantidas no claro e escuro, A SOD é expressa em  $\text{U.}\mu\text{g}^{-1}$  de proteína a unidade enzimática necessária para inibir 50% da fotorredução do NBT (SUN, OBERLEY e LI, 1988).

## **3.8 Análise de peroxidação lipídica em raízes de bulbos de *A. cepa* e em *E. fetida***

A análise de peroxidação lipídica de amostras vegetais e animais foi realizada conforme protocolo de Papastergiadis *et al.* (2012), no qual o índice de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) indica a extensão da peroxidação ocorrida nos tecidos/organismos avaliados. Para essa avaliação, meristemas de raízes foram macerados em água destilada (considerou-se cinco repetições de bulbos, conforme item 2.5.), e as minhocas sobreviventes do teste de mortalidade (item 2.3.2) nas concentrações 12,5 e 6,25% foram moídas individualmente e homogeneizadas também em água destilada com um triturador Ultra Turrax a 10.000 rpm por 60 segundos. Em seguida, os homogeneizados foram adicionados à solução de TBA (46  $\text{mmol.L}^{-1}$ ) em ácido acético glacial a 95 °C por 35 minutos, seguido de refrigeração a -26 °C e centrifugação a temperatura ambiente por 3 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram avaliados em espectrofotômetro a 532  $\text{nm}$ .

### 3.9 Análises estatísticas

Os dados obtidos por bioensaios foram testados quanto à normalidade pelo teste de Lilisford e considerados não normais. A fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo em plantas e animal foram avaliados pela Análise de Variância de Kurskal Wallis seguida do teste de Dunn ( $p \leq 0,05$ ) por meio do software Rstudio (2015). Os resultados de viabilidade celular foram plotados em regressão não linear para criar um modelo de predição em relação ao nível de toxicidade dos tratamentos. Os testes de fuga em minhocas foram analisados pelo teste de Fisher unilateral ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o software Action 6.2.3.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados da Tabela 2, a concentração de metais pesados e de patógenos no biossólido estavam abaixo do limite máximo permitido pela 498/2020 do CONAMA (BRASIL, 2020), caracterizando-o como apto a ser incorporado em solos agrícolas no Brasil. Ainda, os resultados para patógenos (ovos de helmintos, *Salmonella* spp. e coliforme termotolerantes), de acordo com essa resolução, classificaram o resíduo como B, o que permite utilizá-lo no cultivo de alimentos que não sejam consumidos crus, produtos não alimentícios, árvores frutíferas (com aplicação após a colheita) e em pastagem e forrageiras.

**Tabela 2 - Análise química e de patógenos de lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Estado do Paraná, Brasil. (continua)**

Parâmetros	Concentração biossólido	CONAMA 498/2020
pH	5,89	N.E.
Umidade	8,7464%	N.E.
Sólidos Totais	912.536,2319 mg/L	N.E.
Sólidos Totais Voláteis	518.429,9517 mg/L	N.E.
Carbono Orgânico Total	207,3700 g/kg	N.E.
Nitrogênio Total	6.765,38 mg/kg	N.E.
Nitrito	0,46 mg/kg	N.E.
Nitrato	21,59 mg/kg	N.E.
Nitrogênio Amoniacal	5.210,000 mg/L N	N.E.
Nitrogênio Kjeldahi	6.743,33 mg/kg	N.E.
Enxofre total	96,98 mg/kg	N.E.
Fósforo total	79,792 mg/kg	N.E.
<i>Metais</i>		
Parâmetros	Concentração biossólido	CONAMA 498/2020 (limite máximo permitido)
Cobre	5,022 mg/kg	4.300 mg/kg
Cromo	5,623 mg/kg	3.000 mg/kg
Mercúrio	< 0,0020 mg/kg	57 mg/kg
Molibdênio	< 0,01 mg/kg	75 mg/kg
Níquel	< 0,002 mg/kg	420 mg/kg
Selênio	< 0,010 mg/kg	100 mg/kg
Zinco	8,27 mg/kg	7.500 mg/kg
<i>Minerais</i>		
Parâmetros	Concentração biossólido	CONAMA 498/2020
Cálcio	43.830,1 mg/kg	N.E.

**Tabela 2 - Análise química e de patógenos de lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Estado do Paraná, Brasil. (continua)**

Parâmetros	Concentração bio sólido	CONAMA 498/2020
Potássio	233,702 mg/kg	N.E.
Sódio	8.989,86 mg/kg	N.E.
<i>Benzenos Clorados</i>		
Parâmetros	Concentração bio sólido	CONAMA 498/2020
1,3 diclorobenzeno	< 0,00100 mg/kg	N.C.
1,4 diclorobenzeno	< 0,00100 mg/kg	N.C.
1,2,3,4 Tetraclorobenzeno	< 0,00100 mg/kg	N.C.
1,2,3,5 Tetraclorobenzeno	< 0,00100 mg/kg	N.C.
1,2,4,5 Tetraclorobenzeno	< 0,00100 mg/kg	N.C.
1,3,5 triclorobenzeno	< 0,00100 mg/kg	N.C.
1,2 diclorobenzeno	< 0,00100 mg/kg	N.C.
Hexaclorobenzeno	< 0,00100 mg/kg	N.C.
<i>Ésteres de Ftalato</i>		
Parâmetros	Concentração bio sólido	CONAMA 498/2020
Di(2-etilhexil)ftalato	< 0,0010 mg/kg	N.C.
Dimetilftalato	< 0,0010 mg/kg	N.C.
Di-n-butilftalato	< 0,0010 mg/kg	N.C.
Di(2-etilhexil)ftalato	< 0,0010 mg/kg	N.C.
<i>Fenóis Clorados</i>		
Parâmetros	Concentração bio sólido	CONAMA 498/2020
2,4,6 triclorofenol	< 0,00100 mg/kg	N.C.
2,4 diclorofenol	< 0,100 mg/kg	N.C.
Pentaclorofenol	< 0,00100 mg/kg	N.C.
<i>Fenóis Não Clorados</i>		
Parâmetros	Concentração bio sólido	CONAMA 498/2020
Cresóis	< 0,100 mg/kg	N.C.
<i>Hidrocarbonetos Poliaromáticos (PAH)</i>		
Parâmetros	Concentração bio sólido	CONAMA 498/2020
Benzo(a)antraceno	< 0,05000 µg/kg	N.C.
Benzo(k)fluorantreno	< 0,05000 µg/kg	N.C.
Fenantreno	< 0,01000 µg/kg	N.C.
Benzo(a)pireno	< 0,05000 µg/kg	N.C.
<i>Organoclorados sintéticos</i>		
Parâmetros	Concentração bio sólido	CONAMA 498/2020
Aldrin	< 0,00100 mg/kg	N.C.
Cis-clordano	< 0,10 mg/kg	N.C.

**Tabela 2 - Análise química e de patógenos de lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Estado do Paraná, Brasil. (conclusão)**

Parâmetros	Concentração biossólido	CONAMA 498/2020
DDT	< 0,00100 mg/kg	N.C.
Dieldrin	< 0,00010 mg/kg	N.C.
Dodecacloro	< 0,00100 mg/kg	N.C.
Endrin	< 0,00100 mg/kg	N.C.
Heptacloro	< 0,00100 mg/kg	N.C.
<i>Patógenos</i>		
Parâmetros	Concentração biossólido	CONAMA 498/2020
Ovos de helmintos viáveis	< 0,25 ovo/g MS	< 0,25 ovo/g MS
Coliformes termotolerantes	< 103 NMP/g ST	< 103 NMP/g ST
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência em 10g de ST	Ausência em 10g de ST

**Nota: DDT = Dicloro-Difenil-Tricloroetano; N.E. – Considerado pela resolução, mas sem limite máximo estabelecido; N.C. – não considerado pela resolução.**

**Fonte: Autoria própria (2022).**

Os resultados para metais pesados observados (Tabela 2) corroboram a literatura sobre os tipos de compostos inorgânicos e suas concentrações comumente encontrados em lodo de esgoto sanitário (LEME e MARIN-MORALES 2009; MARTINS, SOUZA e SILVA, 2016). É importante destacar que até meados da década de 2010, como pode se observar nos trabalhos de Rank e Nielsen (1998), Srivastava, Kumar e Gupta (2005), Amin, Shah e Ali (2009), Amin (2011), Martins, Souza e Silva (2016) e Camargo *et al.* (2016), a periculosidade de lodo de esgoto sanitário ao ambiente era basicamente atribuída aos metais pesados presentes em sua constituição, principalmente ao mercúrio, em detrimento as outras classes de compostos no resíduo.

Também foram identificados e quantificados no biossólido compostos de estrutura química complexa, como benzenos clorados, ésteres de ftalato, fenóis clorados, fenóis não clorados, hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH) e organoclorados sintéticos, em concentrações menores que 0,10 mg/Kg (Tabela 1). Estudos de efeitos adversos com base em diferentes bioensaios demonstraram que esses compostos orgânicos, em sua maioria, foram tóxicos a microrganismos de solo, a plantas e a animais, além de persistentes no solo e na água (CLARKE e SMITH, 2011; ZULOAGA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2020). Tais elementos podem ser encontrados em cosméticos, produtos de higiene pessoal, medicamentos, detergentes, desinfetantes e praguicidas (SOUZA *et al.*, 2020; SANTO *et al.*, 2022).

Dessa forma, fundamentado nos resultados da Tabela 2, verificou-se uma riqueza de compostos químicos na constituição do bio sólido analisado. Porém, devido a sua origem sugere-se que, além desses, esse resíduo seja constituído por muitos outros elementos. De acordo com Souza *et al.* (2020) e Rastetter e Gerhardt (2017), é praticamente impossível identificar e quantificar todos os compostos presentes em lodo de esgoto sanitário, bem como atribuir efeitos adversos a compostos ou classes de compostos em específico no resíduo, devido a sua riqueza em constituição química. Em razão disso, e conforme afirmam esses mesmos autores, é que se torna imprescindível avaliações toxicológicas de bio sólidos dessa natureza em diferentes bio ensaios para compreender a amplitude dos efeitos biológicos que ele possa causar a diferentes ecossistemas.

Conforme os resultados de fitotoxicidade obtidos no presente estudo (Tabela 3), as sementes de *L. sativa* expostas as concentrações 100 e 50% de bio sólido solubilizado (BS) não germinaram. As sementes de *L. sativa* submetidas as concentrações 25 e 12,50%, e as sementes de *A. cepa*, *C. sativus* e *T. aestivum* expostas as concentrações 100, 50 e 25% de BS tiveram índice de germinação significativamente reduzido quando comparado aos seus respectivos controles. Também apresentaram ICR no intervalo de 0,0 a 0,8 que caracteriza inibição significativa no alongamento de radículas. As sementes dessas últimas três espécies submetidas as concentrações 12,50 e 6,25%, apesar de relevante Índice de Germinação (IG), da mesma forma, apresentaram ICR no intervalo de 0,0 a 0,8. Os resultados de germinação e de crescimento de raízes caracterizaram as concentrações de BS como fitotóxicas a *L. sativa*, *A. cepa*, *C. sativus* e *T. aestivum*.

**Tabela 3 - Fitotoxicidade de lodo de esgoto sanitário calcinado solubilizado produzido no Estado do Paraná, Brasil, a sementes e raízes de *Allium cepa* L., *Lactuca sativa* L., *Cucumis sativus* L., *Zea mays* e *Triticum aestivum*, nas concentrações 100; 50; 25; 12,50 e 6,25%. (continua)**

<i>Lactuca sativa</i> L.			
TR	G/DP (%)	IG/DP (%)	ICR/DP (%)
Co <sup>-</sup>	100,00 ± 1,32	100	1
100%	00	00*	00*
50%	00	00*	00*
25%	10,00 ± 1,08	1,09 ± 1,00*	0,09 ± 1,30*
12,25%	40,00 ± 1,00	37,58 ± 1,10*	0,79 ± 0,98*
6,125%	70,00 ± 0,95	95,00 ± 1,00	0,79 ± 1,03*
<i>Allium cepa</i> L.			
TR	G/DP (%)	IG/DP (%)	ICR/DP (%)

**Tabela 3 - Fitotoxicidade de lodo de esgoto sanitário calcinado solubilizado produzido no Estado do Paraná, Brasil, a sementes e raízes de *Allium cepa* L., *Lactuca sativa* L., *Cucumis sativus* L., *Zea mays* e *Triticum aestivum*, nas concentrações 100; 50; 25; 12,50 e 6,25%. (conclusão)**

<i>Allium cepa</i> L.			
TR	G/DP (%)	IG/DP (%)	ICR/DP (%)
Co <sup>-</sup>	96,00 ± 0,85	100	1
100%	66,00 ± 0,97	25,55 ± 0,62*	0,33 ± 0,78*
50%	80,00 ± 0,90	33,89 ± 0,54*	0,31 ± 0,55*
25%	100,00 ± 0,15	30,67 ± 0,58*	0,29 ± 0,57*
12,25%	100,00 ± 0,10	70,53 ± 0,74	0,75 ± 0,50*
6,125%	100,00 ± 0,10	80,34 ± 0,70	0,80 ± 0,75*
<i>Zea mays</i> L.			
TR	G/DP (%)	IG/DP (%)	ICR/DP (%)
Co <sup>-</sup>	98,00 ± 1,75	100	1
100%	44,00 ± 1,00	99,1 ± 0,85	1,40 ± 0,87
50%	40,00 ± 0,95	98,47 ± 0,84*	2,52 ± 0,89*
25%	60,00 ± 0,85	90,48 ± 0,79*	3,11 ± 0,60*
12,25%	56,00 ± 0,60	95,16 ± 0,75*	3,36 ± 0,55*
6,125%	58,00 ± 1,60	92,09 ± 2,00*	3,57 ± 1,55*
<i>Cucumis sativus</i> L.			
TR	G/DP (%)	IG/DP (%)	ICR/DP (%)
Co <sup>-</sup>	100,00 ± 0,10	100	1
100%	98,00 ± 0,80	4,55 ± 0,98*	0,045 ± 0,90*
50%	98,00 ± 0,70	38,82 ± 0,93*	0,40 ± 0,98*
25%	98,00 ± 0,89	40,24 ± 0,75*	0,70 ± 0,78*
12,25%	98,00 ± 0,95	90,76 ± 0,88	0,80 ± 0,92*
6,125%	100,00 ± 0,95	99,55 ± 0,85	0,79 ± 0,81*
<i>Triticum aestivum</i> L.			
TR	G/DP (%)	IG/DP (%)	ICR/DP (%)
Co <sup>-</sup>	100 ± 0,15	100	1
100%	98,00 ±	40,29 ± 0,89*	0,41 ± 0,87*
50%	98,00 ±	49,51 ± 0,89*	0,50 ± 0,55*
25%	98,00 ±	50,84 ± 0,64*	0,55 ± 0,75*
12,50%	100,00 ±	93,02 ± 0,67	0,74 ± 0,73*
6,125%	100,00 ±	99,37 ± 0,55	0,80 ± 0,70*

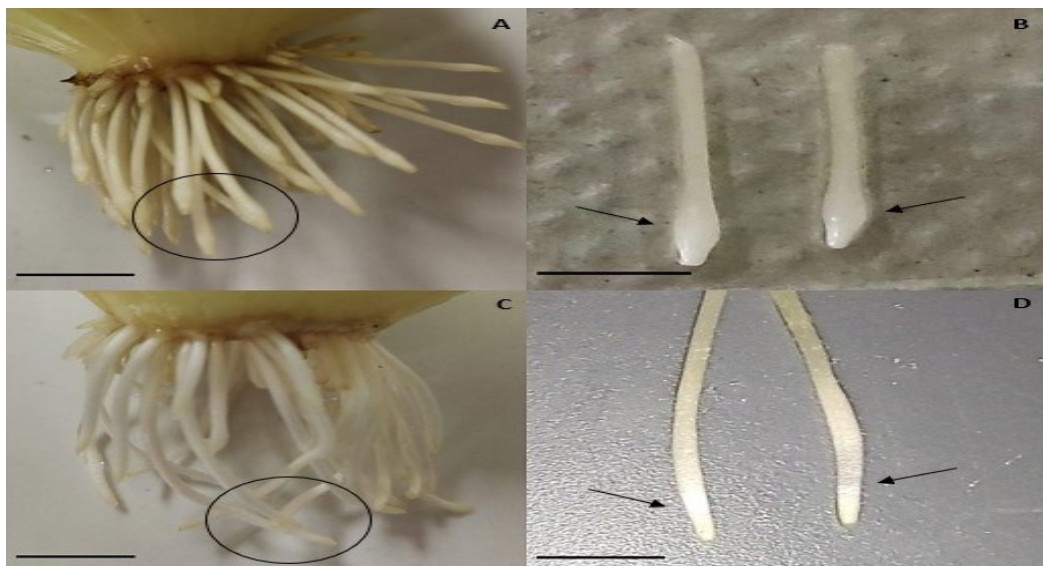
**Nota: TR: Tratamento, G: Germinação, DP: Desvio Padrão; IG: Índices de Germinação, ICR: Índice de Crescimento Relativo, Co: Controle. \*Diferenças significativas em relação ao Co<sup>-</sup> segundo teste de Kruskal-Wallis H com Dunn teste post hoc ( $p \leq 0.05$ ). A concentração 100% refere-se a solubilização de 250g de lodo de esgoto sanitário calcinado em 1L de água de torneira.**

**Fonte: Autoria própria (2022).**

Diferentemente, em *Z. mays*, as cinco concentrações de BS potencializaram a germinação de sementes e apresentaram  $ICR > 1,2$ . O ICR obtido para essa espécie nas concentrações 50; 25; 12,50 e 6,25% foi significativamente superior ao controle. Esses resultados demonstram efeito benéfico do biossólido a *Z. mays* corroborando o uso recorrente desse tipo de resíduo no cultivo de milho em solos paranaenses. Ademais, as concentrações de BS não alteraram a consistência, cor, espessura e formato das raízes de *L. sativa*, *C. sativus*, *Z. mays* e *T. aestivum*. Logo, as raízes de sementes de *A. cepa* apresentaram-se demasiadamente finas quando expostas aos resíduos.

Em bulbos de *A. cepa*, as concentrações 100; 50; 25; 12,50 e 6,25% de BS, após 72 horas exposição, promoveram um intumescimento nas raízes logo acima da região meristemática (Figura 2A e B). Sugere-se ter ocorrido espessamento e lignificação da endoderme nas raízes quando da exposição ao biossólido. Sharma e Dubey (2005) e Ramos *et al.* (2009) citam que a endoderme em raízes é um dos principais locais de alocação de metais pesados, o que pode ocasionar um inchaço no órgão e interferir drasticamente na translocação de nutrientes na planta.

**Figura 2 - Intumescimento em raízes de *Allium cepa* expostas por 72 horas a lodo de esgoto sanitário calcinado solubilizado (nas concentrações 100, 50, 25, 12.5 e 6.25%) produzido no Estado do Paraná, Brasil.**





**Nota: A) raízes de bulbos com espessamento das extremidades B) Raízes com espessamento logo acima da região meristemática, C) Bulbos do controle com raízes sem espessamento e C) raízes do controle sem espessamento. Barra: 30 µm A concentração 100% refere-se a solubilização de 250g de lodo de esgoto sanitário calcinado em 1L de água.**

**Fonte: Aatoria própria (2022).**

Em relação aos resultados de toxicidade celular (Tabela 4), verificou-se que as concentrações 100; 50; 25 e 12,50% de BS inibiram significativamente a divisão celular nos meristemas radiculares de bulbos *A. cepa*, mostrando-se citotóxicas. Esse resultado corrobora os resultados obtidos na Tabela 3, em que se observou inibição no crescimento de radículas em *L. sativa*, *A. cepa*, *C. sativus* e *T. aestivum* por essas concentrações.

De acordo com Rank e Nielsen (1997) e Herrero *et al.* (2012), o índice mitótico não deve ser inferior a 50% do valor de controle para se obter uma análise confiável de alterações celulares. As concentrações 50; 25; 12,50 e 6,25% de BS atenderam a esse critério (Tabela 4). Essas concentrações causaram número expressivo de alterações celulares nos meristemas radiculares, mostrando-se genotóxicas. As alterações observadas foram micronúcleos, desarranjos cromossômicos em metáfase e perda e desarranjos cromossômicos em anáfase (Tabela 4, Figura 3).

**Tabela 4 - Índices mitóticos, número, tipos e índice de alterações celulares observados em meristemas de raízes de bulbos de *Allium cepa* L. expostos por 72 horas a lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Estado do Parana, Brasil, nas concentrações 100; 50; 25; 12,5 e 6,25%.**

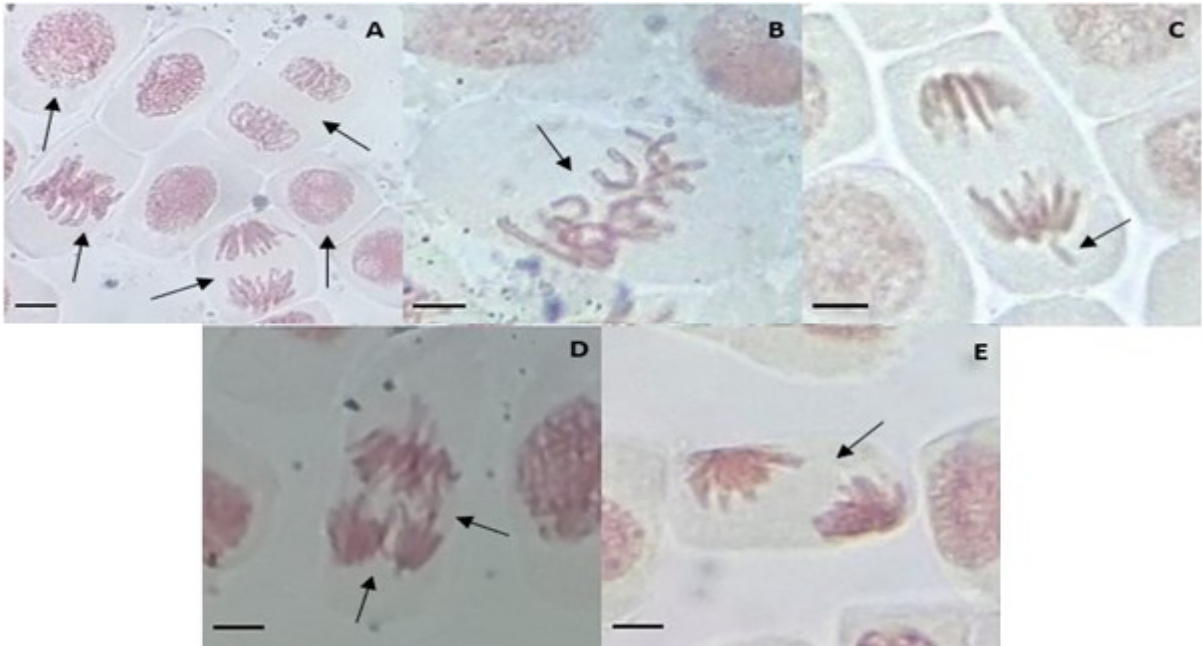
TR	Conc (%)		IM±DP (%)		
	Co		100.00 ± 0.85		
BS	100		27,40 ± 0,92*		
	50		50,70 ± 0,90*		
	25		52,15 ± 0,98*		
	12,50		55,80 ± 0,75*		
	6,25		55,50 ± 0,90*		
TR	Conc	Micronúcleo	Alterações em metáfase	Alterações em anáfase	IAC±DP
	Co	02 ± 0.28	n.d.	n.d	0,60 ± 1,78
	50	69	20	101	19,00 ± 1,29*
	25	54	17	94	16,50 ± 1,22*
	12,50	37	18	78	13,30 ± 1,09*
	6,25	07	01	17	2,50 ± 1,50*

**Nota: BS: Biossólido solubilizado; IM: Índice Mitótico, IAC: índice de Alterações Celulares; DP: Desvio Padrão, Co: Controle (água destilada), Conc: concentração, n.d.: não detectado. Os dados são expressos como porcentagem dos valores de controle. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas**

entre as concentrações e o controle, segundo o teste Kruskal-Wallis com Dunn teste post hoc ( $p \leq 0,05$ ). A concentração 100% refere-se a solubilização de 250g de lodo de esgoto sanitário calcinado em 1L de água de torneira.

Fonte: Autoria própria (2022).

**Figura 3 - Alterações celulares observadas em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. obtidas de bulbos expostos por 72 horas a lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Estado do Paraná, Brasil, nas concentrações 100, 50, 25, 12.5 e 6.25%.**



**Nota:** A) células normais em intérfase e em divisão celular; B) Micronúcleo; C) Desorganização cromossômica em metáfase; D) Perda de cromossomo em anáfase; E) Desorganização cromossômica em anáfase, com cromossomos viscosos. Células observadas em microscópio óptico em aumento de 400x.

Barra: 10  $\mu\text{m}$ . A concentração 100% refere-se a solubilização de 250g de lodo de esgoto sanitário calcinado em 1L de água.

Fonte: Autoria própria (2022).

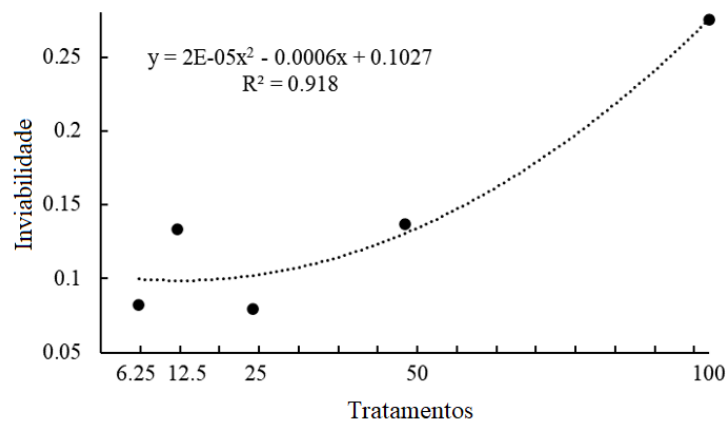
A frequência expressiva de micronúcleos demonstra efeito clastogênico do BS nas concentrações 50; 25; 12,50 e 6,25% a raízes de bulbos de *A. cepa*. Os micronúcleos (Figura 3B) são frutos do desarranjo cromossômico em metáfase, e de perda e desorganização cromossômica em anáfase (LEME e MARIN-MORALES, 2009). A frequência significativa de desorganização cromossômica em metáfase e anáfase representa distúrbios de fuso mitótico caracterizando efeito aneugênico do BS.

Apesar da concentração 100% de BS não ter sido considerada na avaliação de IAC, é importante relatar que, além das alterações observadas para as outras concentrações, ela também induziu a formação de anáfases viscosas nos meristemas radiculares (Figura 3E), mostrando-se altamente prejudicial a divisão celular das raízes (Tabela 4). Cromossomos

viscosos ocorrem pelo dobramento inadequado de fibras cromossômicas, pela desnaturação de nucleoproteínas e pela quebra e troca de fibras dobradas entre cromátides (PING *et al.*, 2012; KHANA e SHARMA, 2013). São alterações que as células não conseguem reparar e com potencial em causar morte celular (FISKESJO, 1985; LYN *et al.*, 2015).

No intuito de confirmar o potencial de causar morte avaliou-se a viabilidade celular dos meristemas radiculares de bulbos de *A. cepa* expostos as concentrações 100; 50; 25; 12,50 e 6,25% de BS pela coloração de Azul de Evans. Essa coloração baseia-se na integridade física da membrana, onde células viáveis não absorvem corante. Verificou-se que a concentração 100% de BS, em detrimento as outras concentrações, reduziu drasticamente a viabilidade celular nos tecidos meristemáticos (Figura 4) confirmando seu potencial em causar morte as células.

**Figura 4 - Efeito de lodo de esgoto sanitário calcinado solubilizado produzido no Estado do Paraná, Brasil, nas concentrações 100; 50; 25; 12,50 e 6,25%, sobre a viabilidade celular em meristemas de raízes de bulbos de *Allium cepa* L. expostos por 72 horas ao resíduo.**



**Nota: A concentração 100% refere-se a solubilização de 250g de lodo de esgoto sanitário calcinado em 1L de água de torneira.**

**Fonte: Autoria própria (2022).**

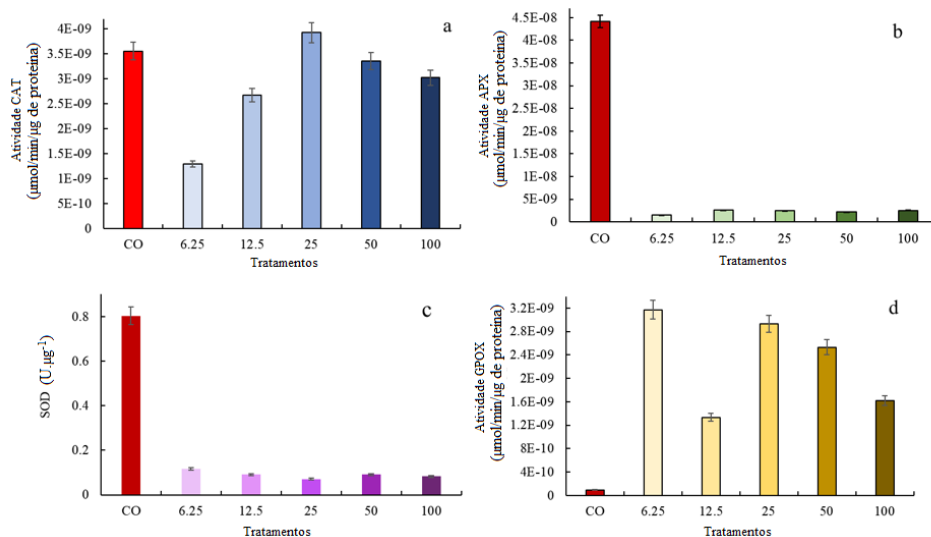
Os resultados de toxicidade obtidos em plantas estão de acordo com os trabalhos de Rank e Nielsen (1998), Srivastava, Kumar e Gupta (2005), Amin, Shah e Ali (2009), Amin (2011), Martins, Souza e Silva (2016) e Camargo *et al.* (2016), que avaliaram os potenciais fitotóxico, citotóxico ou/e genotóxico de lodo de esgoto sanitário em plantas. No entanto, nesses estudos não se avaliou o estresse oxidativo causado pelo resíduo a plantas não sendo possível aprofundar a discussão de como o lodo desencadeia a fitotoxicidade e a toxicidade celular.

Metais pesados e poluentes orgânicos podem interagir com a maquinaria celular, como por ligação ao DNA, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células (MATEUCA

*et al.*, 2006; MARTINS, SOUZA e SILVA, 2016 b; SOUZA *et al.*, 2020). Em plantas, a CAT, APX, GPOX e SOD são as principais enzimas de proteção contra danos oxidativos nas folhas, raízes e sementes (CORDOBA-PEDREGOZA *et al.*, 2003). Ao avaliar o comportamento enzimático de meristemas de raízes de bulbos de *A. cepa* expostos as cinco concentrações de BS (Figura 5) verificou-se que todas interferiram no comportamento de enzimas antioxidantes (Figura 5b).

Com base nos resultados da Figura 5, a enzima CAT teve sua atividade mantida próxima a atividade do controle (Figura 5a), enquanto que as enzimas APX e SOD foram drasticamente reduzidas nas raízes durante a exposição ao BS (Figura 5b e c). A enzima GPOX foi a única a apresentar aumento de atividade quando da exposição das raízes ao biossólido (Figura 5d). A não alteração de CAT foi um indicativo de não produção excessiva de  $H_2O_2$  nas células. No entanto, a inibição significativa da APX demonstrou formação em excesso de radicais hidroxilas ( $OH^-$ ) nos meristemas de raízes. Para a SOD explica-se que a relação cobre/zinco é um dos cofatores metálicos responsáveis pelo equilíbrio de ativação dessa enzima no controle da produção de  $OH^-$ , e o aumento ou diminuição nas concentrações desses metais pode inativar sua ação antioxidante (GUPTA e HUANG, 2014). Nos resultados de análises químicas do biossólido (Tabela 2) o cobre e o zinco foram os metais com maior quantidade observada, e suas concentrações podem ter causado a inibição da SOD, contribuindo para o excesso de  $OH^-$  nos meristemas de raízes.

**Figura 5- Atividade das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), superóxido redutase (SOD) e guaiacol peroxidase (GPOX) em raízes de bulbos de *Allium cepa* L. expostas por 72 horas a lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Estado do Paraná, Brasil, nas concentrações 100, 50, 25, 12.5 e 6.25%.**



**Nota: A concentração 100% refere-se a solubilização de 250g de lodo de esgoto sanitário calcinado em 1L de água.**

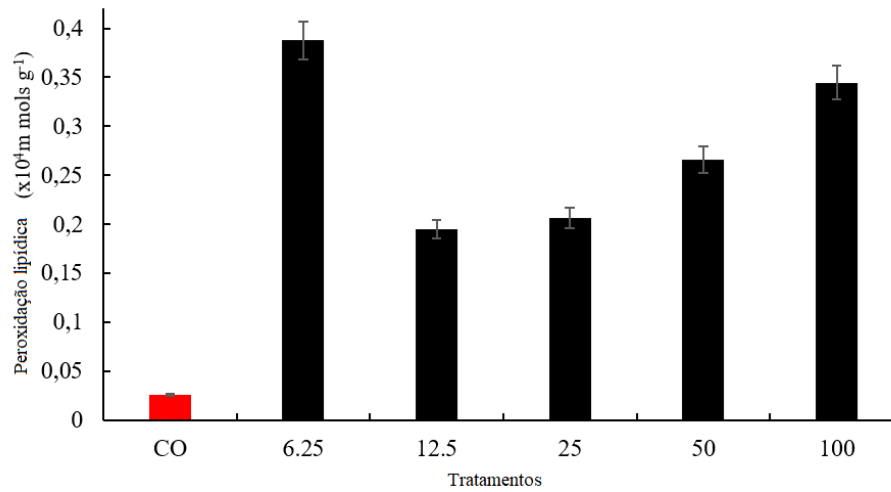
**Fonte: A autoria própria (2022)**

Altas concentrações de  $\text{OH}^-$  nas células causam a parada do ciclo celular pela inibição da duplicação de DNA, bem como ocasionam desarranjos e quebras cromossômicas, comprometendo o crescimento das plantas (SANTO *et al.*, 2022). Assim, a incapacidade dos meristemas de raízes de bulbos de *A. cepa* de se proteger dos radicais  $\text{OH}^-$  produzidos pelas concentrações de BS (Figura 3) permite explicar os resultados de citotoxicidade e genotoxicidade obtidos nesse estudo (Tabela 4) e compreender os resultados de fitotoxicidade observados para *L. sativa*, *A. cepa*, *C. sativus* e *T. aestivum* (Tabela 3).

A enzima GOPX encontrou-se ativa nos meristemas de meristemas expostos as cinco concentrações de BS (Figura 5 d) confirmando o excesso de EROs nas células. Sua elevada atividade sugere peroxidação lipídica nas células (SINGH *et al.*, 2017). A GPOX é uma enzima apoplástica que em plantas está diretamente ligada ao espessamento de parede celular na endoderme pela polimerização de lignina e suberina (PODGÓRSKA, BURIAN e SZAL, 2017). O espessamento da parede celular em células da endoderme ficou evidente nas raízes de bulbos de *A. cepa* expostos por 72 horas as concentrações de 100; 50; 25 e 12,5% de BS (Figura 2).

Na Figura 6 observa-se que todas as concentrações de BS causaram peroxidação lipídica aos meristemas radiculares de bulbos de *A. cepa*, corroborando aos resultados para a enzima GPOX (Figura 5d). Os principais produtos da peroxidação lipídica são frações contendo hidroxilas, hidroperoxilas, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e ligações duplas trans, extremamente danosos as células (ANJUM *et al.*, 2015).

**Figura 6 - Peroxidação lipídica em raízes de bulbos de *Allium cepa* L. expostos por 72 horas a lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Estado do Paraná, Brasil, nas concentrações 100, 50, 25, 12,50 e 6,25%.**

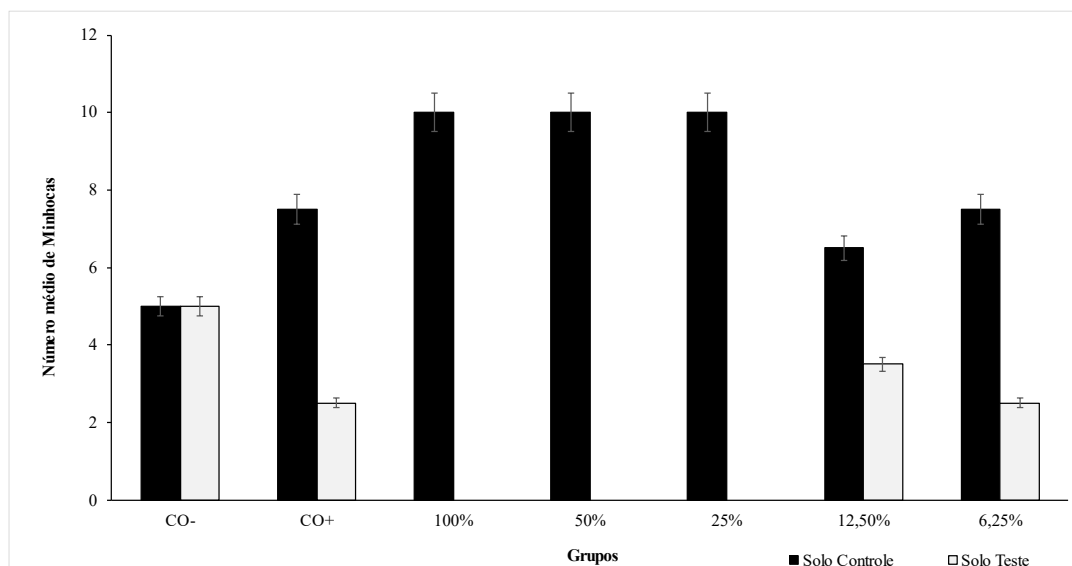


**Nota: A concentração 100% refere-se a solubilização de 250g de lodo de esgoto sanitário calcinado em 1L de água de torneira.**

**Fonte: Autoria própria (2022)**

Na Figura 7 estão plotados os resultados de distribuição das minhocas *E. fetida* entre o solo controle e o solo teste com BS. A distribuição observada validou os resultados do teste de fuga obtidos nesse estudo, uma vez que as minhocas se distribuíram de forma satisfatória no controle negativo, com 50 e 50% para cada lado. Para o controle positivo, observou-se que a maior parte das minhocas migraram para o solo com água destilada, repelindo o solo com ácido bórico.

**Figura 7 - Distribuição de minhocas *E. fetida* nos diferentes grupos avaliados entre os compartimentos solo controle e solo com lodo de esgoto calcinado solubilizado produzido no Paraná, Brasil nas concentrações 100; 50; 25; 12,5 e 6,25%.**

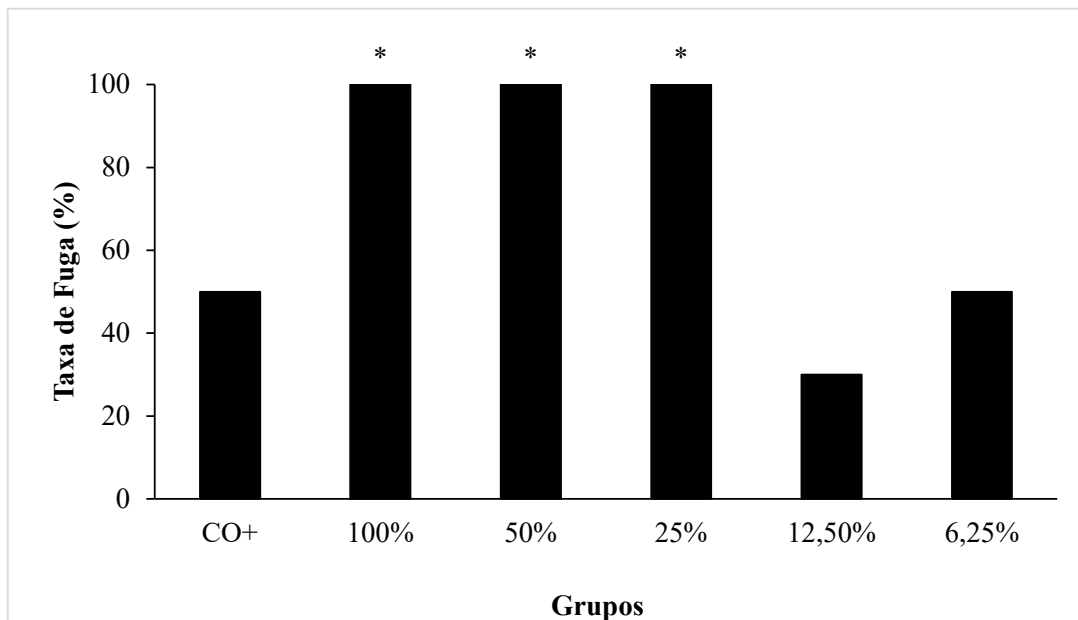


**Nota: CO-: Controle negativo dual; CO+: Controle positivo. A concentração 100% refere-se a solubilização de 250g de lodo de esgoto sanitário calcinado em 1L de água.**

**Fonte: Aatoria própria (2022)**

No teste de fuga (Figura 8), nas concentrações 100, 50 e 25%, todas as minhocas repeliram o solo tratado com BS. Para as concentrações 12,50 e 6,25% a taxa de fuga (Figura 8) das minhocas foi de 30 e 50%, respectivamente. De acordo com a ISO (2008), porcentagens de escape abaixo de 20% caracterizam ausência de efeito tóxico, de 20 a 80% caracterizam efeito tóxico com fuga, e acima de 80% evidencia elevada toxicidade com perda de habitat por esses organismos.

**Figura 8 – Taxa de fuga de minhocas *E. fetida* nos diferentes grupos avaliados com lodo de esgoto calcinado solubilizado produzido no Paraná, Brasil nas concentrações 100; 50; 25; 12,5 e 6,25%.**



**Nota: CO<sup>+</sup>: Controle positivo. A concentração 100% refere-se a solubilização de 250g de lodo de esgoto sanitário calcinado em 1L de água. \* Resultado estatisticamente significativo pela prova exata de Fischer (p<0,05).**

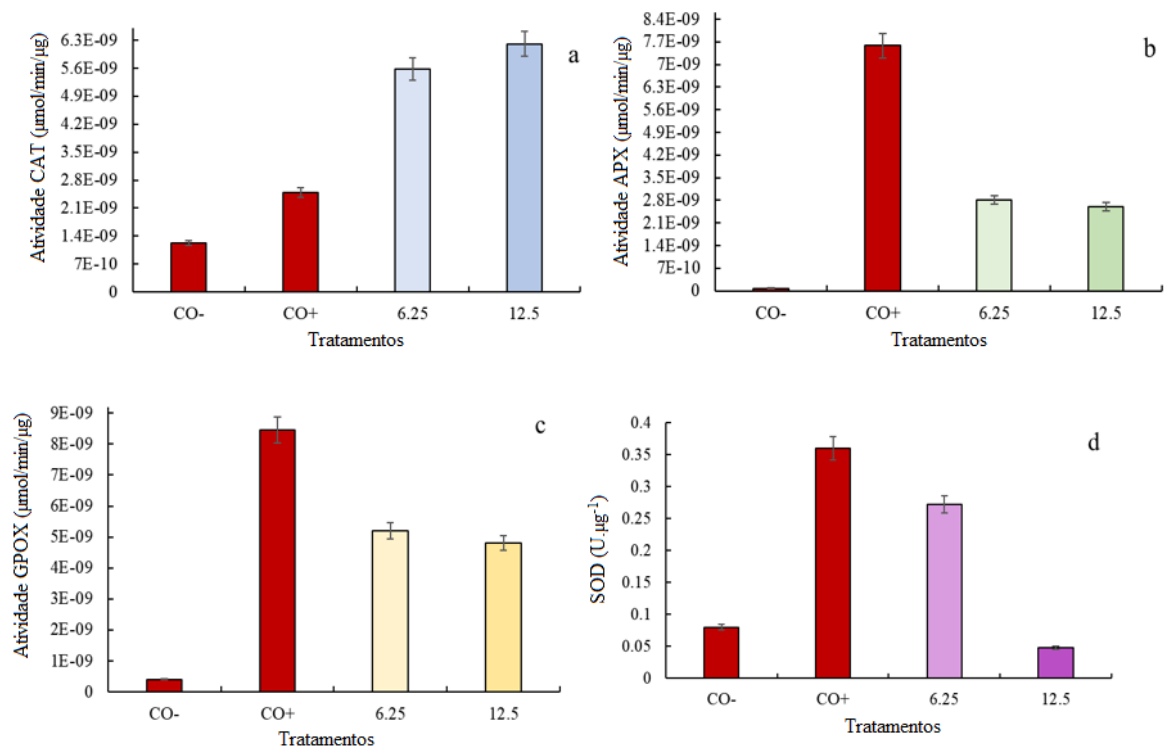
**Fonte: Aatoria própria (2022)**

No teste de mortalidade, todas as minhocas expostas por 14 dias a solos com a presença das concentrações 100, 50 e 25% de BS morreram. Ainda, a concentração 12,5% causou a morte de 41% dos organismos, enquanto que a concentração 6,25% não causou morte. Estudos de efeitos adversos em minhocas a lodo de esgoto sanitário foram realizados por Dominguez-Crespo *et al.* (2012) e Nahmani, Hodson e Black (2007), porém, esses trabalhos não forneceram

maiores informações em nível subcelular, o que por sua vez, permite compreender os mecanismos associados à toxicidade desse tipo de resíduo em animais.

Em avaliação da atividade enzimática em minhocas sobreviventes aos testes de mortalidade com as concentrações 12,50 e 6,25% de BS (Figura 9), observou-se que todas as enzimas, com bases em seus respectivos controles negativos, se mantiveram ativas nesses animais. A enzima CAT foi a que apresentou maior atividade (Figura 9 a), demonstrando acúmulo de peróxido de hidrogênio nas células desses animais. Tal condição foi confirmada pela atividade da APX (Figura 9b) que se mostrou abaixo da atividade da CAT e do controle positivo. A GPOX manteve-se ativa para as duas concentrações consideradas (Figura 9c), embora abaixo do controle negativo. A SOD foi inibida apenas para a concentração 12,50% do BS (Figura 9d).

**Figura 9 - Atividade das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPOX) e Superóxido redutase (SOD) em *Eisenia fetida* Sav. expostas por 14 dias a lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Estado do Paraná, Brasil, nas concentrações 12,50 e 6,25%.**



**Nota:** CO-: controle negativo (água destilada), CO+: controle positivo (ácido bórico). A concentração 100% refere-se a solubilização de 250g de lodo de esgoto sanitário calcinado em 1L de água de torneira.

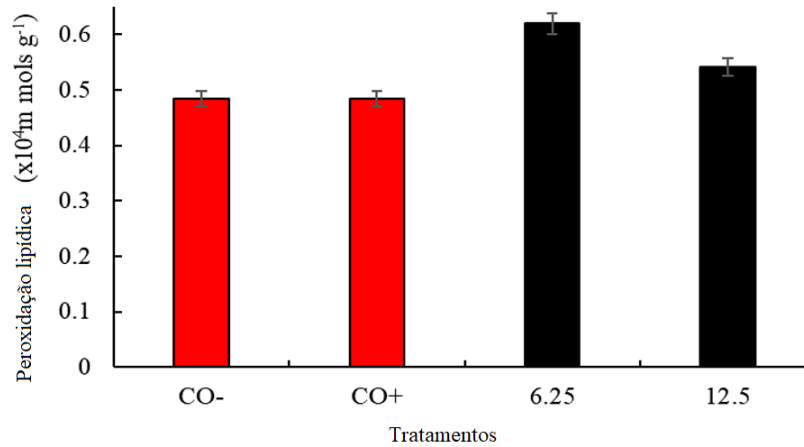
Fonte: Autoria própria (2022)

Os indivíduos que sobreviveram aos 14 dias de experimento não apresentaram elevada peroxidação lipídica (Figura 9), no entanto a atividade da CAT e da GPOX (Figura 8 a e c) indicam que uma exposição mais prolongada as concentrações 12,50 e 6,25% de BS poderá



causar peroxidação e causar a morte dos organismos. Com base nos resultados de fuga (Figura 8), mortalidade e de estresse oxidativo (Figura 9) verificou-se alta periculosidade do bio-sólido analisado a *E. fetida*.

**Figura 10- Peroxidação lipídica em *Eisenia fetida* Sav expostas por 14 a lodo de esgoto sanitário calcinado produzido no Estado do Paraná. Brasil, nas concentrações 12,50 e 6,25%.**



**Nota:** CO<sup>-</sup>: controle negativo (água destilada), CO<sup>+</sup>: controle positivo (ácido bórico). A concentração 100% refere-se a solubilização de 250g de lodo de esgoto sanitário calcinado em 1L de água de torneira.

**Fonte:** Autoria própria (2022)

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do bio sólido ter atendido a legislação brasileira 498/2020 do CONAMA (Brasil, 2020) quanto aos parâmetros químicos e de potencial de patógenos, o mesmo se mostrou altamente tóxico a plantas e animal.

No Paraná, o tratamento de efluentes sanitários é igual para todas as UGL e os hábitos de vida da população em todas as regiões do estado são muito semelhantes. Ademais, todas as regiões do Paraná têm como fonte de renda, principalmente, a agricultura e, conforme AESBE (2022), utilizam de forma recorrente lodo de esgoto sanitário calcinado como fertilizante de solos para produção de milho e soja.

Uma vez que o lodo sanitário calcinado aqui analisado demonstrou potencial em causar sérios danos a espécies vegetais e animal, principalmente, pelo amplo estresse oxidativo desencadeado, deve-se questionar sobre a permanência no solo dos elementos químicos que o constitui e os efeitos adversos sobre outros organismos, como bactérias, fungos e insetos. Os efeitos sobre a diversidade biológica também devem ser considerados, como o risco de solos expostos a esse tipo de bio sólido tornar-se seletivo a espécies, reduzindo diversidade de organismos.

Portanto, na forma como são disponibilizados a agricultores paranaenses, os bio sólidos de origem sanitária são altamente tóxicos, necessitando prementemente que as UGL no estado realizem manejo adequado ou cessem sua disponibilização a população. Ademais, a Resolução 498/2020 do CONAMA (Brasil, 2020) deve ser revista no tocante que os testes ecotoxicológicos são essenciais para avaliar a periculosidade de lodo de esgoto sanitário e devem ser realizados antes da sua disponibilização a população.

O presente estudo traz elementos que avançam na compressão de como bio sólidos de origem sanitária desencadeiam fitotoxicidade e toxicidade celular em diferentes organismos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 10006**: procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos. 2ª Ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 15537**: ecotoxicologia terrestre: ecotoxicidade aguda: método de ensaio para minhocas. Rio de Janeiro: ABNT, 2014.

AESB. Associação Brasileira das Empresas Estaduais de Saneamento. **Lodo gerado a partir do esgoto é alternativa sustentável para agricultura**. Disponível em: <https://aesbe.org.br/novo/lodo-gerado-a-partir-do-esgoto-e-alternativa-sustentavel-para-agricultura/>. Acesso em: 28 set. 2022.

AMIN, A. W. Evaluation of the Genotoxicity of Residual Repeated Applications of Sewage Sludge on M<sup>2</sup> Meocytes of Zea Plants. **Research Journal of Environmental Toxicology**, v. 5, n. 4, p. 235, 2011.

AMIN, N.; SHAH, M. T.; ALI, K. Raw mix designing and clinkerization high strength portland cement from the raw material of Darukhula Nizampur, District Nowshera, NWFP, Pakistan. **Mag. Concr. Res**, v. 61, n. 10, p. 779-785, 2009.

ANJUM, N. A.; *et al.* Lipids and proteins—major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 6, p. 4099-4121, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3917-1>. Acesso em: 21 jun. 2022.

AZEVEDO, R. A. D.; *et al.* Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.104021.x>. Acesso em: 08 mar. 2022.

AZEVEDO, A. R.; CORONAS, M. V. Uso de testes de fuga com minhocas *Eisenia andrei* e *Eisenia fetida* para identificação da toxicidade de agrotóxicos no Brasil: Uma breve revisão da literatura. **Ciência e Natura**, p. 18-26, 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.5902/2179460X35495> . Acesso em: 20 ago. 2022.

BABIĆ, S.; *et al.* Sewage sludge toxicity assessment using earthworm *Eisenia fetida*: can biochemical and histopathological analysis provide fast and accurate insight?. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 12, p. 12150-12163, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6097-3>. Acesso em: 27 jul. 2022.

BARBOSA, L. M. S. **Avaliação da fitotoxicidade e citogenotoxicidade de lodo gerado no tratamento de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas – MG, 2016. Disponível em <https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/1054>. Acesso em: 12 jul. 2022.

BERTAN, A.S.; *et al.* Assessment of phytoremediation potencial of *Allium cepa* L. in raw sewage treatment. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, p. 431-436, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.214278>. Acesso em: 07 jun. 2022.

BETTIOL, W.; CAMARGO, A. C. A disposição de Lodo de Esgoto em Solo Agrícola. In: **Lodo de esgoto: impactos ambientais na agricultura / editores técnicos, Wagner Bettiol, Otávio Antonio de Camargo.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. 349p. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/14956/1/2006PL028.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2022.

BIRUK, L. N.; *et al.* Toxicity and genotoxicity assessment in sediments from the Matanza-Riachuelo river basin (Argentina) under the influence of heavy metals and organic contaminants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 302-311, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.09.024>. Acesso em: 29 jul. 2022.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução nº 498, de 19 de agosto de 2020.** Define critérios e procedimentos para produção e aplicação de biossólido em solos, e dá outras providências. Diário Oficial da União. 21 ago

2020;161(Seção 1):265-69. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-n-498-de-19-de-agosto-de-2020-27346797>.

BREMM, R.; *et al.* Potencial de uso de lodo de esgoto na cultura do milho em latossolo argiloso no oeste do Paraná. **Brazilian Journal of Environmental Sciences (Online)**, n. 23, p. 17-24, 2012. Disponível em: [http://rbciamb.com.br/index.php/Publicacoes\\_RBCIAMB/article/view/328](http://rbciamb.com.br/index.php/Publicacoes_RBCIAMB/article/view/328). Acesso em: 03 jul. 2022.

CAMARGO, F. P.; *et al.* Removal of toxic metals from sewage sludge through chemical, physical, and biological treatments—a review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 12, p. 1-11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3141-3>. Acesso em: 27 set. 2022.

CESAR, R. G.; *et al.* Toxicity assessment of latosols and chernosols amended with sewage sludge using bioassays with *Eisenia andrei* earthworms. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 31, n. 2, p. 53-60, 2008. Acesso em: 13 jul. 2022.

CHAGAS, W. F. **Estudo de patógenos e metais em lodo digerido bruto e higienizado para fins agrícolas, das estações de tratamento de esgotos da ilha do governador e da penha no estado do Rio de Janeiro**. 102 f. Dissertação (Mestrado) Fundação Oswaldo Cruz, ENSP, 2000. Disponível em: <http://portaldesicict.fiocruz.br/pdf/FIOCRUZ/2000/chagaswfm/capa.pdf>. Acesso em: 09 jul. 2022.

CLARKE, B. O.; SMITH, S. R. Review of ‘emerging’ organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. **Environment international**, v. 37, n. 1, p. 226-247, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.06.004>. Acesso em: 27 jul. 2022.

CÓRDOBA-PEDREGOSA C.; *et al.* Zonal changes in ascorbate and hydrogen peroxide contents, peroxidase, and ascorbate-related enzyme activities in onion roots. **Plant Physiology**, v. 131, n. 2, p. 697-706, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.012682>. Acesso em: 25 jul. 2022.

COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M. **Uso agrícola de lodo de esgoto: Avaliação após a Resolução nº 375 do CONAMA**. Botucatu: FEPAF, 2010. 407p.

D'OLIVEIRA, P. S. Uso agrícola de biossólidos. **Uso de Resíduos Sólidos Urbanos na Produção de Flores e Plantas Ornamentais**. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, v. 3, p. 67-77, 2006. Acesso em: 29 jul. 2022.

DATTA, S.; *et al.* Avoidance behavior of *Eisenia fetida* and *Metaphire posthuma* towards two different pesticides, acephate and atrazine. **Chemosphere**, v. 278, p. 130476, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130476>. Acesso em: 12 maio 2022.

DE PAULA J. R.; *et al.* Produção de mudas florestais utilizando lodo de esgoto estabilizado. **Revista Brasileira de Engenharia de Biossistemas**, v. 3, n. 3, p. 269-276, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.18011/bioeng2009v3n3p269-276>. Acesso em: 26 jul. 2022.

DOMINGUEZ-CRESPO, M. A.; *et al.* Kinetics of hydrogen evolution reaction on stabilized Ni, Pt and Ni–Pt nanoparticles obtained by an organometallic approach. **international journal of hydrogen energy**, v. 37, n. 6, p. 4798-4811, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.12.109>. Acesso em: 23 mar. 2022.

EID, E. M.; *et al.* The effects of different sewage sludge amendment rates on the heavy metal bioaccumulation, growth and biomass of cucumbers (*Cucumis sativus* L.). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 19, p. 16371-16382, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9289-6>. Acesso em: 29 jul. 2022.

EPA U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Ecological effects test guidelines (OPPTS 850.4200): Seed germination/ root elongation toxicity test. 1996.

FERNANDES, F.; SOUZA, S. G. Estabilização de lodo de esgoto. **Resíduos sólidos do saneamento: Processamento, reciclagem e disposição final**, v. 1, p. 32-57, 2001.

FERON, G. **Avaliação do tratamento e da destinação do lodo de esgoto da estação de tratamento de esgoto do município de Francisco Beltrão/PR**. 2018. 186 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Geografia, Programa de Pós-Graduação, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Francisco Beltrão-PR, 2018. Disponível em: <https://tede.unioeste.br/handle/tede/3727>. Acesso em: 27 ago. 2022.

FIJALKOWSKI, K.; *et al.* The presence of contaminations in sewage sludge—The current situation. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 1126-1136, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.068>. Acesso em: 16 ago. 2022.

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

FRÂNCICA, L. S.; *et al.* Antiproliferative, genotoxic and mutagenic potential of synthetic chocolate food flavoring. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.243628>. Acesso em: 27 ago. 2022.

FRANCO, H. A.; *et al.* Ecotoxicidade de lixiviado de aterro sanitário na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e pepino (*Cucumis sativus* L.). **Revista de Estudos Ambientais**, v. 19, n. 1, p. 36-43, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.7867/1983-1501.2017v19n1p36-43>. Acesso em: 14 jul. 2022.

GOMES, S. B. V.; NASCIMENTO, C. W. A.; BIONDI, C. M. Produtividade e composição mineral de plantas de milho em solo adubado com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, p. 459-465, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-43662007000500002>. Acesso em: 03 jul. 2022.

GONZAGA, M. I. S.; *et al.* Aged biochar changed copper availability and distribution among soil fractions and influenced corn seed germination in a copper-contaminated soil. **Chemosphere**, v. 240, p. 124828, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124828>. Acesso em: 03 ago. 2022.

GUEVARA, M. D. F.; *et al.* Fitotoxicidade em águas residuárias domésticas utilizando sementes como bioindicadores. **Revista DAE**, v. 67, n. 216, p. 44-51, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4322/dae.2019.014>. Acesso em: 27 ago. 2022.

GUIMARÃES, J. C. S.; CORDEIRO, J.; VITORINO, D. C. F. R. Use of sewage sludge in agriculture: a scientometric analysis. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. e479391, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.17648/rsd-v7i9.391>. Acesso em: 15 jul. 2022.

GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. **International journal of genomics**, v. 2014, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/701596>. Acesso em: 03 jan. 2022.

HERRERO, O.; *et al.* Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 743, n. 1-2, p. 20-24, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.12.028>. Acesso em: 12 fev. 2022.

ISO, ISO. **17512-1** Soil quality-avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour: Part 1. tests with earthworms (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*). 2008. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/38402.html>. Acesso em 21 dez. 2021.

KHANNA, N.; SHARMA, S. *Allium cepa* root chromosomal aberration assay: a review. **Indian journal of pharmaceutical and biological research**, v. 1, n. 03, p. 105-119, 2013. Acesso em: 13 nov. 2021.

KNOPIK, M. A.; *et al.* Aporte de nutrientes em solos tratados com lodo de esgoto: estudo de caso da região de Campo Mourão, Noroeste do Paraná. **Revista Brasileira de Planejamento e Desenvolvimento**, v. 7, n. 3, p. 379-389, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3895/rbpd.v7n3.8597>. Acesso em: 30 jul. 2022.

KRAUS, T. E.; MCKERSIE, B. D.; FLETCHER, R. A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of**



**Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 570-576, 1995. Disponível em:  
[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81790-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81790-6). Acesso em: 27 nov. 2021.

KUMAR, M. *et al.* Onion (*Allium cepa* L.) peels: A review on bioactive compounds and biomedical activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112498, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112498>. Acesso em: 12 jul. 2022.

LAITANO, K. S.; MATIAS, W. G. Testes de toxicidade com *Daphnia magna*: uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 43-47, 2006. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.5132/jbse.2006.01.009>. Acesso em: 24 nov. 2021.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation research/reviews in mutation research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>. Acesso em: 19 set. 2022.

LISBOA, R. M.; *et al.* Ecotoxicological responses of *Eisenia andrei* exposed in field-contaminated soils by sanitary sewage. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 214, p. 112049, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112049>. Acesso em: 27 ago. 2022.

LIN, Y. T.; *et al.* Pulled polymer loops as a model for the alignment of meiotic chromosomes. **Physical Review Letters**, v. 115, n. 20, p. 208102, 2015. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.115.208102>. Acesso em: 28 set. 2022.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/27395>. Acesso em: 08 jul. 2022.

MAKIYAMA, F. T.; PIRES, M. S. G.; POLETTI, E. C. C. Análise da toxicidade de lodo de esgoto em sementes. **Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP**, n. 26, 2018. Disponível em: <http://doi:10.20396/revpibic262018437>. Acesso em: 27 jun. 2021.

MARTINS, M. N. C.; SOUZA, V. V.; SILVA S. T. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 148, p. 481-486, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.071>. Acesso em: 14 jan. 2022.

MARTINS, M. N. C.; SOUZA, V. V.; SILVA, S. T. Genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on higher plants. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 124, p. 489-496, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.031>. Acesso em: 26 set. 2022.

MATEUCA, Raluca *et al.* Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1515-1531, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.004>. Acesso em: 08 ago. 2022.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and cell Physiology**, v. 13, n. 6, p. 1091-1101, 1972. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a074815>. Acesso em: 13 jun. 2022.

MAY, D.; *et al.* Efeito de extratos de casca de café (*Coffea arabica* L.) na germinação e crescimento de pepino (*Cucumis sativus* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 2, 2011. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1712>. Acesso em: 18 jun. 2022.

MAZZEO, D. E. C.; *et al.* Monitoramento da atenuação natural da toxicidade de um lodo de esgoto utilizando o teste *Allium cepa*. **Ecological Indicators**, vol. 56, pág. 60–69, conjunto. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.03.026>. Acesso em: 23 nov. 2021.

MENDES, S. A.; *et al.* Prospecting for Phytotoxicity and Enzymatic Modulation of Waters from Springs in the Surroundings of Campo Mourão, State of Paraná, Brazil, in *Lactuca sativa* L. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 232, n. 2, p. 1-10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05003-8>. Acesso em: 29 jul. 2022.

NAHMANI, J.; HODSON, M. E.; BLACK, S. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. **Environmental pollution**, v. 145, n. 2, p. 402-424, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.04.009>. Acesso em: 14 set. 2022.

NASCIMENTO, A. L.; *et al.* Metais pesados no solo e mamoneira adubada com biossólido e silicato de cálcio e magnésio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, p. 505-511, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v19n5p505-511>. Acesso em: 01 jun. 2022.

NIEMEYER, J. C.; *et al.* Ensaio de comportamento de fuga. 2019. In: NIVA, C. C.; BROWN, G. G. (Ed.). **Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. Cap. 13, p. 199-208. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1117954>. Acesso em: 06 jul. 2022.

NOGUEIRA, T. A. R.; *et al.* Cádmio, cromo, chumbo e zinco em plantas de milho e em Latossolo após nove aplicações anuais de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2195-2207, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832008000500040>. Acesso em: 29 set. 2022.

OCDE, 1984. Terrestrial plants, Growth Test: Seedling Emergence and Seed Growth Test. Chemical Testing Guideline 208.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development (1987) Earthworm, Acute Toxicity Tests. Testing Guideline **No. 207** OECD Publications Service, Paris. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-207-earthworm-acute>. Acesso em: 03 fev. 2022.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development (2006) Land Plants: Growth Test. Chemical Testing Guideline **No. 208** OECD Publications Service, Paris. <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-208-terrestrial>. Acesso em: 03 dez. 2021.

PAGANINI, W. S.; SOUZA, A.; BOCCHIGLIERI, M. M. Avaliação do comportamento de metais pesados no tratamento de esgotos por disposição no solo. **Engenharia Sanitária e**

**Ambiental**, v. 9, p. 225-239, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-41522004000300009>. Acesso em: 17 fev. 2022.

PAPASTERGIADIS, A.; *et al.* Malondialdehyde measurement in oxidized foods: evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 38, p. 9589-9594, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf302451c>. Acesso em: 21 jul. 2022.

PARANÁ. SEMA – Secretaria Estadual do Meio Ambiente. **Resolução nº 021, de 22 de abril de 2009**. Dispõe sobre licenciamento ambiental, estabelece condições e padrões ambientais e dá outras providências, para empreendimentos de saneamento. Curitiba: SEMA, 2009. Disponível em: [http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao\\_ambiental/Legislacao\\_estadual/RESOLUCOES/RESOLUCAO\\_SEMA\\_21\\_2009\\_LICENCIAMENTO\\_PADROES\\_AMBIENTAIS\\_SANEAMENTO.pdf](http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao_ambiental/Legislacao_estadual/RESOLUCOES/RESOLUCAO_SEMA_21_2009_LICENCIAMENTO_PADROES_AMBIENTAIS_SANEAMENTO.pdf). Acesso em: 02 fev. 2022.

PING, K. Y.; *et al.* Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: an *Allium cepa* assay. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7782-7791, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules17077782>. Acesso em: 26 maio 2022.

PIRES, A. M. M.; MATTIAZZO, M. E.; ANDRADE, C. A. **Fitodisponibilidade de metais pesados em solos tratados com lodo de esgoto: a importância do acúmulo na raiz**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 2005, Recife/PE. Anais... Recife/PE: IAC, 2005. p. 1-4. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/127323/1/2005AA-093.pdf>. Acesso em: 01 out. 2022.

PODGÓRSKA, Anna; BURIAN, Maria; SZAL, Bożena. Extra-cellular but extra-ordinarily important for cells: Apoplastic reactive oxygen species metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1353, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01353>. Acesso em: 01 out. 2022.

POGGERE, G. C.; *et al.* Lodos de esgoto alcalinizados em solos do estado do Paraná: Taxa de aplicação máxima anual e comparação entre métodos para recomendação

agrícola. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 17, p. 429-438, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-41522012000400010>. Acesso em: 21 jun. 2022.

RAMÍREZ, W. A.; *et al.* Phytotoxic effects of sewage sludge extracts on the germination of three plant species. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 8, p. 834-844, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0246-5>. Acesso em: 25 jun. 2022.

RAMOS, S. J.; *et al.* Uso do silício na redução da toxidez de zinco em mudas de eucalipto. **Interciencia**, v. 34, n. 3, p. 189-194, 2009. Disponível em: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442009000300009&lng=es&nrm=iso](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442009000300009&lng=es&nrm=iso). Acesso em: 30 jun. 2022.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 390, n. 1-2, p. 121-127, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(97\)00008-6](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(97)00008-6). Acesso em: 10 set. 2022.

RASTETTER, N.; GERHARDT, A. Toxic potential of different types of sewage sludge as fertiliser in agriculture: ecotoxicological effects on aquatic, sediment and soil indicator species. **Journal of soils and sediments**, v. 17, n. 1, p. 106-121, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1468-4>. Acesso em: 17 jun. 2022.

RODRIGUES, L. C. A.; *et al.* Fitotoxicidade e citogenotoxicidade da água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, p. 1099-1108, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-43662013001000012>. Acesso em: 20 jun. 2022.

ROIG, N.; *et al.* Long-term amendment of Spanish soils with sewage sludge: Effects on soil functioning. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 158, p. 41-48, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.05.016>. Acesso em: 12 mar. 2022.

RStudio Team (2015) RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA (Computer Software v0.98.1074). <http://www.rstudio.com/>

SALES, I. M. S.; *et al.* Acute toxicity of grape, plum and orange synthetic food flavourings evaluated in vivo test systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 131-137, 2017. Disponível em: <http://doi.org/10.17113/ftb.55.01.17.4770>. Acesso em: 22 jun. 2022.

SANTO, D. E.; *et al.* Prospecting toxicity of octocrylene in *Allium cepa* L. and *Eisenia fetida* Sav. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-12, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22795-2>. Acesso em: 29 set. 2022.

SCHUTZ, D. L.; *et al.* Biomonitoring of surface water quality in the Chopim River within the Conservation Unit Campos de Palmas Wildlife Refuge, southern Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 193, n. 11, p. 1-18, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09464-6>. Acesso em: 05 jun. 2022.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. **Brazilian journal of plant physiology**, v. 17, p. 35-52, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1677-04202005000100004>. Acesso em: 07 jun. 2022.

SINGH, S.; *et al.* Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 137, p. 177-193, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.005>. Acesso em: 27 jun. 2022.

SIQUEIRA, W. N.; *et al.* Toxicity and genotoxicity of domestic sewage sludge in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 48, p. 69343-69353, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15529-3>. Acesso em: 03 jan. 2022.

SOUZA, T. S.; *et al.* Toxic potential of sewage sludge: Histopathological effects on soil and aquatic bioindicators. **Ecological Indicators**, v. 111, p. 105980, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105980>. Acesso em: 27 dez. 2021.

SPICKER, C. E. **Compostagem de lodo de esgoto para o desenvolvimento de mudas de *Senna multijuga* (Rich.) H. S. Irwin & Barneby (pau-cigarra)**. 28 p. Trabalho de

Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, Brasil, 2021.

SRIVASTAVA, R.; KUMAR, D.; GUPTA, S. K. Bioremediation of municipal sludge by vermitechnology and toxicity assessment by *Allium cepa*. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 17, p. 1867-1871, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.029>. Acesso em: 19 dez. 2021.

SUN, Y. I.; OBERLEY, L. W.; LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clinical chemistry**, v. 34, n. 3, p. 497-500, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.020>. Acesso em: 18 jun. 2022.

TAVARES, R.; *et al.* Avaliação da toxicidade do lodo de estação de tratamento de água e esgoto, antes e após vermicompostagem, usando teste de germinação com semente de alface (*Lactuca sativa*). **Revista DAE**. Vol. 67(218), SABESP, 156-167, 2019. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1822/60925>. Acesso em: 25 jul. 2022.

TIAN, Y.; *et al.* Responses of seed germination, seedling growth, and seed yield traits to seed pretreatment in maize (*Zea mays* L.). **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/834630>. Acesso em: 20 ago. 2022.

USEPA, 1996. **850.4200**: Seed germination/root elongation toxicity test. Oppts Eco-Effect Guide, 850 series.

USFDA, 1987. Seed germination and root elongation. Center for Food Safety and Applied Nutrition. In: **Center of Veterinary Medicine** (Eds.), Environmental Assessment Technical Handbook 4.06., US Food and Drug Administration, Washington, DC.

VILAS-BOAS, J. A.; SENRA, M. V. X.; DIAS, R. J. P. Ciliates in ecotoxicological studies: A minireview. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 32, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S2179-975X6719>. Acesso em: 07 set. 2022.

YAKAMERCAN, Elif; ARI, Akif; AYGÜN, Ahmet. Land application of municipal sewage sludge: Human health risk assessment of heavy metals. **Journal of Cleaner Production**, v.

319, p. 128568, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128568>. Acesso em: 01 out. 2022.

YOSHIDA, H.; *et al.* Life cycle assessment of sewage sludge management options including long-term impacts after land application. **Journal of Cleaner Production**, v. 174, p. 538-547, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.175>. Acesso em: 02 mar. 2022.

YOUNG, B. J.; *et al.* Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 182-186, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.019>. Acesso em: 25 set. 2022.

ZANARDO, D. I. L.; *et al.* Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, n. 1, p. 25-30, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.014>. Acesso em: 27 set. 2022.

ZANATTA, M. C. K. **Caracterização da toxicidade de lodos de estação de tratamento de esgoto com vistas a sua aplicação agrícola**. 2014. 79 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia, Limeira, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/267708>>. Acesso em: 16 set. 2022.

ZHU, Z.; *et al.* Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, v. 167, n. 3, p. 527-533, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.020>. Acesso em: 12 set. 2022.

ZHUANG, X.; *et al.* The transformation pathways of nitrogen in sewage sludge during hydrothermal treatment. **Bioresource technology**, v. 245, p. 463-470, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.195>. Acesso em: 12 ago. 2022.

ZULOAGA, O.; *et al.* Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: a review. **Analytica chimica acta**, v. 736, p. 7-29, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.016>. Acesso em: 27 maio 2022.