

Estudo de toxicidade de efluente de laticínio através de análises citogenéticas de raízes de *Allium cepa*.

Toxicity study of dairy effluent through cytogenetic analyzes of Allium cepa roots.

Estudio de toxicidad de efluentes lácteos mediante análisis citogenéticos de raíces de Allium cepa.

Karina Gonçalves Cavilha

Acadêmica de Engenharia Ambiental, UNICENTRO, Brasil
cavilha.ka.ipv@gmail.com

Nilton cesar Pires Bione

Professor Doutor, UNICENTRO, Brasil.
bione@unicentro.br

Kelly Geronazzo Martins

Professora Doutora, UNICENTRO, Brasil.
kellygm77@gmail.com

RESUMO

Os impactos ambientais decorrentes da industrialização são fatos indiscutíveis. Das diferentes atividades, as que consomem grande quantidade de água nos processos produtivos acabam por produzir grandes quantidades de resíduos que se não forem corretamente tratados antes de serem eliminados, acarretarão grande prejuízo ao meio ambiente. A indústria de laticínios é um exemplo de atividade produtiva que produz grande quantidade de resíduos potencialmente poluidores, constituídos de gorduras, sólidos suspensos, nutrientes variados, detergentes, soluções ácidas e alcalinas. Com o objetivo de avaliar o nível de toxicidade do efluente de laticínio, o presente trabalho analisou o índice mitótico e frequência de anormalidades mitóticas em tecido meristemático de raízes de *Allium cepa* expostas ao efluente na sua forma bruta e diluída. As análises citológicas revelaram a presença de anormalidades mitóticas variadas e em todas as fases da mitose como erros de segregação cromossômica, aderência cromossômica, pontes cromossômicas em anáfases e telófases e formação de fragmentos e micronúcleos. Tais achados revelam o potencial clastogênico e aneugênico tanto no efluente bruto como nas diluições, o que reforça a importância de tratamento adequado do efluente antes de seu descarte no ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: Efluente industrial, genotoxicidade, bioindicador.

ABSTRACT

*The environmental impacts resulting from industrialization are undeniable facts worldwide. Among the different activities, those that consume large amounts of water in production processes end up producing large amounts of waste that, if not properly treated before being disposed of, will cause great harm to the environment. The dairy industry is an example of an activity that produces large amounts of potentially polluting waste, consisting of fats, suspended solids, various nutrients, detergents and acidic and alkaline solutions. In order to evaluate the toxicity level of dairy effluent, this study analyzed the mitotic index and frequency of mitotic abnormalities in meristematic tissue of *Allium cepa* roots exposed to the raw and diluted effluent. The cytological analyses revealed the presence of various mitotic abnormalities in all phases of mitosis such as chromatid segregation errors, chromatid adherence, chromatid bridges in anaphases and telophases and formations of chromosomal fragments and micronuclei. Such findings reveal the clastogenic and aneuploidogenic potential of both the raw effluent and dilutions, which reinforces the importance of proper treatment of the effluent before its disposal into the environment.*

Keywords: Industrial effluents, Genotoxicity, Bioindicator.

RESUMEN

*Los impactos ambientales provenientes de la industrialización son hechos reales y indiscutibles en todo el mundo. De las diferentes actividades, las que consumen gran cantidad de agua en los procesos productivos acaban por producir enormes cantidades de residuos que si no fueran correctamente tratados antes de seren eliminados, conducirán gran perjuicio al medio ambiente. La industria de lácteos es un ejemplo de actividad que produce gran cantidad de residuos potencialmente contaminantes, constituidos de grasas, sólidos suspendidos, nutrientes diversificados, detergentes, soluciones ácidas y alcalinas. Con la finalidad de evaluar el nivel de toxicidad del efluente de lacteo, el presente trabajo analizó el índice mitótico y frecuencia de anormalidades mitóticas en tejido meristemático de raíces de *Allium cepa* expuestas al efluente en su modo bruto y diluido. Las análisis citológicas mostraron la presencia de anormalidades mitóticas variadas y en todas las fases de la mitosis como errores de segregación cromosómica, adherencia cromosómica, puentes cromosómicas en anáfases y telofases y formación de fragmentos cromosómicos y micronúcleos. Tales allazgos revelan el potencial clastogénico y aneugenico no solamente en el efluente bruto como en las diluciones, lo que refuerza la importancia de tratamiento adecuado del efluente antes de su desecho en el ambiente.*

Palabras clave: Efluentes industriales, Genotoxicidad, Bioindicador.

Introdução:

O desenvolvimento industrial desempenha um papel de grande importância nas atividades econômicas mundiais. No Brasil, das diferentes atividades industriais, destacam-se as de alimentos, e delas as de laticínios que segundo Carvalho (2010), participa com aproximadamente 10% do faturamento total da indústria de alimentos. De acordo com Embrapa (2010) o Brasil é o sexto maior produtor mundial de leite e futuramente pode se tornar um dos maiores exportadores de produtos lácteos. Para que isso aconteça, as indústrias de laticínios terão que adotar tecnologias que aumente a eficiência da produção e sustentabilidade com os recursos naturais utilizados, bem como o controle e tratamento dos resíduos gerados na produção, o que resultará na maior valorização do produto e favorecerá a competitividade nos mercados externos.

Segundo, Gandra (2019) o Paraná com uma produção de 4,4 bilhões de litros de leite em 2018 tornou-se o segundo maior produtor de leite do Brasil, o que favoreceu o crescimento de 1,6% na produção brasileira de leite, alcançando 33,8 bilhões de litros. Diante disso, as regiões Sul e Sudeste lideram a produção nacional.

Por apresentar características nutricionais importantes como proteínas, carboidratos, gorduras, sais minerais e vitaminas, além de promover o desenvolvimento de microrganismos importantes para o sistema digestório, o leite e seus derivados estão fielmente presentes na alimentação humana o que faz a demanda de sua produção aumentar a cada ano (SOUZA et al., 1995).

O aumento de produção industrial está diretamente relacionado ao aumento de geração de resíduos, assim como as demais atividades industriais, as de laticínios também acabam por impactar o ambiente, pois nela há um grande consumo de água, utilizada principalmente para a limpeza de equipamentos e a própria produção que resulta em uma maior geração de efluentes (RAMJEAWON, 2000). Para cada litro de leite produzido são gerados em média 11 litros de resíduos com alta carga orgânica, constituída principalmente de gorduras, sólidos suspensos e nutrientes com grande potencial poluidor (BRIÃO et al., 2015). Tais resíduos alteram drasticamente o ambiente, principalmente os corpos hídricos.

Para minimizar o efeito poluidor das indústrias de laticínios, é necessário a adoção de medidas que garantam a diminuição no consumo de água e de tecnologias eficientes de tratamento de efluentes e resíduos produzidos antes de serem lançados no ambiente, evitando assim, maiores danos.

Uma alternativa eficiente de tratamento de efluentes e que tem se destacado é a utilização de biorreatores a membrana (BRM) que consiste num sistema semelhante ao de lodos ativados convencional com a substituição da etapa de sedimentação pelo processo de filtração em membranas. Isso faz com que os sólidos sejam removidos em um menor período e com melhora na qualidade do efluente produzido (JUDD et al., 2006; HO et al., 2017).

Embora existam diferentes tecnologias de tratamento de efluentes que atendam as normas estabelecidas de cada país, apenas análises químicas não retratam plenamente os impactos ambientais causados pelos poluentes, pois não demonstram os efeitos sobre os ecossistemas. Os testes biológicos alcançam uma maior amplitude, pois conseguem detectar a capacidade de um agente tóxico, puro ou em mistura, de causar efeitos prejudiciais aos organismos vivos. Os bioensaios determinam com precisão os efeitos nocivos causados pela

amostra em contato, porém não identificam quais os componentes tóxicos presentes são responsáveis pelas alterações (MAGALHÃES e SILVA FILHO, 2008).

Rodrigues et al. (2009) descreve que os testes com resultados exclusivamente químicos apresentam limitações devido ao fato de que efluentes industriais apresentam uma variabilidade muito grande de componentes e ações como sinergismo e antagonismo acabam por prejudicar os resultados. Além disso, algumas substâncias conseguem ser tóxicas aos organismos vivos mesmo quando estão em concentrações abaixo dos limites de detecção analítica. Portanto, testes biológicos e físico-químicos ao serem aplicados juntos, de uma forma integrada, melhoram a representatividade e eficiência das análises.

Organismos vivos em contato com agentes ambientais tóxicos podem sofrer modificações a nível celular e molecular, como alterações na estrutura do DNA, resultando em aberrações cromossômicas e/ou quebras na molécula as quais podem comprometer o seu desenvolvimento ou até mesmo causar a sua morte. Muitos desses efeitos também promovem mutações que impossibilitam a célula de exercer suas funções vitais básicas e interferem nos processos de divisão celular. Tais substâncias são conhecidas como genotóxicas ou carcinogênicas (COSTA & MENK, 2000). Muitos organismos de espécies diferentes têm sido utilizados em bioensaios com o objetivo de analisar o potencial de genotoxicidade de diferentes substâncias (FERNANDES, et. al. 2005).

A utilização de raízes vegetais em ensaios toxicológicos se torna muito útil visto que tais estruturas, na grande maioria dos casos, são as primeiras a entrarem em contato com as substâncias químicas que eventualmente estão presentes no ambiente. O sistema de monitoramento ambiental utilizando análises citológicas do meristema apical de raízes constitui um método sensível e rápido para avaliações. Essas avaliações podem ser realizadas através de observações macroscópicas onde se analisa o nível de crescimento radicular e visualizações a nível microscópio com estudo das células em divisão o que contribui com informações e um bom detalhamento tanto de forma quantitativa como qualitativa (FISKESJÖ, 1988).

Os organismos da espécie *Allium cepa*, considerados excelentes bioindicadores toxicológicos, têm sido amplamente utilizados para análises de genotoxicidade de diferentes substâncias, pois apresentam uma boa confiabilidade nos resultados, podem ser avaliados durante o ano inteiro e apresentam homogeneidade tanto genética como fisiológica (FISKESJÖ, 1985; MA et al. 1995; ROA et al. 2012; LEME & MARIN- MORALES, 2008). Ressalta-se, também, que *Allium cepa* apresenta cariótipo (2n=16) e tamanhos de cromossomos satisfatórios para estudos citogenéticos. Com essas características as alterações cromossômicas podem ser facilmente observadas e analisadas (GRANT, 1999).

Alterações no índice mitótico e anormalidades citológicas do ciclo celular de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* foram descritas em diversos trabalhos de monitoramento de poluentes em recursos hídricos (AMARAL et al., 2007; ATHANÁSIO e RIEGER, 2014; BARBOSA, 2008; MACEDA et al., 2015) e em efluentes industriais (CARITÁ e MARIM-MORALES, 2008; ALVIM et al., 2011; MATSUMOTO et al., 2006).

Diante disso, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar os possíveis efeitos genotóxicos do efluente resultante da produção de laticínios na sua forma bruta e após diluições em água destilada, através de análises mitóticas detalhadas de raízes de *Allium cepa* expostas a tais efluentes.

Metodologia

O efluente em estudo foi fornecido por uma Indústria de laticínio estado do Paraná. Para análise da toxicidade desse efluente foram utilizados como organismos-teste bulbos de *Allium cepa* adquiridos de produtores rurais de cebolas orgânicas. Foram selecionadas doze cebolas de tamanhos e pesos semelhantes para a montagem do experimento. Cada bulbo foi colocado em um recipiente de vidro e suas regiões meristemáticas expostas à água destilada por um período de 96 horas para que novas raízes germinassem e atingissem cerca de dois centímetros para serem expostas aos diferentes tratamentos.

Após a germinação em água destilada e o surgimento de novas raízes, os bulbos de *Allium cepa* foram divididos em cinco grupos de três organismos e expostos aos diferentes tratamentos por 48 horas. Um grupo foi exposto ao controle negativo (água destilada), outro ao controle positivo (dicromato de potássio $1,40 \text{ mg.L}^{-1}$), outro ao efluente bruto, outro ao efluente (50%) diluído em água destilada e outro efluente (10%) diluído em água destilada. Após 48 horas, as soluções foram descartadas e todos os tratamentos expostos novamente à água destilada por 24 horas para recuperação. Após esse período, as raízes de cada exemplar de *Allium cepa* foram coletadas com um tamanho de aproximadamente 2,0 cm e colocadas em solução fixadora composta de álcool e ácido acético em uma proporção de 3:1 (v/v) por 24 horas a temperatura ambiente e depois transferidas para frascos contendo álcool 70% e acondicionadas em freezer até o momento das análises. Para as análises citológicas, as raízes foram hidrolisadas em solução de HCL 1N em estufa a 80°C por oito minutos e depois lavadas em água corrente e colocadas em frascos com álcool 70% para a montagem das lâminas. Foram escolhidas aleatoriamente três raízes de cada bulbo de cada ensaio. As lâminas foram confeccionadas pela técnica de esmagamento e coradas com carmim propiônico 1%. Para a realização do índice mitótico, 1000 células por raiz foram analisadas para contagem das fases mitóticas, e para análise das fases da divisão, uma média de 50 células por fase em cada raiz, com registro do percentual de anormalidades em cada ensaio. Todas as anormalidades foram consideradas e fotografadas com fotomicroscópio Olympus. Os dados foram submetidos a análise de agrupamento hierárquico a partir da distância euclidiana e ligação simples. As análises foram feitas com o software RStudio, versão 4.0.2, pacotes MASS, cluster e ggplot2.

Resultados e Discussões

As análises citológicas revelaram anormalidades mitóticas variadas em todos os tratamentos com frequências distintas (Tabela 1). Nota-se que os tratamentos com o efluente apresentaram porcentagem de anormalidades semelhantes e estatisticamente mais próximas dos resultados encontrados no controle positivo, uma vez que na análise de agrupamento hierárquico observou-se a formação de dois grupos distintos, o primeiro formado pelo controle negativo e um segundo agrupamento constituído pelo controle positivo, efluente bruto, e efluente diluído em 50 e 10% (Figura 1), indicando com isso, citotoxicidade do efluente analisado mesmo em diluições. Segundo Araujo *et al.* (2016) a composição química dos resíduos resultantes dos processos industriais é variada e pode conter inúmeros elementos tóxicos e recalcitrantes. Para as indústrias de laticínios, os resíduos produzidos são considerados muito poluentes por apresentar elevado teor de matéria orgânica além de conter produtos químicos

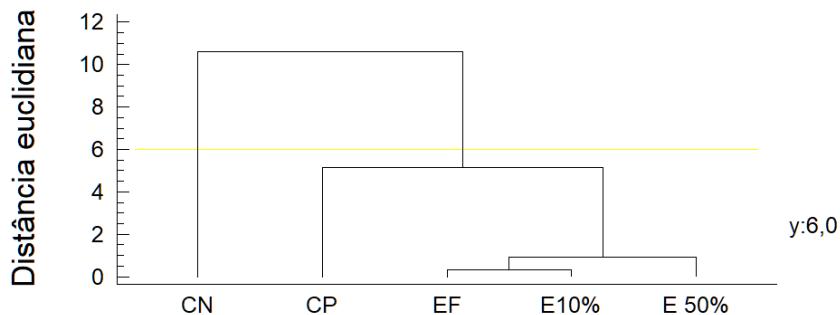
como detergentes, soluções ácidas e alcalinas resultantes dos processos de higienização dos maquinários utilizados na indústria (AZZOLINI e FABRO, 2013).

Tabela 1 - Número de células analisadas e porcentagem de anormalidades por fase da mitose e porcentagem total de células anormais nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	Total de Células Analisadas	Total de Células Anormais (%)
	Nº de células analisadas- (%) anormais					
Controle Negativo	450 - 1,11	450 - 3,11	450 - 1,33	450 - 0,88	1800	1,61
Controle Positivo	450 - 4,00	450 - 20,88	450 - 23,77	450 - 18,22	1800	16,72
Efluente bruto	450 - 2,66	450 - 10,66	450 - 20,44	450 - 14,22	1800	12,00
Efluente 50%	450 - 1,77	450 - 8,88	450 - 18,88	450 - 12,00	1800	10,38
Efluente 10%	450 - 3,11	450 - 8,66	450 - 19,11	450 - 13,11	1800	11,00

Fonte: Autor.

Figura 1 Análise de agrupamento hierárquico da matriz de porcentagem de células anormais do efluente da indústria de laticínios BRUTO (EF), diluído em 10% (E10%) e 50% (E50%), e controle negativo (CN) e positivo (CP).



Fonte: Autor.

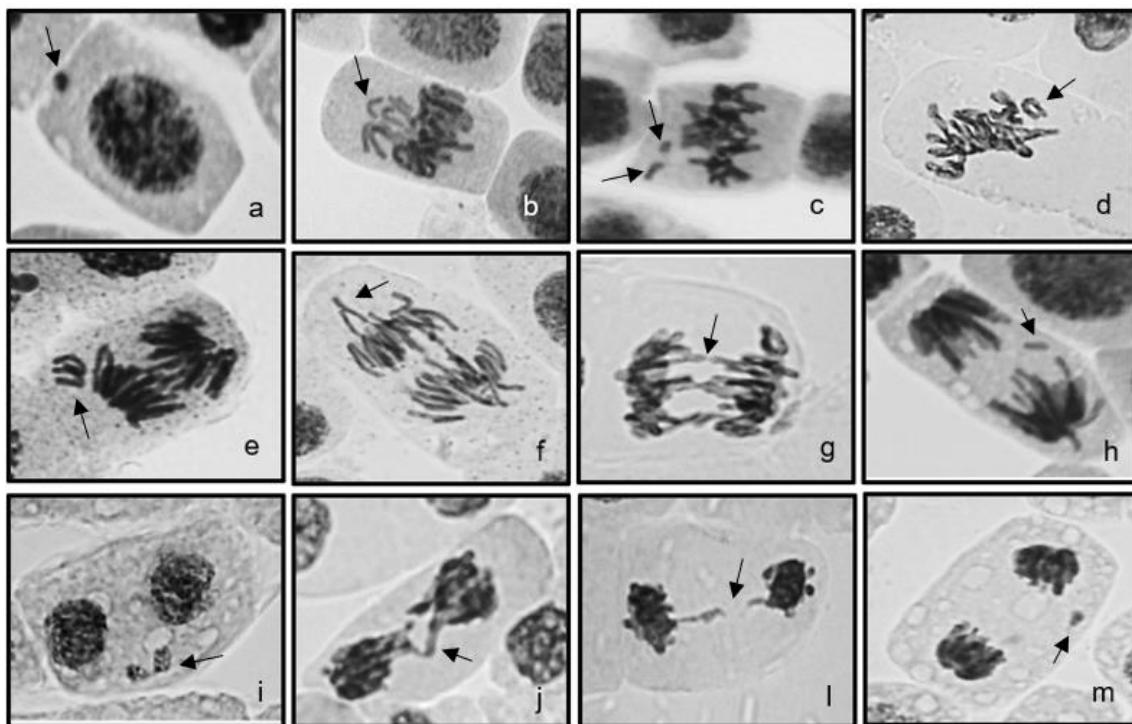
Em relação a frequência de anormalidades mitóticas por fase da divisão, pode-se notar que as anáfases do controle positivo e de todos os ensaios envolvendo o efluente apresentaram maiores índices de alterações quando comparadas as demais fases (Tabela 1).

Dentre as anormalidades mitóticas encontradas destacam-se a formação de micronúcleos, as relacionadas com a segregação irregular de cromossomos e aderência cromossômica (stickness). O poder genotóxico do efluente estudado pode ser identificado com o aparecimento de micronúcleos em prófases e telófases (Figuras 2a, i, m), responsáveis pelo aumento da frequência de anormalidades quando comparado com o controle negativo. Segundo Ribeiro et al. (2003), substâncias genotóxicas são capazes de induzir danos em células parentais, como quebras na molécula de DNA que resultam em fragmentos cromossômicos que não são incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. O resultado desse

fenômeno é a formação de micronúcleos contendo pequenos fragmentos de DNA dispersos no citoplasma. Tais anormalidades são vistas principalmente nas telófases e podem, também, serem resultantes de fragmentos cromossônicos acêntricos, originados de quebras isocromatídicas, cromatídicas ou de disfunções do fuso mitótico.

Erros de polimerização de microtúbulos também são responsáveis pela formação de micronúcleos. Binsfeld et al. (2000) induziram a formação de micronúcleos em protoplastos de girassol com o uso de herbicidas que apresentam componentes químicos que formam complexos com dímeros de tubulina e induzem a polimerização anormal das fibras do fuso. Vários autores descrevem a ação de poluentes que impedem a normal polimerização dos microtúbulos e induzem a separação dos cromossomos em metáfase, e neste caso, levando a formação de micronúcleos sub-diplóides, não com fragmentos, mas sim com um ou mais cromossomos inteiros (MOREJOHN et al., 1987; FALCONER e SEAGULL, 1987). Neste trabalho foram observadas a formação de cromossomos inteiros fora da placa equatorial da célula em metáfase (Figura 2b, d) e fora do eixo de segregação em anáfase (Figura 2e) indicando possível efeito aneugênico do efluente na polimerização dos microtúbulos.

Figura 2 - Aspectos citológicos da mitose em raiz de *Allium cepa* observados nos diferentes tratamentos. a) Prófase com micronúcleo. b) Metáfase com cromossomos em ascensão precoce. c) Metáfase com fragmentos de cromossomos no citoplasma. d) Metáfase com cromossomos fora da placa equatorial da célula. e) Anáfase com cromossomos fora do eixo de segregação. f) Anáfase com cromossomos em segregação precoce. g) Anáfase com pontes cromossônicas. h) Anáfase com fragmento cromossômico. i) Telófase com micronúcleos. j) Telófase com pontes cromossônicas. l) telófase com ponte fragmentada. m) Telófase com micronúcleo



Fonte: Autor.

Como descrito neste trabalho, Oliveira et al. (2013), através do teste de micronúcleos em *Allium cepa*, encontraram um considerado nível de toxicidade de efluente de laticínio evidenciado pela frequência de micronúcleos observada nas análises de amostras de um rio que recebe rejeitos de uma indústria de laticínios.

Outras anormalidades observadas, que também contribuem para a formação de fragmentos cromossômicos e micronúcleos no citoplasma, são as pontes cromossômicas em anáfases e telófases (Figuras 2g, j e l) resultantes de aderência cromossônica (stickiness). Trata-se de uma adesão física irregular entre as proteínas que compõem a estrutura dos cromossomos e que segundo Cabaravdic (2010) pode ser resultado da degradação do DNA causada pela toxicidade de diferentes substâncias.

A formação de pontes cromossômicas por aderência entre os cromossomos pode levar a uma má segregação das cromátides durante a anáfase. Com a continuidade da segregação, essas pontes podem se romper em qualquer ponto da molécula (Figura 2l) e resultar na formação de fragmentos cromossômicos (Figuras 2c, 2h) que contribuirão para a formação de micronúcleos ou serão perdidos pela célula. Quaisquer que sejam os destinos dos fragmentos, tal anormalidade representa perda de material genético pela célula resultando em aneuploidia (FISKEJÖ, 1985). Formação de pontes seguida de quebra em cromossomos ou cromátides indicam o potencial clastogênico dos compostos presentes no efluente (TKALEC, et al., 2009; MACHADO, 2013).

Em relação a segregação dos cromossomos, foram observadas em grande frequência, quando comparadas ao controle negativo (Tabela 1), a ascensão precoce de cromossomos em metáfase e anáfase (Figuras 2b, f) e cromossomos não congressados na placa equatorial da célula (Figuras 2d, e). Diferentes poluentes podem interferir na formação e organização dos fusos mitóticos, prejudicando a movimentação e organização dos cromossomos na placa metafásica da célula, comprometendo todo o andamento da divisão celular (FISKEJÖ, 1985; HOSHINA, 2005). Tais anormalidades segregacionais também podem contribuir para a formação de micronúcleos onde sua presença pode representar um processo natural, mas a exposição a agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e de agentes aneugênicos (que induzem a segregação cromossônica anormal) podem aumentar sua frequência (PAZ et al. 2013; MACGREGOR et al. 1987; HAYASHI et al., 1994).

Análises do índice mitótico (IM) revelou similaridade entre os controles e os tratamentos com efluente (tabela 2). Segundo Souza (2006), a redução do IM em raízes expostas a efluentes está diretamente relacionada a presença de substâncias citotóxicas. No presente trabalho não encontramos diferenças significativas do IM nos diferentes tratamentos.

Tabela 2. Índice mitótico dos diferentes tratamentos

Tratamento	Número de células analisadas	Número de células em divisão	(%)células em divisão
Controle negativo	9000	263	2,92
Controle positivo	9000	258	2,86
Efluente Bruto	9000	261	2,90
Efluente diluído 50%	9000	207	2,30
Efluente diluído 10%	9000	198	2,20

Fonte: Autor.

Embora o IM não tenha revelado resultados que indiquem toxicidade do efluente em estudo, as análises citológicas da divisão mitótica revelaram incidência de anormalidades

maiores que o controle negativo e semelhantes ao controle positivo o que demonstra, através dos achados citológicos, potencial genotóxico do efluente. Diante disso, teste de toxicidade com o uso de *Allium cepa* demonstrou eficiente na caracterização da toxicidade do efluente em estudo, através dos resultados das frequências de anormalidades mitóticas encontradas. Apesar dos resultados, essa metodologia não possibilita identificar qual ou quais substâncias presentes no efluente foram as responsáveis pelas anormalidades observadas, mas revela a necessidade de um tratamento adequado desse rejeito antes de seu destino final.

Referências

- ALVIM, L. B.; KUMMROW, F.; BEIJO, L. A.; LIMA, C. A. de A.; BARBOSA, S. Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando Allium cepa.L. **Revista Ambiente &Água- a Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 6, n. 2, 2011.
- AMARAL, A. M.; VOLTOLINI, J. C.; BARROS, L.; BARBÉRIO, A. Avaliação Preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP- Brasil) através do teste Allium(*Allium cepa*). **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.20, n.1 p. 65-72, 2007.
- ARAÚJO, K. S. DE, ANTONELLI, R., & GAYDECZKA, B. GRANATO.A.C, MALPASS.GRP. **Processos oxidativos avançados: uma revisão de fundamentos e aplicações no tratamento de águas residuais urbanas e efluentes industriais** - 11 n.2 TAUBATÉ. 2016.
- ATHANÁSIO, C. G.; PRA, D.; RIEGER, A. Water quality of urban streams: the *Allium cepa* seeds/seedlings test as a tool for surface water monitoring. **The Scientific World Journal**, v. 2014, Article ID 391367, 7 p. 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/391367>.
- AZZOLINI J C e FABRO. L F. Monitoramento da eficiência do sistema de tratamento de efluentes de um laticínio da região meio-oeste de Santa Catarina. **Unoesc & Ciência- Joaçaba** V 04. N.1 p. 43 - 60, 2013.
- BARBOSA, J. S. **Análise da genotoxicidade das águas da Lagoa de Extremoz-RN**. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.
- BINSFELD, P. C., PETERS, J.A., SCHNABL, H. Effect of herbicides on the polymerization of the microtubule and induction of micronuclei in *Helianthus maximiliani* protoplasts. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.** 12 (3), 2000.
- BRIÃO, V.B.; TAVARES, C.R.G.; FAVARETTO, D. P. C.; HEMKEMEIER, M. Ultrafiltração de Efluente Modelo e Efluente Industrial de Laticínios. Passo Fundo: **Revista CIATEC-UPF**, 12p., 2015.
- CABARAVDIC, M. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of cells to benzo(a)pyrene. **Med Arh**, v. 64, 2010.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, 72(5): 722-5, 2008.
- CARVALHO, G. R. **A Indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro**. Circular Técnica 102, Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora, MG. 2010.
- COSTA, R. M. A. ; MENCK, C. F. M. . Emprego de bioindicadores no monitoramento ambiental. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 12, p. 24 – 26, 2000.
- EMBRAPA. Agência de informação Embrapa. Agronegócio do leite. Disponível em:<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/Abertura.html>. Acesso em: 24 jan. 2023.
- FALCONER, M.M. & SEAGULL, R.W. Amiprofosh-methyl (APM): a rapid reversible, anti-microtubule agent for plant cell cultures. **Protoplasma**, 136:145-124, 1987.
- FERNANDES, T.C.C. **Investigação Dos Efeitos Tóxicos, Mutagênicos e Genotóxicos do Herbicida Trifluralina, Utilizando Allium cepa e Oreochromis niloticus como sistemas-testes**. 2005. 211 f. Dissertação (Mestrado biologia celular e molecular) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo 2005.

- FISKESJÖ, G. Allium Test in front of video display units. **Hereditas**, v 108. p. 239-242, 1988.
- FISKESJÖ, G. The Allium Test as standard in environmental Monitoring. **Hereditas**, p. 99–112, 1985.
- GANDRA, A. **Produção de Leite Sobe e a de Ovos Bate Recorde, Revela Pesquisa**: levantamento em todo o país foi feito pelo IBGE. Rio de Janeiro: Agencia Brasil, 2019. Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2019-9/producao-de-leite-sobe-e-de-ovos-bate-recorde-revela-pesquisa>>. Acesso em: 13 dez. 2022.
- GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**, Leiden, v. 426, n. 2, p.107-112, 1999.
- HAYASHI, M., MAKI-PAAKKANEN, J., TANABE, H., HONMA, M., SUZUKI, T., MATSUOKA, A., MIZUSAWA, H., SOFUNI, T. Isolation of micronuclei from mouse blood and fluorescence in situ hybridization with a mouse centromeric DNA probe. **Mutat Res.** n. 307, p. 245–51, 1994.
- HO, K. C.; TEOW, Y. H.; ANG, W. L.; MOHAMMAD, A. W. An Overview of Electricallyenhanced Membrane Bioreactor (EMBR) for Fouling Suppression. **Journal of Engineering Science & Technology Review**, v. 10, n. 3, 2017.
- HOSHINA, M. M. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de efluentes de refinaria de petróleo, por meio dos sistemas testes de Allium cepa e Oreochromis niloticus**. 2005. 162 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- JUDD, S.; JUDD, C. **The MBR Book: Principles and Applications of Membrane Bioreactors in Water and Wastewater Treatment**. 1. ed. Oxford: Elsevier Science Ltd, 2006.
- LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome Aberration and Micronucleus Frequencies in *Allium cepa* Cells Exposed to Petroleum Polluted Water- a Case Study. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, p. 80-86, 2008.
- MA, T.-H; XU, Z.; XU, C.; McCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v.334, p.185-195, 1995.
- MACEDA, E. B.; GRISOLIA, A. B.; VAINI, J. O.; CANDIDO, L. S. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no Município de Rio Brilhante, MS, Brasil, **Rev. Ambient. Água**, Taubaté, v. 10, n. 1. 2015.
- MACGREGOR, J.T., HEDDLE J. A., HITE, M., MARGOLIN, B. H., RAMEL, C., SALAMONE, M. F., TICE, R. R., WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Res.**, n. 189, p.103-112, 1987.
- MACHADO, A. T. **Avaliação do potencial mutagênico do efluente do Terminal Petroquímico Almirante Soares Dutra (Osório-RS-Brasil) através do sistema teste de Allium cepa**. 2013. 45f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul em convênio com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso de Ciências biológicas com ênfase em gestão ambiental marinha e costeira, Imbé/Osório, 2013. Disponível em <<http://hdl.handle.net/10183/80497>>
- MAGALHÃES, D. P. ; SILVA FILHO, A. F. A Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p.355-381, 2008.
- MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 148-158, 2006.
- MOREJOHN, L.C.; BUREAU, T.E.; MOLÉBAJER, J.; BAJER, A. & FOSKET, D.E. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. **Planta**, 172: p. 41-147, 1987.
- OLIVEIRA, J. M., YAMASHITA, M., MENEGUETTI, U. O. **Análise do potencial mutagênico em afluentes do rio boa vista influenciados pela emissão de rejeitos de uma indústria de laticínios no município de Ouro Preto do Oeste – RO – Brasil**. VIII Jornada Científica CEDSA. 2013.

PAZ, M.F.C.J.; ALENCAR, M.V.O.B.; SOARES, R.L.L.; COSTA, D.A.F.; NUNES, A.T.; CAVALCANTE, A.A.C.M. Avaliação tóxica, citotóxica, mutagênica e genotóxica do látex da *Himatanthussucuuba*: uma questão de saúde pública. **Rev. Interd.**, v. 6, n. 1, 2013.

RAMJEAWON, T. Cleaner production in Mauritian cane-sugar factories. **Journal of Cleaner Production**, v.8, p. 503-510, 2000.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. **Editora Ulbra**. Canoas: 1^a edição, 2003.

ROA, O.; YEBER, M. C.; VENEGAS, W. Genotoxicity and toxicity evaluations of ECF cellulose bleaching effluents using the *Allium cepa* L. Test. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 471-477, 2012.

RODRIGUES, D. O.; SILVA, S. L. R.; SILVA, M. S. R. Avaliação Ecotoxicológica Preliminar das Águas das Bacias Tarumã, São Raimundo e Educandos. **Acta Amazonica**, vol. 39, n.4, p. 935-942, 2009.

SOUZA, M. R., RODRIGUES, R., FONSECA, L. M., CERQUEIRA, M. M. O. P. Pasteurização do leite. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária UFMG**, n. 13, p.85-93, 1995.

SOUZA, V. H. E. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo de efluentes de uma indústria de papel e celulose de Santa Catarina em allium cepa**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia. Florianópolis, 2006.

TKALEC M, MALARIC K, PAVLICA M, PEVALEK-KOZLINA B, VIDAKOVIC- CIFREK Z. Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination and root meristematic cells of *Allium cepa* L. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**; 672, p.76-81, 2009.