



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VICTOR VENTURA DE SOUZA

ANÁLISE TÓXICA E CITOGENOTÓXICA DE ANILINA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE BIODEGRADAÇÃO

RECIFE

2021

VICTOR VENTURA DE SOUZA

ANÁLISE TÓXICA E CITOGENOTÓXICA DE ANILINA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE BIODEGRADAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal

Coorientadora: Profa. Dra. Sávia Gavazza dos Santos Pessôa

RECIFE

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

De Souza, Victor Ventura.

Análise tóxica e citogenotóxica de anilina em diferentes condições de
biodegradação / Victor Ventura De Souza. - Recife, 2021.

59 : il., tab.

Orientador(a): Ana Christina Brasileiro Vidal

Cooorientador(a): Sávia Gavazza dos Santos Pessoa

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de
Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2021.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. Afluente. 2. Efluente. 3. Amino aromáticas. 4. Citotoxicidade. 5.
Ecotoxicidade. 6. Genotoxicidade. I. Vidal, Ana Christina Brasileiro .
(Orientação). II. Pessoa, Sávia Gavazza dos Santos. (Cooorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

VICTOR VENTURA DE SOUZA

ANÁLISE TÓXICA E CITOGENOTÓXICA DE ANILINA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE BIODEGRADAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Aprovada em: 25/01/21

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Ana Christina Brasileiro-Vidal (Orientadora)
Departamento de Genética - Centro de Biociências/UFPE

Dr^a. Tatiana da Silva Souza (Titular externo)
Departamento de Biologia - Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde/ UFES

Dr^a. Maria Betânia Melo de Oliveira (Titular interno)
Departamento de Bioquímica - Centro de Biociências/UFPE

A minha mãe (Marilene Aparecida Ventura), por me apoiar, me aturar e sempre me incentivar a conquistar os meus desejos, a você eu dedico essa dissertação,

AGRADECIMENTOS

À minha mãe (**Marilene Aparecida Ventura**) pelo apoio incondicional de sempre.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. **Ana Christina Brasileiro Vidal**, pela oportunidade de conduzir esse trabalho, pela confiança e pelo conhecimento transferido ao longo de dois anos.

À coorientadora, Prof^ª. Dr^ª. **Sávia Gavazza dos Santos Pessôa**, pelas sugestões e por contribuir com o planejamento deste trabalho.

À **Jéssica** e **Micheli** por estarem comigo sempre, mesmo com toda a distância.

Ao **Lucas Coelho** pelos momentos de alegria, descontração e por tornar minha moradia em Recife extremamente agradável.

À **Carla Renata de Macedo** (Karolaine), um verdadeiro presente que eu ganhei da UFPE, minha amiga, confidente, pessoa que lê tudo que eu escrevo, muito obrigado por tudo.

À toda equipe do Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) e do Laboratório de Biologia Molecular e Tecnologia Ambiental (LABIOTA) em especial ao **Roberto**, **Natanna** e **Danúbia**, pelo incentivo e apoio. À **Isabelle Câmara**, rainha, dona, sócia e proprietária do LABIOTA, por toda paciência, dedicação e ajuda com os experimentos para produzir as amostras, pelas inúmeras conversas, surtos, choros, áudios intermináveis no WhatsApp e sugestões científicas.

À toda equipe do LGBV, em especial a **Fernanda**, **Jéssica Barbosa** e **Palloma** pelo incentivo e carinho. À Vanessa pela ajuda na aquisição das sementes de *Allium cepa*.

Ao Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) por ter cedido as sementes de *Allium cepa* (Vale Ouro - IPA 1).

À Prof^ª. Dr^ª. **Tatiana da Silva Souza**, pela transferência de conhecimento e por ter me apresentado ao mundo da Ecotoxicologia na graduação, meu humilde muito obrigado.

À Prof^ª. Dr^ª. **Andrea Pedrosa Harand** do Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal pela disponibilização do citômetro de fluxo.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite e pelas contribuições para este trabalho.

A **CAPES** pela concessão da minha bolsa de estudos.

A coordenação e a secretaria do **PPGCB** (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas), em nome da atual coordenadora **Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva**, bem como ao corpo docente, por terem contribuído para a conclusão dessa importante etapa da minha formação.

E, por fim, a **Universidade Federal de Pernambuco**, seu corpo docente e administrativo, os quais possibilitaram o alcance deste título.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho deixo aqui meu agradecimento!

“Esqueça o fundo que te aguarda ao deixar a tua velha margem. Destino é um
mergulho no tempo que existe pra mudar|. (Sammliz Samm).

RESUMO

A anilina é um composto sintético utilizado na indústria, que pode gerar poluição ambiental. O presente trabalho visou avaliar o potencial toxicogenético da anilina antes e após sua biodegradação em condições de microcosmos anaeróbia e anaeróbia/ microaerada, mediante sistema-teste *Allium cepa*. Na primeira condição, a anilina (3 mg.L^{-1}) foi testada antes (afluente) e após (efluente) biodegradação anaeróbia nas condições: metanogênica sem acceptor de elétrons; anóxica com adição de sulfato e anóxica com nitrato, totalizando seis tratamentos. Na condição anaeróbia/microaerada (anilina a $13,6 \text{ mg.L}^{-1}$), foram testadas seis amostras, incluindo afluente e efluente com pulsos de 30, 15 e 10 min de aeração. Para a análise do potencial toxicogenético, sementes de *A. cepa* foram expostas às amostras descritas e analisados os seguintes parâmetros: índice de germinação, crescimento radicular, ciclo celular e alterações cromossômicas. No experimento anaeróbio, a condição afluente metanogênica sem acceptor de elétrons e efluente anóxica com adição de sulfato foram tóxicas. Todas as condições de afluentes e efluentes testadas, com exceção do efluente anóxico com nitrato, foram citotóxicas e genotóxicas. Para o experimento na condição anaeróbia/microaerada, apenas os efluentes com pulsos de 30 e 15 min não induziram efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico. Os dados do presente trabalho sugerem que a condição anóxica com adição de nitrato e anaeróbia/microaerada com pulsos de 30 e 15 min são eficientes para a biodegradação da anilina e de subprodutos tóxicos.

Palavras-chave: Afluente. Aminas aromáticas. Citotoxicidade. Ecotoxicidade. Efluente. Genotoxicidade

ABSTRACT

Anilin is a synthetic compound used in industry, which can generate environmental pollution. Our work aimed to evaluate the toxicogenic potential of aniline before and after anaerobic and anaerobic/microaerated biodegradation both in microcosm condition, using the *Allium cepa* test system. In the first condition, aniline (3 mg.L^{-1}) was tested before (affluent) and after (effluent) anaerobic biodegradation at three conditions: methanogenic without electron acceptor; anoxic with sulfate addition, and anoxic with nitrate, totalizing six treatments. In the anaerobic/microaerated condition (aniline at 13.6 mg.L^{-1}), six samples were tested, including affluent and effluent with pulses of 30, 15 and 10 min aeration. For the analysis of the toxicogenetic potential, *A. cepa* seeds were exposed to the described samples and the followed parameters were analyzed: germination index, root growth, cell cycle and chromosomal changes. In the anaerobic experiment, the methanogenic without electron acceptor affluent and anoxic with sulfate effluent conditions were toxic. All affluent and effluent tested conditions, except for anoxic with nitrate effluent, were cytotoxic and genotoxic. For the experiment in the anaerobic/microaerated condition, only effluents with 30- and 15-min pulses did not induce toxic, cytotoxic and genotoxic effects. Our data suggest that the anoxic with nitrate or anaerobic/microaerated with a 30- and 15-min pulse conditions are efficient for the aniline and toxic by-product biodegradation.

Keywords: Affluent. Aromatic amines. Cytotoxicity. Ecotoxicity. Effluent. Genotoxicity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Exemplos de aminas aromáticas. Fonte: Ramos (2013).....	18
Figura 2. Degradação da anilina por duas vias de degradação. (A) Etapa inicial da degradação aeróbia da anilina com a bactéria <i>Acinetobacter</i> sp. YAA gerando como produto final o catecol. (B) Degradação anaeróbia da anilina por meio da bactéria <i>Desulfobacterium anilini</i> . Fonte: Adaptado de Arora (2015).	22
Figura 3. Ilustração descrevendo o sistema de microcosmo, incluindo: <i>headspace</i> , volume não ocupado visando ser preenchido por gases produzidos pela degradação da anilina; volume útil, constituído por macro e micronutrientes além da suplementação da anilina, e inóculo, lodo constituído de bactérias anaeróbias utilizado para degradar a anilina. Fonte: Arquivo Pessoal.	32
Figura 4. Esquema mostrando a geração das amostras no reator. O oxigênio foi bombeado com uma bomba de ar para o contato com o afluente, enquanto agitador magnético foi utilizado para misturar a anilina ao afluente, visando ao maior contato entre anilina e inóculo. Fonte: Arquivo Pessoal.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Organismo-teste expostos a anilina e efeitos observados.....24

Tabela 2. Ensaio com sistema-teste *Allium cepa* após 72 h de exposição das sementes a amostras antes e após tratamentos de biodegradação da anilina em condições anaeróbias com ou sem aceptores de elétrons, incluindo dados de índice de germinação, comprimento médio das raízes, índice mitótico e índice de genotoxicidade.....37

Tabela 3. Porcentagem (%) de núcleos meristemáticos de *Allium cepa* nas fases do ciclo celular, após exposição das sementes por 72 h a amostras antes e após tratamentos de biodegradação da anilina em condições anaeróbias com ou sem aceptores de elétrons, analisados por citometria de fluxo38

Tabela 4. Alterações cromossômicas e índices de genotoxicidade em meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição das sementes por 72 h a amostras antes e após tratamentos de biodegradação da anilina em condições anaeróbias com ou sem aceptores de elétrons.....40

Tabela 5. Ensaio com sistema-teste *Allium cepa* após 72 h de exposição das sementes a amostras antes e após tratamentos de biodegradação anaeróbios/microaerados, incluindo dados de índice de germinação, comprimento médio das raízes e índice de genotoxicidade.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 6. Alterações cromossômicas e índices de genotoxicidade em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição das sementes por 72 h a amostras antes e após os tratamentos de biodegradação anaeróbios/microaerados. **Erro! Indicador não definido.**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivo específicos	17
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 Aminas aromáticas.....	18
3.2 Anilina	19
3.2.1 Biodegradação da anilina	21
3.2.2 Genética toxicológica da anilina	23
3.3 Testes toxicogenéticos.....	26
3.3.1 Sistema-teste <i>Allium cepa</i>	28
3.3.1.1 Análises da toxicidade: germinação e crescimento radicular	29
3.3.1.2 Análises de citotoxicidade e de genotoxicidade: análise do ciclo celular	29
3.4 Citometria de Fluxo	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Biodegradação da anilina utilizando microcosmos em condições anaeróbias.....	31
4.2 Biodegradação da anilina utilizando reatores em condições anaeróbias/ microaerada	32
4.3 Experimento com <i>Allium cepa</i>	34
4.3.1 Potencial tóxico: índice de germinação e crescimento radicular	34
4.3.2 Potencial citogenotóxico	35
4.2.3 Citometria de fluxo	35
4.4 Análise estatística	36
5. RESULTADOS	37
5.1 Biodegradação da anilina utilizando microcosmos em condições anaeróbias.....	37
5.2 Biodegradação em ambiente anaeróbio intermitentemente microaerado.....	40
6. DISCUSSÃO	43

7. CONCLUSÕES.....	47
8. REFERÊNCIAS BIOGRÁFICAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

A anilina, também denominada fenilamina ou amino benzeno, é uma amina aromática constituída por um anel de benzeno ligado um grupamento amino. É utilizada principalmente na produção de plásticos, chamados de poliuretanos, como também na fabricação de corantes, medicamentos, como a sulfanilamida, explosivos, e pesticidas tais como alacloro, acetaclor e metolacloro, entre outros. Adicionalmente, a anilina está presente em resíduos gerados por diversos produtos industriais, como por exemplo os corantes tipo azo, utilizados na indústria têxtil (XUE et al., 2019).

A anilina tem causado problemas ambientais graves, devido a sua natureza instável (JIN et al., 2012). Quando em contato com o meio ambiente, apresenta elevada instabilidade molecular formando ligações com a matéria orgânica coloidal, alterando as propriedades da água, de ecossistemas aquáticos e terrestres (ORGE, FARIA e PEREIRA, 2017). Adicionalmente, a anilina pode sofrer processo de oxidação ou ser absorvida pelo solo, originando um produto intermediário secundário, que possui característica de maior toxicidade e que apresenta dificuldade no processo de degradação (SZCZEPANIK e SŁOMKIEWICZ 2016). Dessa forma, a anilina é considerada um poluente orgânico perigoso, que necessita de controle sobre seu uso e descarte no meio ambiente (JIN et al., 2020).

Tecnologias que visam degradar a anilina, gerando subprodutos que não sejam tóxicos vêm sendo estudadas por diversos pesquisadores. A anilina e outras aminas aromáticas podem ser degradadas por processos de biodegradação (NORZAEI et al., 2017; PIRSAHEB et al., 2017), usando diferentes rotas, que consideram a recalcitrância das aminas. Nos processos de biodegradação, a anilina pode ser utilizada como fonte de carbono e energia para as bactérias, usando nitrato ou sulfato como aceptor de elétrons, em condições anaeróbias de degradação (SCHNELL e SCHINK 1991 e KAHNG et al., 2000), ou o oxigênio como aceptor, na degradação aeróbia. No entanto, o processo de degradação aeróbia pode resultar em auto-oxidação das aminas aromáticas, as quais na presença de oxigênio e com elevados gastos energéticos, podem originar subprodutos mais recalcitrantes que conferem coloração às águas ao efluente. Esses processos podem formar subproduto(s) com elevado potencial tóxico (BARSING et al., 2011; ARORA, 2015).

Os efeitos tóxicos da anilina têm sido investigados em diferentes organismos-modelo. Em mamíferos, observou-se, por exemplo, que a anilina pode ser convertida em um intermediário mais tóxico, a fenilhidroxilamina (Bhunja et al., 2003), enquanto em humanos, a exposição prolongada à anilina eleva o risco de cânceres de próstata e de bexiga (MOHANTA e MISHRA, 2020). No peixe-zebra (*Danio rerio*), os efeitos tóxicos da exposição incluem disfunção digestiva (SUN et al., 2013). Além disso, a anilina induziu mudança no comportamento de forrageamento e morte de algas da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata* (DECHUN et al., 2014; MUHIRE et al., 2020). Em plantas, existem poucos relatos dos efeitos tóxicos da anilina. Um estudo recente descreveu o potencial tóxico, citotóxico e genotóxico em células meristemáticas de trigo quando expostas a concentrações superiores a 5 mg.L⁻¹ de anilina (TÃO et al., 2017).

As plantas representam um modelo sensível e eficiente para a condução de estudos, pois permitem uma rápida triagem dos efeitos tóxicos causados pelos poluentes ambientais (HEMACHANDRA e PATHIRATNE, 2015). Dentre os sistemas-teste vegetais, destaca-se o *Allium cepa* L. (cebola), que permite avaliar os efeitos de uma substância sobre a germinação de sementes ou sobre as raízes ou plântulas (toxicidade), no ciclo celular (citotoxicidade) e no material genético (genotoxicidade), possibilitando a compreensão do mecanismo de ação da substância estudada (HEMACHANDRA e PATHIRATNE, 2015; HEMACHANDRA e PATHIRATNE, 2017). É uma espécie com poucos cromossomos ($2n = 16$) e de grande tamanho, o que facilita a realização da avaliação dos danos cromossômicos e das alterações mitóticas, além de apresentar boa correlação com outros sistemas-testes, como com os linfócitos de roedores e humanos (RANK e NIELSEN 1994; LEME et al. 2009).

Dessa forma, o presente trabalho visou avaliar diferentes estratégias de biodegradação da anilina em condições anaeróbia e anaeróbia/microaerada, mediante análise dos efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos da anilina e seus subprodutos antes e após os processos de biodegradação, usando o sistema-teste *A. cepa* como bioindicador.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial citogenotóxico de afluentes e efluentes contendo anilina em diferentes condições de biodegradação, utilizando *A. cepa* como-organismo modelo.

2.2 Objetivo específicos

- Analisar o potencial tóxico de afluentes e efluentes contendo anilina em condições de biodegradação anaeróbia e anaeróbia/microaerada, mediante avaliação do índice de germinação e do crescimento radicular médio de *A. cepa*.
- Examinar o potencial citotóxico dos referidos afluentes e efluentes, mediante análise do índice mitótico e via citometria de fluxo usando células meristemáticas de *A. cepa*.
- Avaliar o potencial genotóxico das amostras por meio da análise de alterações cromossômicas e nucleares em células de *A. cepa*.
- Inferir qual a melhor metodologia para a biodegradação de anilina.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aminas aromáticas

As aminas aromáticas são um grupo químico que derivam de hidrocarbonetos aromáticos e apresentam uma estrutura contendo um átomo de nitrogênio (N) ou um grupamento amina (NH_2). São classificadas de acordo com o número de hidrocarbonetos ligados aos átomos de nitrogênio em primárias, secundárias, terciárias ou quaternárias (MAKHDOUMI et al., 2019), sendo sua solubilidade em água inversamente proporcional ao comprimento da cadeia de hidrocarbonetos. As aminas aromáticas primárias, secundárias e terciárias são bases fracas e a ionização é dependente do valor de pH, enquanto as quaternárias são bases fortes, e se ionizam completamente em qualquer valor de pH. Adicionalmente, podem ser classificadas em mono, poli e heterocíclicas, de acordo com número de anéis aromáticos em suas estruturas moleculares. Observam-se desde estruturas mais simples como a anilina, até altamente complexas, como as estruturas aromáticas heterocíclicas ou conjugadas e com vários substituintes (ALONSO et al., 2005).

As aminas aromáticas são substâncias largamente empregadas em diversos processos industriais, como na fabricação de polímeros sintéticos, adesivos, borrachas, refino de petróleo, produção de produtos farmacêuticos, pesticidas, explosivos, cigarros e na indústria têxtil (PINHEIRO; TOURAUD; THOMAS, 2004). Dentre as aminas aromáticas, destacam-se a adrenalina, a morfina, a cafeína e as anilinas, também denominadas fenilamina ou aminobenzeno e empregadas na produção de corantes de diferentes tonalidades (Figura 1) (APOSTOL et al., 2012).

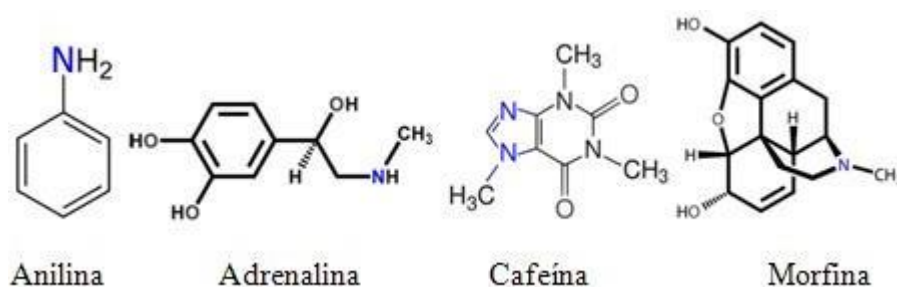


Figura 1. Exemplos de aminas aromáticas. Fonte: Ramos (2013).

A indústria têxtil representa uma das principais fontes poluidoras de aminas aromáticas para o meio ambiente. A contaminação ocorre principalmente pelo processo de biodegradação anaeróbia dos corantes azo por meio da quebra de suas ligações tipo azo. Esse processo resulta na produção de aminas aromáticas, que são mais tóxicas que os próprios corantes (CHAGAS; DURRANT, 2001; APOSTOL et al., 2012). As aminas podem ser facilmente oxidadas gerando na maioria das vezes produtos incolores, embora em alguns casos a oxidação possa gerar produtos coloridos (PINHEIRO et al., 2004; MAKHDOUMI et al., 2019).

O esgoto produzido pela indústria têxtil vem sendo descrito como o mais poluente em termos de volume e composição dentre os efluentes industriais (LOPEZ et al., 2006). Os corantes de tecidos e as aminas aromáticas são considerados recalcitrantes, por resistirem a diversos processos de degradação, incluindo por exemplo aqueles relacionados à ação da luz ultravioleta (PODGORNIK; POLJANSEK; PERDIH, 2001; NILSSON et al., 2006; TAO et al., 2017). Algumas aminas aromáticas, em geral mais tóxicas que os corantes, podem ser facilmente absorvidas pela pele, além de apresentarem elevado potencial carcinogênico e/ou mutagênico para seres humanos. A literatura descreve que pessoas expostas a esses compostos possuem maior tendência a desenvolver algum tipo de câncer no decorrer da vida (ZANONI; CARNEIRO, 2001; PIRA et al., 2010).

3.2 Anilina

Entre os séculos XI e XII, as relações comerciais entre o Ocidente e Oriente se intensificaram principalmente devido às Cruzadas. Produtos oriundos da Índia e da China, como fragrâncias, especiarias, tecidos e corantes, passaram a ser comercializados na Europa. Dentre os produtos, destacava-se um pigmento de grande valor para os tintureiros europeus, conhecido como éndego ou índigo, obtido

da planta *Indigo feratinctoria*, popularmente denominada anileira (ZIDERMAN, 1986; GRIFFITHS, 1999).

O índigo foi um dos primeiros corantes a ser estudado, ponto de partida para a descoberta da anilina. Em 1826, o químico alemão Otto Unverdorben isolou a anilina por meio da degradação do índigo, passando a ser utilizada como precursora de diversos corantes. Contudo, somente após o desenvolvimento da reação de nitração do benzeno, em 1845 por Zinin e Hoffman, iniciou a produção em larga escala de corantes sintéticos a partir da anilina (GRIFFITHS, 1999).

A anilina é uma substância orgânica, com fórmula molecular $C_6H_5NH_2$, e representa a amina aromática mais importante. Em seu estado puro, apresenta-se como uma substância líquida e incolor, de odor característico, porém quando oxidada pela exposição a luz solar, passa a ter uma coloração marrom-avermelhada. Possui temperatura de ebulição de $184^{\circ}C$, de fusão $-6^{\circ}C$ e de inflamabilidade $76^{\circ}C$. É uma substância tóxica, parcialmente solúvel em água (36 g.L^{-1}) e apresenta boa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, como por exemplo, clorofórmio, etanol e benzeno (KAHL; SCHRÖDER, 2007; MAKHDOUMI et al., 2019).

Atualmente, a anilina é utilizada como matéria-prima para vários produtos químicos, sendo o principal deles o Metileno Difenil Diisocianato (MDI), que é um precursor do poliuretano, usado como isolante térmico para diversas finalidades, como por exemplo, na indústria automotiva, na construção civil e na fabricação de móveis (BOUSTEAD, 2005; BOURAIE; DIN, 2016). Além disso, é muito empregada na produção de diversos tipos de pigmentos e corantes, produtos agrícolas como inseticidas, herbicidas e fungicidas, artigos de borracha, polímeros, produtos farmacêuticos e explosivos (TRAVIS, 2007; KAHL et al., 2011).

Na indústria têxtil, cerca de 50% dos processos de coloração possuem a anilina como fonte de matéria-prima, utilizada como base para a produção de pigmentos e corantes, sendo o índigo ainda o corante mais importante obtido via anilina (KAHL et al., 2011). Vale ressaltar que a produção industrial da anilina em larga escala impulsionou esforços científicos voltados para o desenvolvimento de corantes sintéticos em geral, popularizando a anilina como substância precursora para a produção de corantes (KAHL et al., 2011).

No setor agrícola, cerca de 40 princípios ativos presentes em inseticidas, herbicidas e fungicidas possuem a anilina como constituinte. Na indústria farmacêutica, a anilina está presente como precursora na produção de vitaminas,

analgésicos, antipiréticos e antialérgicos, embora essa substância esteja perdendo espaço, em especial na produção de vitaminas, devido à descoberta de novas rotas bioquímicas que possibilitam a substituição da anilina (TRAVIS, 2007; KAHL et al., 2011). Na produção de polímeros, a polianilina é de grande interesse para a indústria por seu potencial de condutividade elétrica (MACDIARMID, 2001; YAN; KAJITA; TOSHIMA, 2002).

3.2.1 Biodegradação da anilina

A natureza recalcitrante e hostil da anilina tem acarretado sérios danos ao meio ambiente (WANG et al., 2014). A anilina é facilmente adsorvida pelo solo, alterando propriedades químicas e físicas da água, dos sedimentos e da matéria biológica (ZHANG et al., 2015). Sua oxidação origina um intermediário com maior toxicidade e de difícil degradabilidade. Nesse sentido, a anilina é classificada como um sério poluente orgânico, que traz prejuízos para rios, lagos e aquíferos e seu descarte no meio ambiente necessita de controle rigoroso (SURESH et al., 2011; CHEN et al., 2013).

O processo de biodegradação pode ser definido como a decomposição de um composto químico por meio da ação biológica de organismos vivos, considerado o mecanismo mais importante de degradação de compostos no meio ambiente (CHANG et al., 2003). Diversas rotas de biodegradação das aminas aromáticas em condições aeróbias têm sido descritas, mesmo considerando a recalcitrância das aminas (VAN DER ZEE; VILLAYERDE, 2005), principalmente daquelas que possuem um grupo sulfônico. Nos processos de degradação aeróbia, as aminas funcionam como fonte de energia e de carbono para as bactérias, e o oxigênio como o aceptor de elétrons. Os processos estão relacionados a elevados custos energéticos e à auto-oxidação por parte de algumas aminas na presença de oxigênio, dando origem a subprodutos também recalcitrantes e que conferem coloração ao efluente em tratamento (BARSING et al., 2011; ARORA, 2015).

Em condições aeróbias, a biodegradação da anilina ocorre inicialmente por sua conversão à catecol, com simultânea liberação de amônia no processo, seguido pela mineralização do catecol pelas rotas de clivagem nas posições orto ou meta do anel benzênico. Em uma das rotas, proposta por Takeo e colaboradores (2013), por exemplo, a conversão inicial da anilina a catecol é mediada por três enzimas, a

glutaminasintase, a glutamina amidotransferase e pela anilina dioxigenase (Figura 2A).

A degradação aeróbia bacteriana das amins aromáticas monocíclicas pode ocorrer por meio de alguns mecanismos, como descrito a seguir: (1) dioxigenação da amina aromática (CHANG et al., 2003); (2) catálise da clivagem do anel aromático por uma dioxigenase; (3) hidroxilação da amina aromática (TAKENAKA et al., 1997); (4) desaminação da amina aromática (QU; ESPANHA, 2011); (5) desalogenação de amina aromática clorada (HONGSAWAT; VANGNAI, 2011); e (6) ativação em tio ésteres da coenzima A, mediada por co-ligase (SCHÜHLE et al., 2001).

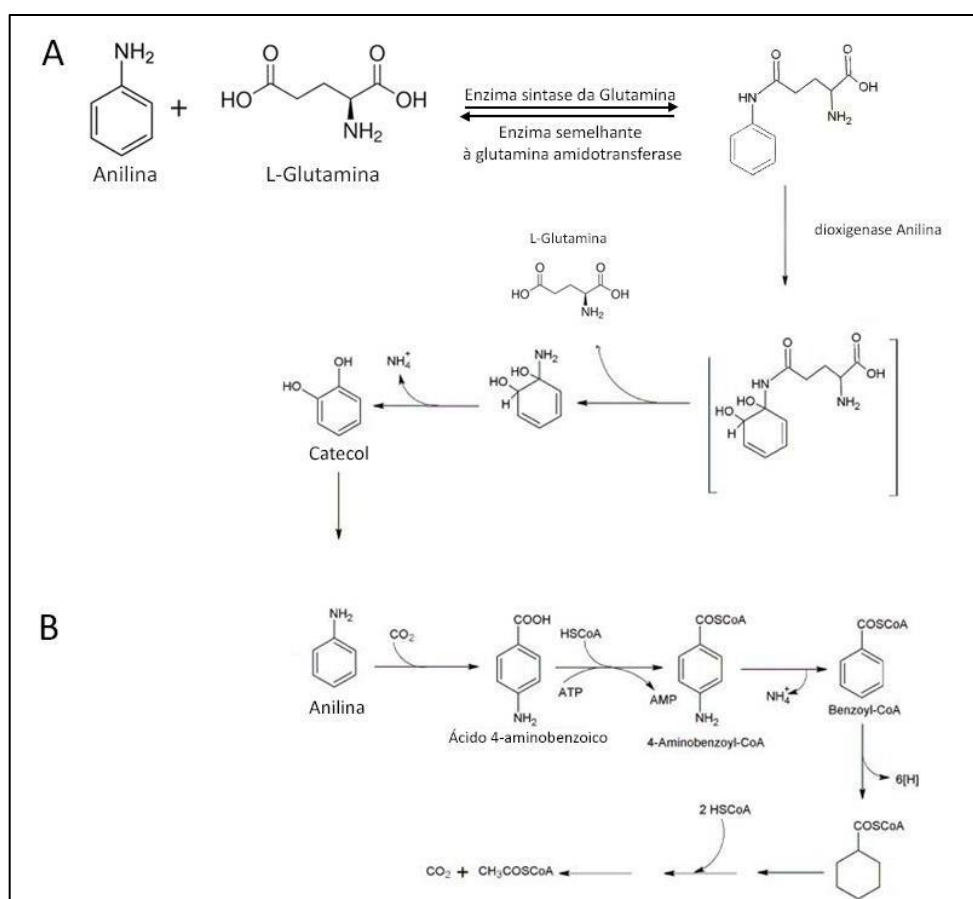


Figura 2. Degradação da anilina por duas vias de degradação. (A) Etapa inicial da degradação aeróbia da anilina com a bactéria *Acinetobacter* sp. YAA gerando como produto final o catecol. (B) Degradação anaeróbia da anilina por meio da bactéria *Desulfobacterium anilini*. Fonte: Adaptado de Arora (2015).

O processo de degradação anaeróbia da anilina foi primeiramente estudado por Schnell e Schink (1991), utilizando a bactéria redutora de sulfato

Desulfobacterium anilini. Nesse processo, a anilina é inicialmente carboxilada em ácido 4-aminobenzoico, o qual posteriormente é convertido em 4-aminobenzoil-CoA, que passa por um processo de desaminação redutiva formando o benzoil-CoA. Este forma três moléculas de acetil-CoA, por meio da rota do benzoato (Figura 2B; KAHNG et al., 2000).

Em ambientes com escassez de oxigênio, como solos, sedimentos e lagos estratificados, a utilização de aceptores de elétrons alternativos ao oxigênio, como magnésio, carbonatos, nitrato e sulfato, é uma possibilidade para a degradação da anilina (VÁZQUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2008; HUANG et al., 2018). Existem poucas bactérias capazes de degradar a anilina sob as duas condições, aeróbia e anaeróbia, podendo ser citada como exemplo a *Delftia* sp. HY99. Esta cepa é capaz de mineralizar a anilina via catecol em condições aeróbias e em ácido 4-aminobenzoico em condições anaeróbias, geralmente com liberação de amônia para o ambiente em ambos os processos (KAHNG et al., 2000; CHANG et al., 2003).

Na ausência de oxigênio, os microrganismos precisam de uma fonte alternativa aceptora de elétrons, pois utilizam reações redox como fonte de energia para a produção de ATP, consumindo anilina e seus subprodutos no crescimento microbiano de quimiorganotróficos (KAHNG, KUKOR e OH, 2000). Em condições anaeróbias, *Delftia* sp. pode utilizar o nitrato como aceptor de elétrons para biodegradação da anilina (KAHNG et al., 2000), que é considerado um ótimo aceptor de elétrons (SUN et al., 2015). O íon sulfato também pode se tornar o aceptor primário de elétrons por sua interação com a matéria orgânica disponível, em ambientes com escassez de oxigênio. A redução do sulfato a sulfeto ocorre com o auxílio de bactérias, denominadas redutoras de sulfato. O sulfeto pode sofrer oxidação anaeróbia por meio da ação de bactérias fototróficas, ou por meio aeróbio com o auxílio de bactérias quimiolitotróficas, ocorrendo a conversão a enxofre elementar ou o retorno ao sulfato.

3.2.2 Genética toxicológica da anilina

Dentre os problemas causados pela exposição dos organismos a agentes químicos, os efeitos genotóxicos e mutagênicos são os mais preocupantes, por estarem associados a danos genéticos e a diversos problemas de saúde, que podem ser transmitidos para as futuras gerações (SURESH et al., 2011). A

exposição à anilina após inalação, absorção cutânea ou ingestão de maneira aguda apresenta como o principal efeito a oxidação da hemoglobina das hemácias, o que leva a formação de metemoglobina. Adicionalmente, a exposição crônica ou a elevadas concentrações pode gerar o surgimento de sinais e sintomas, como cefaleia, dor no corpo, necrose, parestesia, tremor, arritmia cardíaca, coma, podendo evoluir para morte (MOHANTA; MISHRA, 2020). Diversos estudos relativos à toxicidade da anilina têm sido reportados na literatura utilizando diferentes organismos, como humanos, ratos, peixe-zebra, algas e plantas (Tabela 1).

Tabela 1. Organismo-teste expostos a anilina e efeitos observados.

Organismo-teste	Efeito no organismo-teste	Autor (ano)
Humano	Aumento da incidência de câncer de bexiga urinária.	Case et al. (1954) Carréon et al. (2014)
Humano	Danos à pele, presença de metemoglobina e eventos tóxicos no baço.	Korinth et al. (2007)
Rato	Eventos tóxicos no baço, incluindo aumento da nitração de proteínas, esplenomegalia, hiperplasia, fibrose e formação de uma variedade de sarcomas.	Fan et al. (2011)
Rato	Sarcomas esplênicos e fibrose dose-dependente da exposição da anilina, com ocorrência de metaplasia óssea e metástase para a cavidade peritoneal em alguns animais.	Goodman; Ward; Reichardt (1984)
Rato	Toxicidade dos neurônios e do baço, incluindo esplenomegalia, hiperplasia, fibrose e formação de tumor (sarcoma), além de síndrome da excitação hipertônica.	Makhdoumi et al. (2019)
Peixe-zebra	Disfunção digestiva.	SUN et al. (2013)
Algas	Destruição estrutural das algas.	Batterton et al. (1978)
Algas	Interferência no comportamento do forrageamento e destruição celular.	Dechun et al. (2014); Muhire et al. (2020)
Algas	Supressão severa do crescimento.	Li et al. (2015)
Trigo	Efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos, incluindo redução do índice mitótico de células meristemáticas radiculares; presença de alterações nucleares e cromossômicas; redução da altura da parte aérea, do comprimento da raiz, e das massas fresca e seca de mudas de trigo.	Tao et al. (2017)
<i>Suaeda salsa</i>	Redução no crescimento da raiz e caule, redução da presença da clorofila A e B.	Xu et al. (2020a)
<i>Suaeda salsa</i>	Produção de ROS, estresse oxidativo e enzimas da peroxidação lipídica.	Xu et al. (2020b)

A exposição dos seres vivos à anilina necessita ser melhor estudada, visando entender melhor os mecanismos relativos aos efeitos tóxicos. Em ratos e humanos, a exposição à anilina pode afetar o baço e propiciar o surgimento de tumores (CARRÉON et al. 2014). Em humanos, sabe-se que a exposição inalatória e cutânea desencadeia a formação de metemoglobina, a hemólise dos glóbulos vermelhos e alguns eventos tóxicos que ocorrem no baço (CARRÉON et al., 2014). Ratos expostos à anilina, por via oral, inalatória e percutânea, apresentaram danos de toxicidade no baço e em neurônios, incluindo hiperplasia, fibrose, esplenomegalia e tumores. O mecanismo molecular envolvido na toxicidade do baço resulta em uma sobrecarga de ferro que desencadeia o processo de desordem por estresse oxidativo e danos a proteínas, lipídeos e DNA. Quanto à neurotoxicidade, são relatados vários sintomas como dor de cabeça, confusão mental, vômito, náuseas, fraqueza, sonolência, vertigem, letargia, perda de apetite e coma que pode evoluir para óbito. Tais sintomas podem ser potencializados com a idade do animal (MAKHDOUMI et al., 2019). Adicionalmente, em ratos foi observada a ocorrência da síndrome da excitação-hipotônica, representada pela vacuolização intramielínica no cerebelo e na substância branca do tronco cerebral (KHAN; UPAGANLAWAR; UPASANI, 2014).

Tanto em seres humanos quanto em ratos, a anilina pode sofrer transformação para uma substância mais tóxica, a fenil-hidroxilamina, que é um intermediário metabólico. Este participa da formação de metahemoglobina, que causa a perda da capacidade de transporte de oxigênio pela hemoglobina, resultando em hipóxia tecidual que está relacionada a diversos danos no sistema cardiovascular e nervoso e em outros órgãos. Adicionalmente, a exposição crônica ou em elevadas doses à anilina aumenta o risco do desenvolvimento de câncer, com maior recorrência de cânceres de próstata e bexiga em humanos e de sarcomas esplênicos em ratos (GOODMAN; WARD; REICHARDT, 1984; MAKHDOUMI et al., 2019). No peixe-zebra (*Danio rerio*), os efeitos tóxicos da exposição foram observados pela disfunção digestiva (SUN et al., 2013).

Em algas aquáticas da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata*, a anilina afetou a sobrevivência e inibiu severamente o crescimento, observando-se destruição estrutural das algas em 12 h após exposição a tratamentos com anilina em concentrações variando 1 a 200 mg.L⁻¹ (BATTERTON et al., 1978; LI et al., 2015).

Adicionalmente, observou-se interferência no forrageamento e destruição celular de algas da mesma espécie (DECHUN et al., 2014; MUHIRE et al., 2020)

Pouco se sabe sobre os efeitos tóxicos da anilina em plantas, sendo estes raramente relatados na literatura. Em trigo, mudas expostas à anilina em concentrações variando de 25 a 200 mg.L⁻¹ apresentaram efeitos de toxicidade no crescimento, no comprimento da raiz, na altura da parte aérea e no peso seco, demonstrando que a anilina é um poluente grave, capaz de induzir efeitos tóxicos nas mudas de trigo (TAO et al., 2017). Adicionalmente, em *Suaeda salsa*, uma espécie halófito, a anilina induziu diferentes efeitos tóxicos, como redução no crescimento da raiz e caule, redução da presença da clorofila A e B (XU et al., 2020a), produção de ROS, estresse oxidativo e enzimas da peroxidação lipídica (Xu et al., 2020b).

Em estudos de poluentes ambientais comparando-se plantas e animais, as plantas foram consideradas modelos mais sensíveis, convenientes e mais eficientes para o rastreio dos efeitos de poluentes ambientais sob o crescimento e de toxicidade genética (MA et al., 2005).

3.3 Testes toxicogenéticos

A toxicidade de uma substância refere-se à sua propriedade de causar danos a um organismo vivo ou a uma parte específica desse organismo, podendo levar à morte, mediante a exposição a uma determinada concentração por um determinado espaço de tempo, incluindo efeitos tóxicos agudos e crônicos (MORAES, 2012). Diversos organismos-testes têm sido empregados na monitorização e avaliação do potencial tóxico dos efluentes, sendo recomendados na legislação CETESB L5227 e NBR12713: o peixe *Danio rerio*; os microcrustáceos *Daphnia magna*, *D. similis* e a *Artemia salina*; e as bactérias *Photobacterium phosphoreum* e *Vibrio fischeri*, dentre outros (AMARAL et al., 2014). Dentre os modelos vegetais, destaca-se o sistema-teste *A. cepa* que é recomendando pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) pelo Programa de Segurança Química das Nações Unidas (IPCS) por representar um modelo robusto que permite a avaliação dos danos, mediante análise do índice de germinação e do comprimento médio das raízes (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012).

Adicionalmente, as substâncias tóxicas podem apresentar potencial citotóxico, alterando ou inibindo o ciclo celular e causar morte celular (apoptose ou necrose), ou

podem apresentar potencial genotóxico, induzindo alterações no material genético, induzindo alterações nucleares e/ou cromossômicas (VERMA; SRIVASTAVA, 2017).

O potencial citotóxico de uma substância pode ser avaliado mediante análise da viabilidade celular ou por análises citogenéticas. As análises citogenéticas, por sua vez, permitem compreender os mecanismos de ação de compostos tóxicos sobre o ciclo celular. Um composto é classificado como citotóxico quando interfere no ciclo celular, impedindo ou atrasando o início da divisão celular (CHIAVEGATTO et al., 2017).

Uma substância é considerada genotóxica quando possui capacidade de reagir com o DNA, de maneira direta ou após sua ativação metabólica, causando danos estruturais e/ou funcionais. Diante da necessidade de identificar os compostos que reagem e causam danos ao DNA, diversos testes têm sido realizados (DEL RIO et al., 2018), como por exemplo os testes de micronúcleo (SCHIMIDT, 1975) e do cometa, também conhecido como *Single Cell Gel Electrophoresis* (ÖSTLING; JOHANSON, 1987). Análises citogenéticas também podem ser utilizadas avaliação do potencial genotóxico de uma substância, em ensaios denominados de aberrações cromossômicas (CHIAVEGATTO et al., 2017). Neste teste, a genotoxicidade é analisada mediante avaliação das alterações cromossômicas e de proteínas relacionadas ao ciclo mitótico induzindo alterações tais como C-metáfases, anáfases multipolares, pontes cromossômicas, células poliploides, aderências cromossômicas e micronúcleos (WIJEYARATNE e WICKRAMASINGHE, 2020). Os micronúcleos, por exemplo, podem ser resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos perdidos, decorrentes de quebras cromossômicas (efeito clastogênico) ou de alterações na maquinaria mitótica o que causa segregação cromossômica anormal e perda cromossômica (efeito aneugênico) (CARVALHO et al., 2017).

Bioensaios de toxicidade genética com vegetais superiores são particularmente adequados para monitoramento ambiental, por serem alvos diretos de possíveis contaminantes. As plantas são capazes de responder rapidamente a perturbações ambientais (QI; CHEN; LIU, 2015), manifestando alterações em diferentes níveis de toxicidade, incluindo capacidade de germinação, crescimento e sobrevivência, alteração do ciclo celular e indução de alterações cromossômicas (SOUZA, SOUZA e LASCOLA 2018). Dessa maneira, os testes com plantas são

considerados mais eficientes, rápidos e econômicos quando comparados a sistemas animais (YI; MENG, 2003).

3.3.1 Sistema-teste *Allium cepa*

Dentre as espécies vegetais, *A. cepa* vem sendo muito utilizada na avaliação do potencial tóxico, citotóxico e genotóxico de inúmeras substâncias principalmente em estudos de diagnóstico e de monitoramento ambiental (LEME; MARIN-MORALES, 2009; GOMES et al., 2015; KASPER et al., 2018). O sistema-teste *A. cepa* é validado pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) e pelo Programa Internacional sobre Segurança Química (IPCS, OMS) para o monitoramento de citotoxicidade e genotoxicidade de poluentes ambientais (KASPER et al., 2018).

O referido sistema-teste possui alta sensibilidade, boa correlação com sistemas-teste de mamíferos (GRANT, 1982; RANK e NIELSEN, 1993), eficiência e boa padronização em testes de triagem química e monitoramento *in situ* (KASPER et al., 2018). Apresenta como vantagens a disponibilidade de sementes durante todo o ano, elevada tolerância a diferentes condições de cultivo, crescimento rápido das raízes, fácil manuseio, baixo custo, grande número de células em divisão, número reduzido de cromossomos ($2n = 16$) e de grande tamanho, que se coram com facilidade, auxiliando no processo de observação (FERNANDES et al., 2007; LEME; MARINMORALES, 2009).

Diversos estudos com *A. cepa* têm demonstrado sua eficiência como bioindicador para a avaliação de contaminantes ambientais (LEME et al., 2008; HOSHINA et al., 2009; JADHAV et al., 2011). Caritá e Marin Morales (2008), por exemplo, demonstraram a eficácia do sistema-teste na avaliação de contaminantes em recursos hídricos contaminados por efluentes industriais principalmente têxteis. É apontada pelos autores a presença de substâncias tóxicas com potencial de induzir efeitos aneugênicos e clastogênicos, como perdas e quebras cromossômicas respectivamente. Dessa forma, esse organismo modelo vem sendo amplamente utilizado como indicador de toxicidade em estudos de efluentes, proporcionando a avaliação dos efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos dos contaminantes (KASPER et al., 2018).

3.3.1.1 Análises da toxicidade: germinação e crescimento radicular

A toxicidade pode ser analisada mediante avaliação de dano a um sistema biológico, podendo levar à morte, sob certas condições de exposição (DIDWANIA; JAIN; SADANA, 2019). Em *A. cepa*, desequilíbrios fisiológicos, com consequente alterações bioquímicas, podem ser avaliados mediante a análise da influência do agente químico sobre a germinação de sementes e o crescimento radicular (DOS SANTOS FILHO et al., 2019).

O teste de germinação representa um importante meio para a avaliação do potencial tóxico de substâncias ou efluentes. A germinação em geral ocorre mediante reidratação das sementes. Representa uma etapa muito importante do desenvolvimento da planta, que depende de vários eventos fisiológicos, os quais são influenciados por fatores ambientais e por fatores endógenos (inibidores, dormência). Em testes de toxicidade ambiental, as sementes podem ser postas para germinar em contato com soluções contendo substâncias ou efluentes a serem testados, permitindo observar diferenças no índice de germinação das sementes nos tratamentos em relação ao grupo controle germinado em água (CIAPPINA et al., 2017). Martins e colaboradores (2016) utilizaram a técnica de germinação de sementes de *A. cepa* para avaliar o potencial tóxico do lodo de esgoto, onde constaram que o lodo de esgoto inibe a germinação de *A. cepa*.

Avaliações de tamanho e da anatomia das estruturas radiculares também têm sido estudadas na investigação dos possíveis efeitos de contaminantes ambientais em plantas. Em especial, o sistema-teste *A. cepa* se destaca devido à agilidade em detectar os efeitos dos contaminantes, uma vez que as sementes germinam em cerca de 72 h, crescendo aproximadamente 1 cm, o que já é considerado suficiente para observação dos efeitos tóxicos (PERON; CANESINI; CARDOSO, 2009).

3.3.1.2 Análises de citotoxicidade e de genotoxicidade: análise do ciclo celular

A análise do ciclo celular possibilita avaliar os efeitos de um determinado agente sobre o processo de divisão celular. É comumente utilizada na avaliação ambiental após exposição das células aos poluentes, que pode resultar em alterações químicas no DNA ou em proteínas relacionadas. Estas modificações podem afetar processos vitais da célula, como por exemplo, a transcrição e

replicação do DNA, a divisão celular e a regulação gênica, podendo resultar em danos e/ou morte celular (FENECH et al., 2011).

3.4 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que foi inicialmente desenvolvida para a contagem de células sanguíneas (ANDREW, 1934). A técnica foi expandida para outras áreas e atualmente é largamente aplicada em estudos com células vegetais (DOLEŽEL, 1997, DOLEŽEL et al., 2007). Algumas aplicações em plantas já estão bem estabelecidas, como: determinação do nível de ploidia (NADLER et al., 2012), análises de híbridos (CAMPOS et al., 2009), determinação da quantidade de DNA e do tamanho do genoma (GSCHWEND et al., 2013), estudos de ciclo celular (SANDOVAL et al., 2003), detecção de polissomatia (DOLEŽEL, 1997), determinação de aneuploidias e mixoploidias (ROUX et al., 2003), bem como estudos da estabilidade genômica *in vitro* (MALLÓN et al., 2010).

Na investigação de núcleos interfásicos, a intérfase pode ser subdividida em: G₁, momento em que o núcleo apresenta conteúdo de DNA 2C; S, subfase em que ocorre a síntese de DNA e o conteúdo de DNA varia entre 2C e 4C, e G₂, com núcleos com conteúdo de DNA 4C. As células em mitose permanecem com conteúdo de DNA 4C até a sua divisão em duas células-filhas (PINCHEIRA e DE LA TORRE, 2006; VIDAL et al., 2017). O potencial citotóxico de uma dada substância pode ser avaliado mediante comparação com controles negativos de conhecido valor C ao longo do ciclo celular (FIORESI et al., 2020) ou em relação à ausência ou redução de núcleos em G₂/M. Adicionalmente, esse método possibilita a quantificação dos núcleos nos estágios de sub-G₀, que indicam células em processo de morte celular com valores de conteúdo de DNA inferiores a 2C, devido à perda de fragmentos de DNA (JADHAV et al., 2011).

A citometria de fluxo tem sido empregada na análise da poluição ambiental, como solos ou água contaminados com produtos químicos, como metais pesados (CITTERIO et al., 2006; MONTEIRO et al., 2009) e agrotóxicos (FIORESI et al., 2020).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Biodegradação da anilina utilizando microcosmos em condições anaeróbias

Os reatores (microcosmos) utilizados em todas as etapas foram montados em frascos de penicilina com volume total de 120 mL, com volume útil 90 mL e 30 mL correspondente ao *headspace* para ocupação dos gases gerados nos processos bioquímicos (Figura 3). Em cada frasco, foi adicionado 1 mL.L⁻¹ de solução de macro e micronutrientes para permitir condições metabólicas adequadas ao desenvolvimento de microrganismos anaeróbios estritos.

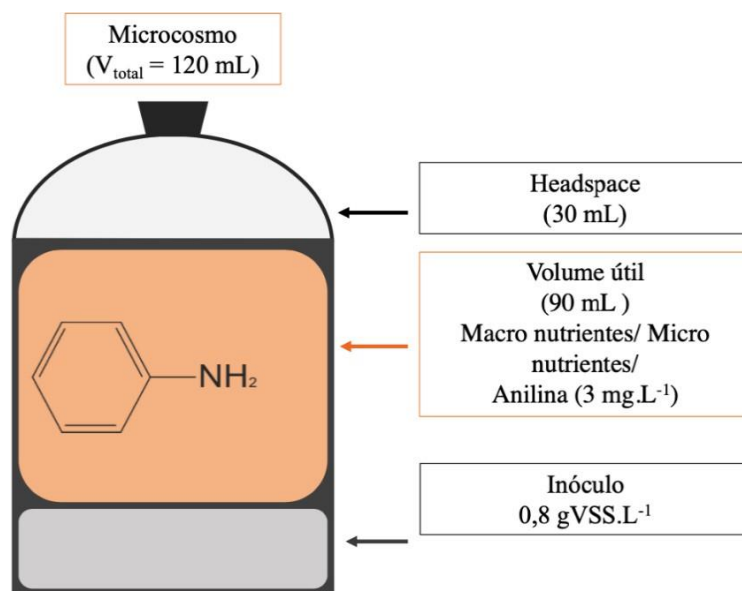


Figura 3. Ilustração descrevendo o sistema de microcosmo, incluindo: *headspace*, volume não ocupado para preenchimento por gases produzidos pela degradação da anilina; volume útil, constituído por macro e micronutrientes além da suplementação da anilina, e inóculo (lodo constituído de bactérias anaeróbias para degradação da anilina). Fonte: o autor

O meio basal foi composto de soluções de macro e micronutrientes para o crescimento e proliferação de bactérias anaeróbias para degradação da anilina. Sendo assim, o mesmo contém, em mg.L⁻¹: KH₂PO₄ (140); K₂HPO₄ (286); NH₄Cl (357); CaCl₂.6H₂O (32); FeCl₃.6H₂O (16); H₃BO₃ (0,4); ZnCl (0,13); Na₂MoO₄.4H₂O (0,13); NiCl₂.6H₂O (0,99); MnCl₂.4H₂O (1,33); CuCl₂.4H₂O (0,13); CoCl₂.6H₂O (1,99); Na₂SeO₃ (0,03); Al₂(SO₄)₃.18H₂O (0,13); MgSO₄.7H₂O (8,3); Resazurina (0,66); NaHCO₃ (1333,25) (EDWARDS e GRBIC-GALIC, 1994). A cultura adaptada

a efluente têxtil foi inoculada com volume suficiente para obter uma concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) de $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$. A anilina com pureza 99,5% (Sigma Aldrich® - CAS Number 62-53-3) a 3 mg.L^{-1} foi utilizada como único substrato para alimentar os reatores.

Após a alimentação dos microcosmos, os mesmos foram purgados com uma mistura de gases N_2/CO_2 na proporção de 80/20%, durante 5 min, a fim de remover o oxigênio remanescente no *headspace*. Após a purga, os microcosmos foram incubados em uma câmara anaeróbia (Plaslabs® – 818GB), preenchida com a mesma proporção de gases, a fim de manter o ambiente sem oxigênio. As amostras foram submetidas a três condições diferentes: (1) anóxica com adição de sulfato (180 mg.L^{-1} de SO_4^{2-}); (2) anóxica com adição de nitrato (11 mg.L^{-1} de NO_3^-), e (3) metanogênica sem adição de aceptor de elétrons. As amostras foram analisadas no dia zero (dia da montagem do experimento), e ao final da primeira degradação, quando a anilina foi consumida totalmente.

Para quantificação da anilina, foi utilizado um cromatógrafo líquido do tipo HPLC SHIMADZU® LC-20AT, equipado com uma coluna de fase reversa do modelo LiChospher® 100 RP-18 ($5 \mu\text{m}$). A fase móvel foi composta por acetonitrila 40% e água Milli Q 60% sob condições isocráticas. O fluxo da fase móvel foi ajustado para 1 mL.min^{-1} . Foi utilizado $50 \mu\text{L}$ como volume de injeção. O pico de detecção da anilina foi medido no comprimento de onda de 230 nm, com tempo de retenção de 6,1 min.

4.2 Biodegradação da anilina utilizando reatores em condições anaeróbias/microaerada

Foi utilizado como composto alvo a anilina, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$, cujo peso molecular é de 93,13 g/mol, com pureza de 99% (Sigma-Aldrich®, CAS# 62-53-3, St. Luis, EUA). A anilina foi adicionada ao reator não aerado a uma concentração inicial de 0,14 mM ($13,2 \text{ mg.L}^{-1}$) para todas as condições para adsorção da mesma pela biomassa. A concentração inicial utilizada corresponde a três vezes à concentração esperada de anilina a ser encontrada após a degradação anaeróbia de um efluente têxtil real, baseada em Amorim et al. (2013). Tal concentração foi calculada por meio da média da molaridade de quatro corantes diferentes, correspondente a 65 mg.L^{-1} , para um cálculo estequiométrico: o corante mono azo Acid Orange 7 ($\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{NaO}_4\text{S}$; peso molecular: 350,3 g/mol), o di azo Reactive Black 5 ($\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{Na}_4\text{O}_{19}\text{S}_6$; peso

molecular: 991,82 g/mol), o tri azo Direct Blue 71 ($C_{40}H_{28}N_7NaO_{13}S_4$; peso molecular: 965,94 g/mol) e o tetra azo Direct Black 22.

O meio basal utilizado continha, em $mg.L^{-1}$: NH_4Cl (280), K_2HPO_4 (252), $MgSO_4.7H_2O$ (100), $CaCl_2$ (7), além de 1 mL/L de solução de micronutrientes. Esta foi composta em $mg.L^{-1}$ por: $FeCl_2.4H_2O$ (2000), H_3BO_3 (50), $ZnCl_2$ (50), $MnCl_2.4H_2O$ (500), $CuCl_2.2H_2O$ (38), $(NH_4)Mo_7O_{24}.4H_2O$ (50), $AlCl_3.6H_2O$ (90), $CoCl_2.6H_2O$ (2000), $NiCl_2.6H_2O$ (142), EDTA (1000), HCl 36% (1). Água deionizada foi utilizada na preparação. Também foi adicionado ao meio basal ácido sulfanílico [$4-(H_2N)C_6H_4SO_3H$], por ser uma amina aromática produto de degradação dos corantes, que foi considerada nos cálculos de concentração da anilina.

O inóculo foi proveniente da mistura de lodo anaeróbio de reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), em escala real, tratando efluentes petroquímicos do Porto de Suape, em Ipojuca (PE - Brasil), com lodo anaeróbio de reator UASB em escala piloto tratando efluentes têxteis, em Recife (PE - Brasil). A proporção utilizada foi de 27:1 (têxtil: petroquímico), devido à concentração de VSS (*Volatile Suspended Solids*), que foram $30,53 gVSS.L^{-1}$ e $2,03 gVSS.L^{-1}$, respectivamente, resultando em uma concentração final de VSS no licor misto de $7,0 gVSS.L^{-1}$. O lodo foi previamente elutriado em tubos Falcon de 50 mL, por centrifugação à rotação de 3500 rpm, durante 7 min, com o uso de solução tampão de fosfato (PBS) 1x.

Foi utilizado um reator em acrílico, com volume total de 6 L e um volume útil de 4 L, sendo o enchimento feito manualmente e a agitação por meio de agitador magnético da IKA Works para misturar a biomassa e o oxigênio fornecido ao efluente (Ceramag Midi, EUA) (Figura 4). A aeração foi proporcionada por bombas de ar da marca Jad (Air-Pump S-2000, Brasil), sendo sua vazão mantida em $0,25 L.min^{-1}$ por meio do rotâmetro da Tecnofluid (RV-140-K-7-P, Brasil) e distribuída uniformemente por uma mangueira de borracha micro porosa da Resun (Air Curtain, China), posicionada no fundo do reator. A intermitência da aeração foi controlada por *timer* da marca Clip (CLB-40, Brasil) e o oxigênio dissolvido (OD) variou de $0,01 mg.L^{-1}$ a $0,70 mg.L^{-1}$.

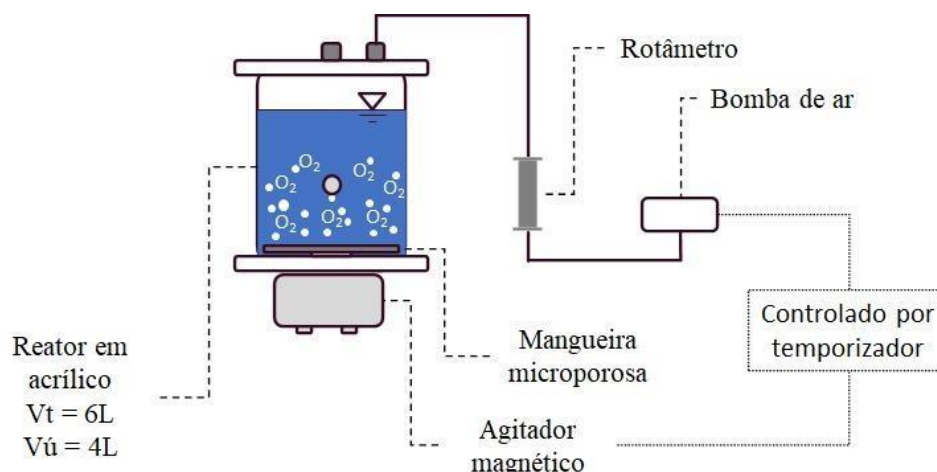


Figura 4. Esquema mostrando a geração das amostras no reator. O oxigênio foi bombeado com uma bomba de ar para o contato com o afluente, enquanto agitador magnético foi utilizado para misturar a anilina ao afluente, visando ao maior contato entre anilina e inóculo. Fonte: o autor.

Três condições em série foram analisadas, em bateladas únicas, tendo cada condição três alimentações. A primeira foi caracterizada pela presença de pulsos de microaeração de 30 min a cada 2 h (condição 1); a segunda por pulsos de 15 min, também a cada 2 h (condição 2), e a terceira por pulsos de 10 min a cada 2 h (condição 3). Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente ($27,4 \pm 0,7$ °C), incluindo os afluentes (amostras antes do processo de biodegradação) e os efluentes (amostras após o processo de biodegradação) para as análises toxicogenéticas.

4.3 Experimento com *Allium cepa*

A germinação das sementes de *A. cepa* foi realizada em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, com duas folhas de papel filtro fino, contendo 5 mL de amostra dos afluentes e efluentes como descritos anteriormente. Como controle negativo foi utilizada água mineral e como controle positivo foram utilizados o Metil Metanosulfonato (MMS, 4×10^{-4} M) e a Trifluralina 0,84 ppm. As placas foram lacradas com papel filme. A germinação ocorreu no escuro a 24 ± 1 °C.

4.3.1 Análise do potencial tóxico da anilina: índice de germinação e crescimento radicular

O potencial tóxico foi avaliado mediante análise do índice de germinação das

sementes e do comprimento médio das raízes após 72 h da montagem do experimento conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Para o índice de germinação, cada tratamento foi constituído por quatro repetições. Foi calculada a porcentagem de sementes germinadas por unidade de repetição (placa com 70 sementes) e a média aritmética por tratamento. O comprimento das raízes foi medido com o auxílio de um paquímetro digital, sendo o comprimento médio de cada tratamento calculado com base na média de 10 repetições, cuja unidade experimental consistiu em uma raiz (uma raiz por semente).

4.3.2 Análise do potencial citogenotóxico da anilina

Após 72 h, as raízes foram fixadas em Carnoy I (álcool etílico: ácido acético, 3:1, v/v) e posteriormente armazenadas a - 20°C. Em seguida, as raízes foram lavadas por três vezes em água destilada por 5 min cada, hidrolisadas em HCl 5 N por 8 min a 60 °C e lavadas novamente em água destilada por três vezes. As pontas das raízes foram submetidas ao reativo de Schiff por 2 h no escuro e lavadas para completa remoção do reagente. Os meristemas foram esmagados em lâmina, contra-corados com uma gota de carmim acético a 2% e montados com Entellan®. O material foi analisado em microscópio de luz com aumento de 1000 x. Cada tratamento foi constituído por 10 repetições, cuja unidade experimental consistiu em 500 células por lâmina, totalizando 5.000 células por tratamento.

O potencial citotóxico dos efluentes e de suas diluições foi avaliado por meio do cálculo do índice mitótico (IM) médio, enquanto o potencial genotóxico foi avaliado pelo índice de genotoxicidade (IGen) médio, calculado com base na porcentagem de alterações nucleares e cromossômicas por unidade de repetição. As células foram analisadas quanto à presença de alterações, tais como anáfases multipolares, C-metáfases, brotos nucleares, aderências cromossômicas, perdas e pontes cromossômicas e micronúcleos (MN).

4.2.3 Citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada apenas para o experimento de biodegradação da anilina utilizando microcosmos em condições anaeróbias. As suspensões nucleares foram obtidas pelo método descrito por Galbraith et al. (1983). Foram realizadas três repetições, constituídas por 20 radículas cada. Os meristemas foram seccionados usando uma lâmina de bisturi em placas de Petri

contendo 2 mL de tampão de lise LB01 sobre gelo. Com os núcleos isolados, as suspensões foram filtradas com uma malha de nylon de 45 µm para eliminar resíduos. Estes foram então corados com 50 µL de iodeto de propídio (1 mg.L⁻¹) e analisados em citômetro de fluxo Partec (Nova Sysmex).

Foram determinadas as frequências dos núcleos nas fases G₁ (conteúdo de DNA 2C), S (conteúdo de DNA entre 2C e 4C) e G₂ (conteúdo de DNA 4C). As populações celulares com quantidades inferiores a 2C de DNA foram identificadas como partículas sub-G₁, sendo considerados núcleos em morte celular.

4.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software BioEstat 5.3. A avaliação da distribuição dos dados em relação à normalidade foi realizada pelo teste de Lilliefors (SILVA e AZEVEDO, 2002), enquanto a homogeneidade da variância foi avaliada pelo teste de Cochran (AYRES et al., 2007). Como os dados não apresentaram distribuição normal nem homogeneidade, foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *a posteriori* Student-Newman-Keuls (p <0,05 ou p<0,01) (AYRES et al., 2007). Para a análise estatística, os dados foram transformados usando a fórmula arco seno $\sqrt{\frac{\%}{100}}$.

5. RESULTADOS

5.1 Biodegradação da anilina utilizando microcosmos em condições anaeróbias

No experimento de biodegradação da anilina em condições anaeróbias na avaliação do potencial tóxico, observou-se redução significativa tanto do índice de germinação quanto do comprimento médio das raízes para o afluente na condição metanogênica sem adição de acceptor de elétrons (62,25%; 0,6 cm), e para o efluente na condição anóxica com adição de sulfato (54,5%; 0,5 cm) em relação ao controle negativo (84,25%; 1,6 cm) (Tabela 2). Adicionalmente, foi observada redução significativa do crescimento radicular para o efluente na condição metanogênica sem adição de acceptor de elétrons. O tratamento na condição anóxica com adição de nitrato foi único que não apresentou potencial tóxico nem para o afluente (81,75%; 1,7 cm) nem para o efluente (79,25%; 1,65 cm).

Tabela 2. Ensaio com sistema-teste *Allium cepa* após 72 h de exposição das sementes a amostras antes e após tratamentos de biodegradação da anilina em condições anaeróbias com ou sem aceptores de elétrons, incluindo dados de índice de germinação, comprimento médio das raízes e índice mitótico

Tratamento	Amostra	Índice Germinativo (%)	Comprimento Médio das Raízes (cm)	Índice Mitótico (%)	Índice de Genotoxicidade (%)
	CN (Água mineral)	84,25 ± 5,20	1,60 ± 0,30	20,50 ± 3,50	0,01 ± 0,01
	CP (MMS)	-	-	-	9,80 ± 2,25**
	CP (Trifluralina)	-	-	-	9,65 ± 1,45**
Anaeróbio	Af/ Metanogênica sem acceptor de elétrons	62,25 ± 7,25*	0,60 ± 0,06**	2,25 ± 0,25*	4,10 ± 1,75*
	Ef/ Metanogênica sem acceptor de elétrons	75,50 ± 4,75	0,80 ± 0,07**	1,25 ± 0,30**	0,30 ± 0,05*
	Af/ Anóxica com sulfato	84,50 ± 5,25	1,25 ± 0,10	2,50 ± 0,50*	0,85 ± 0,10*
	Ef/ Anóxica com sulfato	54,50 ± 325*	0,50 ± 0,04**	2,25 ± 0,25*	0,20 ± 0,05*
	Af/ Anóxica com nitrato	81,75 ± 5,75	1,70 ± 0,25	3,25 ± 0,50*	0,40 ± 0,01*
	Ef/ Anóxica com nitrato	79,25 ± 2,25	1,65 ± 0,20	9,50 ± 0,75	0,15 ± 0,05

CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo; MMS = Metil metanosulfonato; Af = Afluente; Ef = Efluente. * Diferente significativamente em relação ao CN em uma mesma coluna pelo teste de Kruskal-Wallis com teste a posteriori de Tukey (* p < 0,05; ** p < 0,01). Em negrito, encontram-se os valores semelhantes estatisticamente ao CN em uma mesma coluna.

No que diz respeito à citotoxicidade, o índice mitótico foi semelhante estatisticamente ao controle negativo (20,5%) apenas para o efluente na condição anóxica com adição de nitrato (9,5%) (Tabela 2). As demais condições apresentaram um baixo índice de divisão celular com efeito citotóxico significativo nas células meristemáticas de *A. cepa*. Nas análises de citometria de fluxo, foi observada morte celular para o afluente na condição metanogênica sem adição de acceptor, observada pela alta porcentagem de núcleos na fase sub- G_0 (8,5%) diferente estatisticamente do controle negativo (3,5%) (Tabela 3). Com exceção do efluente da condição anóxica com adição de nitrato, houve um aumento significativo da porcentagem dos núcleos de *A. cepa* na fase G_1 , redução significativa da porcentagem de núcleos na fase S e em G_2/M para todos os afluentes e efluentes, quando comparados ao controle negativo (57,5; 18,3 e 19,8%, respectivamente), estacionando as células em intérfase. Por outro lado, efluente da condição anóxica com adição de nitrato, reduziu estatisticamente a porcentagem de núcleos G_1 (35,75%), aumentou os núcleos em S (49,0%), e manteve valores semelhantes de porcentagem de núcleos em G_2/M (15,2%) em relação ao controle negativo.

Tabela 3. Porcentagem (%) de núcleos meristemáticos de *Allium cepa* nas fases do ciclo celular, após exposição das sementes por 72 h a amostras antes e após tratamentos de biodegradação da anilina em condições anaeróbicas com ou sem aceptores de elétrons, analisados por citometria de fluxo.

Tratamento	Amostra	Núcleos em Sub- G_0 (%)	Núcleos em G_1 (%)	Núcleos em S (%)	Núcleos em G_2/M (%)
	CN (Água mineral)	3,50 ± 0,60	57,50 ± 2,05	18,30 ± 0,40	19,80 ± 2,70
	Af/ Metanogênica sem acceptor de elétrons	8,50 ± 0,55**	78,30 ± 1,14*	7,10 ± 2,60**	5,20 ± 0,15**
	Ef/ Metanogênica sem acceptor de elétrons	4,65 ± 1,05	76,35 ± 1,00*	10,30 ± 0,75*	8,90 ± 1,25*
Anaeróbio	Af/ Anóxica com sulfato	3,15 ± 0,15	78,40 ± 1,05*	11,30 ± 0,95*	8,15 ± 0,70**
	Ef/ Anóxica com sulfato	2,65 ± 0,45	71,60 ± 1,05*	10,70 ± 2,35*	11,40 ± 1,25*
	Af/ Anóxica com nitrato	3,50 ± 0,60	77,50 ± 2,05*	9,80 ± 2,40*	8,35 ± 0,70**
	Ef/ Anóxica com nitrato	2,00 ± 0,25	35,75 ± 1,95*	49,00 ± 0,90*	15,20 ± 0,60

CN = Controle Negativo; Af = Afluente; Ef = Efluente. * Diferente significativamente em relação ao CN em uma mesma coluna pelo teste Scott Knott (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Em negrito, encontram-se os valores semelhantes estatisticamente em uma mesma coluna ao controle negativo.

No que se refere ao potencial genotóxico, os afluentes e efluentes em todas as condições apresentaram aumento na frequência de anormalidades nucleares e cromossômicas, com exceção do efluente na condição anóxica com adição de nitrato (Tabela 2). O afluente na condição metanogênica sem adição de aceptor de elétrons induziu alterações significativas como brotos nucleares, C-metáfases, micronúcleos e quebras cromossômicas (Tabela 4). Tanto afluente quanto efluente em condição anóxica com adição de sulfato induziram significativamente apenas brotos nucleares (Tabela 4). Os controles positivos apresentaram ação genotóxica significativa para as quatro alterações citadas acima. Adicionalmente, o MMS, de destacada ação clastogênica, propiciou a presença significativa de quebras, pontes e perdas cromossômicas, além de metáfases com aderências. Por outro lado, a trifluralina, de ação aneugênica, induziu significativamente anáfases multipolares, células poliploides, núcleos lobulados, pontes e perdas cromossômicas.

Tabela 4. Alterações cromossômicas e índices de genotoxicidade em meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição das sementes por 72 h a amostras antes e após tratamentos de biodegradação da anilina em condições anaeróbicas com ou sem aceptores de elétrons.

Tratamento	Amostra	C-metáfase (%)	Broto nuclear (%)	Quebra Cromossômica (%)	Micronúcleo (%)	Índice de Genotoxicidade (%)
	CN (Água mineral)	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01
	CP (MMS)	1,05 ± 0,10*	1,70 ± 1,10*	5,15 ± 0,40**	1,55 ± 0,45**	9,80 ± 2,25**
	CP (Trifluralina)	1,50 ± 0,50*	1,20 ± 0,30*	0,70 ± 0,25*	0,90 ± 0,20*	9,65 ± 1,45**
Anaeróbio	Af/ Metanogênica sem aceptor de elétrons	0,20 ± 0,01*	2,80 ± 1,05**	0,50 ± 0,05*	0,60 ± 0,02*	4,10 ± 1,20*
	Ef/ Metanogênica sem aceptor de elétrons	0,05 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,30 ± 0,05*
	Af/ Anóxica com sulfato	0,05 ± 0,01	0,35 ± 0,05*	0,10 ± 0,02	0,35 ± 0,05	0,85 ± 0,15*
	Ef/ Anóxica com sulfato	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,05*	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,05*
	Af/ Anóxica com nitrato	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,40 ± 0,05*
	Ef/ Anóxica com nitrato	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,15 ± 0,05

CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo; MMS = Metil metanosulfonato; Af = Afluente; Ef = Efluente * Diferente significativamente em relação ao CN em uma mesma coluna pelo teste Kruskal-Wallis com teste a

posteriori de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Em negrito, encontram-se os valores semelhantes estatisticamente ao CN em uma mesma coluna.

5.2 Biodegradação em ambiente anaeróbio intermitentemente microaerado

No experimento de biodegradação em ambiente anaeróbio com microaeração intermitente, os afluentes em todos os tempos de microaeração testados induziram toxicidade, com redução no índice de germinação (53,5 a 58,5%) e no comprimento médio das raízes (0,8 a 0,85 cm), citotoxicidade (índice mitótico de 0,5 a 0,8%) e genotoxicidade (0,3 a 0,45%) em relação ao controle negativo (84,25%; 1,6 cm; 20,5 e 0,01%, respectivamente) (Tabela 5). Por outro lado, os efluentes após tratamentos com microaeração de 30 e 15 min apresentaram valores de índice de germinação (81,5 e 82,25%, respectivamente), de crescimento radicular (1,60 e 1,25 cm), de índice mitótico (11,75 e 13,50%) e de genotoxicidade (0,02 e 0,03%) semelhantes estatisticamente ao controle negativo, indicando ausência de toxicidade e de citogenotoxicidade após ambos os tratamentos. Contudo, embora o efluente tratado com microaeração de 10 min não tenha apresentado toxicidade (índice de germinação de 77,75% e comprimento médio das raízes de 1,05 cm), foram observados potenciais citotóxicos e genotóxicos com índices de 0,6 e 0,25%, respectivamente.

Afluente na condição de 30 min de microaeração induziu significativamente a formação de brotos nucleares e micronúcleos, enquanto o afluente com 10 min de microaeração induziu quebras cromossômicas e micronúcleos, indicando ação principalmente clastogênica (Tabela 6). Por outro lado, C-metáfases resultantes de uma ação aneugênica, foram significativas no efluente com 10 min de microaeração.

As amostras de efluente no tempo de 30 e 15 min microaerado não apresentaram potenciais tóxicos, citotóxicos e genotóxicos. Foram semelhantes estatisticamente ao controle negativo.

Tabela 5. Ensaio com sistema-teste *Allium cepa* após 72 h de exposição das sementes a amostras antes e após tratamentos de biodegradação anaeróbios/microaerados, incluindo dados de índice de germinação, comprimento médio das raízes e índice de genotoxicidade.

Tratamento	Amostra	Índice Germinativo (%)	Comprimento Médio das raízes (cm)	Índice mitótico (%)	Índice de Genotoxicidade (%)
	CN (Água mineral)	84,25 ± 5,20	1,60 ± 0,30	20,50 ± 3,50	0,01 ± 0,01
	CP (MMS)	-	-	-	9,80 ± 2,25**
	CP (Trifluralina)	-	-	-	9,65 ± 1,45**
Anaeróbio/ Microaerado	Afluente ₃₀ min aeração	51,75 ± 4,25*	0,80 ± 1,30**	0,50 ± 0,10**	0,45 ± 0,02*
	Efluente ₃₀ min aeração	81,50 ± 4,25	1,60 ± 0,25	11,75 ± 1,50	0,02 ± 0,01
	Afluente ₁₅ min aeração	53,50 ± 3,50*	0,85 ± 1,25**	0,80 ± 0,25**	0,30 ± 0,02*
	Efluente ₁₅ min aeração	82,25 ± 4,75	1,25 ± 0,20	13,50 ± 1,25	0,03 ± 0,01
	Afluente ₁₀ min aeração	58,50 ± 8,50*	0,85 ± 0,10**	0,50 ± 0,10**	0,40 ± 0,05*
	Efluente ₁₀ min aeração	77,75 ± 5,25	1,05 ± 0,20	0,60 ± 0,15**	0,25 ± 0,01*

CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo; MMS = Metil metanosulfonato. Diferente significativamente em relação ao CN em uma mesma coluna pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *a posteriori* de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Em negrito, encontram-se os valores semelhantes estatisticamente ao CN em uma mesma coluna.

Tabela 6. Alterações cromossômicas e índices de genotoxicidade em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição das sementes por 72 h a amostras antes e após os tratamentos de biodegradação anaeróbios/ microaerados.

Tratamento	Amostra	C-metáfase (%)	Broto nuclear (%)	Quebra Cromossômica (%)	Micronúcleo (%)	Índice de Genotoxicidade (%)
	CN (Água mineral)	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01
	CP (MMS)	1,05 ± 0,10*	1,70 ± 1,10*	5,15 ± 0,40**	1,55 ± 0,45**	9,80 ± 2,25**
	CP (Trifluralina)	1,50 ± 0,50*	1,20 ± 0,30*	0,70 ± 0,25*	0,90 ± 0,20*	9,65 ± 1,45**
Anaeróbio/ Microaerado	Afluente ₃₀ min aeração	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,01*	0,05 ± 0,01	0,20 ± 0,05*	0,45 ± 0,02*
	Efluente ₃₀ min aeração	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01
	Afluente ₁₅ min aeração	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,15 ± 0,05	0,30 ± 0,02*
	Efluente ₁₅ min aeração	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01
	Afluente ₁₀ min aeração	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,05*	0,20 ± 0,02*	0,40 ± 0,05*
	Efluente ₁₀ min aeração	0,20 ± 0,01*	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,25 ± 0,01*

CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo; MMS = Metil metanosulfonato. Diferente significativamente em relação ao CN em uma mesma coluna pelo teste Kruskal-Wallis com teste *a posteriori* de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Em negrito, encontram-se os valores semelhantes estatisticamente ao CN em uma mesma coluna.

6. DISCUSSÃO

A presença de anilina em efluentes acarreta diversos riscos à saúde dos animais e seres humanos, devido ao potencial cancerígeno que apresenta (WARD et al., 1996). Deve-se ressaltar que além do câncer propriamente dito, a anilina pode desencadear danos genéticos (RESS et al., 2002; JONES e FOX, 2003). No presente trabalho, o potencial tóxico e citogenotóxico da anilina foi avaliado antes e após a biodegradação por microrganismos em ambientes anaeróbios e anaeróbios/microaerados, visando inferir sobre a melhor estratégia para degradação da anilina e geração de resíduos atóxicos. Tanto o tratamento de biodegradação em condição anóxica utilizando o nitrato como acceptor de elétrons, quanto em condição anaeróbia em bateladas únicas com pulsos de 15 ou de 30 min de microaeração a cada 2 h foram eficientes para remoção da toxicidade dos afluentes contendo anilina.

Quando a anilina é degradada na presença de oxigênio, ocorre a formação de metabólitos intermediários, como o catecol e o ácido benzoico (ARORA, 2015), os quais apresentam potencial citogenotóxico (KAMAYA, FUKAYA e SUZUKI, 2005; KERMANI, et al., 2018). Na ausência de oxigênio, o único produto intermediário é o ácido benzoico. Por outro lado, quando o processo de biodegradação é eficiente, o catecol e/ou o ácido benzoico são degradados gerando água, íons amônio e gás carbônico (ARORA, 2015). Os tratamentos anaeróbios utilizando nitrato como acceptor de elétrons ou microaerado com pulsos de oxigênio de 15 ou 30 min não apresentaram toxicidade, demonstrando que esses tratamentos degradaram a anilina e os metabólitos intermediários, sendo assim consideradas ótimas estratégias para biorremediação. Contudo, os tratamentos anaeróbios sem acceptor de elétrons ou com íons sulfato ou microaerado com pulsos de oxigênio 10 min não foram capazes de remover a toxicidade, provavelmente pela não degradação do(s) metabólito(s) intermediário(s) formado(s), induzindo danos toxicogenéticos a *A. cepa*.

A anilina antes e após algumas condições de tratamento de biodegradação apresentaram toxicidade para *A. cepa*, observada como redução da taxa de germinação e do crescimento radicular, corroborando a sensibilidade de *A. cepa* na detecção de efeitos ecotoxicológicos de afluentes e efluentes (VISCARDI et al., 2020). Em sementes de trigo, a anilina teve a capacidade de inibir a germinação, quando expostas a concentrações igual ou superiores a 50 mg.L⁻¹, e de reduzir o

crescimento radicular em concentrações a partir de 25 mg.L⁻¹ (Tao et al. 2017). De modo semelhante, concentrações de anilina de 4 a 8 mg.L⁻¹ reduziram o crescimento radicular de mudas da planta halófito *Suaeda salsa*, indicando que anilina é um poluente orgânico causador de danos aos vegetais superiores (Xu et al., 2020a). Esses efeitos inibitórios do crescimento radicular estão associados ao aumento significativo do total de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio (ROS), em decorrência da alteração da produção de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD), resultando em uma super produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e indução da peroxidação lipídica (XU et al., 2020b).

A anilina e alguns de seus subprodutos gerados principalmente em condição metanogênica sem aceptor de elétrons ou anóxica usando sulfato como aceptor de elétrons também geraram citogenotoxicidade frente a *A. cepa*, observada tanto pela redução do índice mitótico quanto pelo aumento das taxas das alterações cromossômicas durante o processo de mitose. Os resultados encontrados corroboram dados prévios relativos à investigação da citogenotoxicidade da anilina em células animais e vegetais (MAKHDOUMI et al. 2019; XU et al., 2020b), como observado por exemplo para células meristemáticas de trigo, com redução do índice mitótico e aumento de alterações cromossômicas (TAO et al., 2017). O aumento dos níveis de anilina em nível intracelular propicia a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) bem como de outras substâncias nocivas, interferindo ou inibindo a síntese de proteínas que participam da mitose (BRENNAN e SCHIEST, 1997), aumentando seu potencial citogenotóxico (RESS et al., 2002). Apenas os tratamentos anaeróbios/microaerados em tempos de 30 ou 15 min e anaeróbio usando nitrato como aceptor de elétrons apresentaram índice mitótico e índice de genotoxicidade semelhantes estatisticamente ao controle negativo.

A redução da atividade mitótica analisada a partir da citometria de fluxo indica a citotoxicidade de uma amostra e está associada a modificações na regulação do ciclo celular, tanto no ponto de verificação G₁/S quanto no ponto G₂/M, retardando ou impedindo a ocorrência da mitose (FIORESI et al., 2020). No presente trabalho, os afluentes e efluentes nas condições metanogênica sem adição de aceptor, anóxica com adição de sulfato e o afluente anóxica com adição de nitrato apresentaram um aumento de núcleos em G₀/G₁. Aparentemente, a anilina e/ ou seus subprodutos causaram atraso na progressão do ciclo celular mediante interferências no ponto de verificação de G₁/S.

A anilina também tem sido relacionada a eventos tóxicos que ocasionam morte celular (WANG et al., 2016). No presente estudo, o aumento significativo em núcleos em sub-G₀ no afluyente metanogênico sem adição de aceptor de elétrons indica a ativação de mecanismos de morte celular, que é o último recurso para evitar a proliferação de células anormais. Quando danos celulares não são reparados em G₁, as vias de morte celular podem ser ativadas (REAPE e MCCABE, 2010).

A ação mitodepressiva também resultou na baixa taxa de células com alterações cromossômicas e formação de micronúcleos. Quando um agente é altamente citotóxico, seu efeito genotóxico pode ser mascarado (DHYÈVRE et al., 2014, SOUZA, SOUZA e LASCOLA, 2018). No presente trabalho, diferentes danos genotóxicos foram induzidos pelos afluentes e alguns efluentes, tanto do tipo clastogênico, relativos a quebras cromossômicas, quanto aneugênico, relativos a problemas na formação do fuso mitótico. Em trabalho prévio, Bomhard (2003) descreveu diferentes danos genotóxicos em fêmeas de ratos quando expostas à anilina mediante análise de aberrações cromossômicas. Os danos foram classificados como clastogênicos, devido aos altos índices de quebras e fragmentos cromossômicos, além da indução de micronúcleos em eritrócitos policromáticos da medula óssea. A formação de micronúcleos pode ocorrer como resultado de quebras cromossômicas no decorrer do processo de divisão celular, ou de perda de cromossomos devido a problemas na formação do fuso mitótico (HINTZSCHE et al., 2017). No presente trabalho, os micronúcleos formados parecem ser decorrentes de fragmentos cromossômicos, tendo em vista que cromossomos perdidos não foram visualizados nas células em mitose.

O dano genético observado em decorrência da exposição à anilina encontrado no presente estudo corrobora o potencial tóxico, citotóxico e genotóxico da anilina observado para outros vegetais (TAO et al., 2017; XU et al. 2020a, b). Em *A. cepa*, a anilina foi capaz: de reduzir a germinação de sementes e o crescimento das raízes; de retardar ou bloquear o ciclo celular; de induzir alterações cromossômicas e nucleares, incluindo quebras cromossômicas e micronúcleos, e de causar o desequilíbrio à polimerização dos microtúbulos, observado nas C-metáfases. Adicionalmente, mitose anormal e reduzida pode ter contribuído para redução do crescimento das raízes da cebola (YUAN, et al., 2019). Dessa forma, pode-se dizer que o teste de citogenotoxicidade usando o sistema-teste *A. cepa* representa uma ferramenta eficaz, capaz de auxiliar na avaliação da eficiência de

tratamentos biológicos dos afluentes de esgotos industriais contaminados com anilina.

Os tratamentos anaeróbios usando nitrato como aceptor de elétrons ou microaerado com 30 e 15 parecem ser mais apropriados para a biodegradação da anilina. Ressalta-se que aparentemente tratamentos anaeróbios sem aceptor de elétrons ou com uso do sulfato como aceptor de elétrons gera subprodutos tóxicos após biodegradação da anilina. Além disso, na condição microaerada, ambos os tempos de pulso não apresentaram diferenças estatísticas entre eles, sendo recomendado desta forma o tempo de 15 min, por ser a condição de menor custo.

7. CONCLUSÕES

- 7.1 O sistema-teste *A. cepa* é um bom bioindicador ecotoxicológico para analisar os efeitos dos afluentes e efluentes contendo anilina.
- 7.2 A citometria de fluxo, ferramenta pouco utilizada para estudos de citotoxicidade, é uma técnica de grande valia para analisar o efeito citotóxico em células meristemáticas de *A. cepa*.
- 7.3 A biodegradação da anilina com tratamento anaeróbio com acceptor de elétrons sulfato ou microaerada por 10 min gera subproduto(s) que induz(em) efeitos toxicogénéticos em *A. cepa*.
- 7.4 O tratamento anaeróbio usando nitrato como acceptor de elétrons ou microaerado com pulsos de 30 ou 15 min parecem ser mais apropriados para a biodegradação da anilina.
- 7.5 Na condição microaerada, o tempo de pulso de 15 min é recomendado, por ser a condição de menor custo.

8. REFERÊNCIAS BIOGRÁFICAS

- ABE, T.; SAITO, H.; NIIKURA, Y.; SHIGEOKA, T.; NAKANO, Y. Embryonic development assay with *Daphnia magna*: application to toxicity of aniline derivatives. **Chemosphere**, v. 45, n. 4-5, p. 487-495, 2001.
- ALONSO, M. C.; TIRAPU, L. L.; GINEBRED, A.; BARCELÓ, D. Monitoring and toxicity of sulfonated derivatives of benzene and naphthalene in municipal sewage treatment plants. **Environmental Pollution**, v. 137, n. 2, p. 253-262, 2005.
- AMARAL, F. M.; KATO, M. T.; FLORÊNCIO, L.; GAVAZZA, S. Color, organic matter and sulfate removal from textile effluents by anaerobic and aerobic processes. **Bioresource Technology**, v. 163, p. 364-369, 2014.
- AMORIM, C. C.; LEÃO, M. M. D.; MOREIRA, R. F. P. M. Comparação entre diferentes processos oxidativos avançados para degradação de corante azo. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, n. 4, p. 543-550, 2009.
- APOSTOL, L. C.; PEREIRA, L.; PEREIRA, R.; GAVRILESCU, M.; ALVES, M. M. Biological decolorization of xanthene dyes by anaerobic granular biomass. **Biodegradation**, v. 23, n. 5, p. 725-737, 2012.
- ARORA, P. K. Bacterial degradation of monocyclic aromatic amines. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 820, 2015.
- BARSING, PRASHANT; TIWARI, A.; JOSHI, T.; GARG, S. Application of a novel bacterial consortium for mineralization of sulphonated aromatic amines. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 765-771, 2011.
- BATTERTON, J.; WINTERS, K.; VAN BAALEN, C. Anilines: selective toxicity to blue-green algae. **Science**, v. 199, n. 4333, p. 1068-1070, 1978.
- BHUNIA, F.; SAHA, N. C.; KAVIRAJ, A. Effects of Aniline-an aromatic amine to some freshwater organisms. **Ecotoxicology**, v. 12, n. 5, p. 397-404, 2003.
- BOMHARD, E. M. High-dose clastogenic activity of aniline in the rat bone marrow and its relationship to the carcinogenicity in the spleen of rats. **Archives of Toxicology**, v. 77, n. 5, p. 291-297, 2003.
- BOMHARD, E. M.; HERBOLD, B. A. Genotoxic activities of aniline and its metabolites and their relationship to the carcinogenicity of aniline in the spleen of rats. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 10, p. 783-835, 2005.
- BOUSTEAD, I. Polyurethane rigid foam. **Eco-Profiles of the European Plastics Industry**. Brussels: PlasticsEurope, 2005.
- BRENNAN, R. J.; SCHIESTL, R. H. Aniline and its metabolites generate free radicals in yeast. **Mutagenesis**, v. 12, n. 4, p. 215-220, 1997.
- BURD, G. I.; DIXON, D. G.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 237-245, 2000.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, 2000, vol. 3, núm. 1, p. 3-8, 2000.

CAMPOS, J. M. S.; CALDERANO, C. A.; PEREIRA, A. V.; DAVIDE, L. C.; VICCINI, L. F.; SANTOS, M. O. Somatic embryogenesis in hybrids of *Pennisetum sp.* and evaluation of genomic stability by cytometry. **Brazilian Agricultural Research**, v. 44, n. 1, p. 38-44, 2009.

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**, v. 72, n. 5, p. 722-725, 2008.

CARREÓN, T.; HEIN, M. J.; HANLEY, K. W.; VIET, S. M.; RUDER, A. M. Bladder cancer incidence among workers exposed to o-toluidine, aniline and nitrobenzene at a rubber chemical manufacturing plant. **Occupational and environmental medicine**, v. 71, n. 3, p. 175-182, 2014.

CASE, R. A.; HOSKER, M. E.; McDONALD, D. B.; PEARSON, J. T. Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. Part I. The role of aniline, benzidine, alpha-naphthylamine, and beta-naphthylamine. **British journal of industrial medicine**, v. 11, n. 2, p. 75, 1954.

CHAGAS, E. P.; DURRANT, L. R. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 8-9, p. 473-477, 2001.

CHANG, H. K.; MOHSENI, P.; ZYLSTRA, G. J. Characterization and regulation of the genes for a novel anthranilate 1, 2-dioxygenase from *Burkholderia cepacia* DBO1. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 19, p. 5871-5881, 2003.

CHEN, W. S.; HUANG, C. P. Mineralization of aniline in aqueous solution by electrochemical activation of persulfate. **Chemosphere**, v. 125, p. 175-181, 2013.

CHIAVEGATTO, R. B.; CHAVES, A. L. A.; SILVA, I. C. A.; LIMA, L. A. R. S.; TECHIO, V. H. Cytotoxic and genotoxic effects of *Solanum lycocarpum* St.-Hil (Solanaceae) on the cell cycle of *Lactuca sativa* and *Allium cepa*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 39, n. 2, p. 201-210, 2017.

CIAPPINA, A. L.; FERREIRA, A. F.; PEREIRA, I. R.; SOUSA, T. R.; MATOS, F. S.; REIS, P. R. M.; GONÇALVES, P. J.; BAILÃO, E. F. L. C.; ALMEIDA, L. M. Toxicity of *Jatropha curcas* L. latex in *Allium cepa* test. **Bioscience Journal**, Vol. 33, n. 5, 2017.

CITTERIO, S.; PIATTI, S.; ALBERTINI, E.; AINA, R.; VAROTTO, S., BARCACCIA, G. Alfalfa Mob1-like proteins are involved in cell proliferation and are localized in the cell division plane during cytokinesis. **Experimental Cell Research**, v. 312, n. 7, p. 1050-1064, 2006.

DE CARVALHO, Luciane Gomes et al. Cytological analysis of the insecticide Deltamethrin using the Micronucleus Test. **Journal of Biology**, vol. 17, n. 1, p. 1-5, 2017.

DECHUN, Zhao et al. Determination of aniline in water and seaweed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Chinese journal of chromatography**, v. 32, n. 9, p. 926-929, 2014.

DEL RIO, B.; REDRUELLO, B.; LADERO, V.; CAL, S.; OBAYA, A.J.; ALVAREZ, M. A. An altered gene expression profile in tyramine-exposed intestinal cell cultures supports the genotoxicity of this biogenic amine at dietary concentrations. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

DIDWANIA, N.; JAIN, S.; SADANA, D. In-vitro Phytotoxic Effects of Cadmium on Morphological Parameters of *Allium cepa*. **Biological**, v. 12, n. 1, p. 137, 2019.

DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, v. 3, n. 38, p. 285-302, 1997.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2233, 2007.

EL BOURAIE, M.; EL DIN, W. S. Biodegradation of Reactive Black 5 by *Aeromonas hydrophila* strain isolated from dye-contaminated textile wastewater. **Sustainable Environment Research**, v. 26, n. 5, p. 209-216, 2016.

FAISAL, M.; SAQUIB, Q.; ALATAR, A. A.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; HEGAZY, A. K. MUSARRAT, J. Phytotoxic hazards of NiO-nanoparticles in tomato: a study on mechanism of cell death. **Journal of Hazardous Materials**, v. 250, p. 318-332, 2013.

FAN, X.; WANG, J.; SOMAN, K. V.; ANSARI, G. A. S.; KHAN, M. F. Aniline-induced nitrosative stress in rat spleen: proteomic identification of nitrated proteins. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 255, n. 1, p. 103-112, 2011.

FATMA, F.; VERMA, S.; KAMAL, A.; SRIVASTAVA, A. Monitoring of morphotoxic, cytotoxic and genotoxic potential of mancozeb using *Allium* assay. **Chemosphere**, v. 195, p. 864-870, 2018.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLES, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FIORESI, V. S.; VIEIRA, B. C. R.; CAMPOS, J. M. S.; SOUZA, T. S. Cytogenotoxic activity of the pesticides imidacloprid and iprodione on *Allium cepa* root meristem. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-11, 2020.

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

GOMES, J. V.; TEIXEIRA, J. T. S.; LIMA, V. M.; BORBA, H. R. Induction of cytotoxic and genotoxic effects of Guandu River waters in the *Allium cepa* system. **Ambiente & Água magazine**, v. 10, n. 1, p. 48-58, 2015.

GOODMAN, D. G.; WARD, J. M.; REICHARDT, W. D. Splenic fibrosis and sarcomas in F344 rats fed diets containing aniline hydrochloride, p-chloroaniline, azobenzene, o-toluidine hydrochloride, 4, 4'-sulfonyldianiline, or D & C red No. 9. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 73, n. 1, p. 265-273, 1984.

GRAF, U.; FREI, H.; KÄGI, A.; KATZ, A. J.; WÜRGLER, F. E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 222, n. 4, p. 359-373, 1989.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the US Environmental Agency Gene - **Toxicology Program. Mutation Research**. Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 273- 291, 1982.

GRIFFITHS, J. The influence of intramolecular hydrogen bonding on the order parameter and photostability properties of dichroic azo dyes in a nematic liquid crystal host. **Journal of Materials Chemistry**, v. 9, n. 10, p. 2333-2338, 1999.

GSCHWEND, A. R.; WAI, C. M.; ZEE, F.; ARUMUGANATHAN, A. K.; MING, R. Genome size variation among sex types in dioecious and trioecious Caricaceae species. **Euphytica**, v. 189, n. 3, p. 461-469, 2013.

GUO, D.; MA, J.; LI, R.; GUO, C. Genotoxicity effect of nitrobenzene on soybean (*Glycine max*) root tip cells. **Journal of hazardous materials**, v. 178, n. 1-3, p. 1030-1034, 2010.

HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, A. Assessing toxicity of copper, cadmium and chromium levels relevant to discharge limits of industrial effluents into inland surface waters using common onion, *Allium cepa* bioassay. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 94, n. 2, p. 199-203, 2015.

HINTZSCHE, H.; HEMMANN, U.; POTH, A.; UTESCH, D.; LOTT, J.; STOPPER, H. Fate of micronuclei and micronucleated cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 771, p. 85-98, 2017.

HONGSAWAT, P.; VANGNAI, A. S. Biodegradation pathways of chloroanilines by *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 2-3, p. 1300-1307, 2011.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 8, p. 2090-2095, 2009.

HUANG, J.; LING, J.; KUANG, C.; CHEN, J.; XU, Y.; LI, Y. Microbial biodegradation of aniline at low concentrations by *Pigmentiphaga daeguensis* isolated from textile dyeing sludge. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 129, p. 117-122, 2018.

JADHAV, S. B.; PHUGARE, S. S.; PATIL, P. S.; JADHAV, J. P. Biochemical degradation pathway of textile dye Remazol red and subsequent toxicological evaluation by cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress studies. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 6, p. 733-743, 2011.

JIN, Q.; HU, Z.; JIN, Z.; QUI, L.; ZHONG, W.; PAN, Z. Biodegradation of aniline in an alkaline environment by a novel strain of the halophilic bacterium, *Dietzia natronolimnaea* JQ-AN. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 148-154, 2012.

JIN, R.; QIU, Z.; CHENG, W.; JIN, X. Photocatalytic degradation of aniline by magnetic nanomaterials $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2@ \text{BiO}_1.8 \cdot 0.04 \text{H}_2\text{O}/\text{Ag}_3\text{PO}_4$. **Chemical Physics Letters**, v. 755, p. 137747, 2020.

JONES, E.; FOX, V. Lack of clastogenic activity of aniline hydrochloride in the mouse bone marrow. **Mutagenesis**, v. 18, n. 3, p. 283-286, 2003.

KAHL, T.; SCHRÖDER, K. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, John Wiley & Sons: New York, 2007.

KAHL, Thomas et al. Aniline. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 2011.

KAHNG, H. Y.; KUKOR, J. J.; OH, K. H. Characterization of strain HY99, a novel microorganism capable of aerobic and anaerobic degradation of aniline. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, n. 2, p. 215-221, 2000.

KAMAYA, Y.; FUKAYA, Y.; SUZUKI, K. Acute toxicity of benzoic acids to the crustacean *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 59, n. 2, p. 255-261, 2005.

KASPER, N.; BARCELOS, R. P.; MATTOS, M.; BARONI, S. Impact of anthropic activities on eukaryotic cells in cytotoxic test. **Revista Ambiente & Água**, v. 13, n. 3, 2018.

KERMANI, M.; KAVANDI, B.; FARZADKIA, M.; ESRAFILI, A.; JOKANDAN, S. F.; SHAHSAVANI, A. Catalytic ozonation of high concentrations of catechol over $\text{TiO}_2@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ magnetic core-shell nanocatalyst: Optimization, toxicity and degradation pathway studies. **Journal of Cleaner Production**, v. 192, p. 597-607, 2018.

KHAN, R.; UPAGANLAWAR, A. B.; UPASANI, C. Protective effects of *Dioscorea alata* L. in aniline exposure-induced spleen toxicity in rats: a biochemical study. **Toxicology international**, v. 21, n. 3, p. 294, 2014.

KORINTH, G.; WEISS, T.; PENKERT, S.; SCHALLER, K. H.; ANGERER, J.; DREXLER, H. Percutaneous absorption of aromatic amines in rubber industry workers: impact of impaired skin and skin barrier creams. **Occupational and environmental medicine**, v. 64, n. 6, p. 366-372, 2007.

KURAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWIŃSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 211-221, 2006.

LANDVIK, N. E. GORRIA, M.; ARLT, V. M.; ASARE, N.; SOLHAUG, A.; LAGADIC-GOSSMANN, D.; HOLME, J. A. Effects of nitrated-polycyclic aromatic hydrocarbons and diesel exhaust particle extracts on cell signalling related to apoptosis: possible implications for their mutagenic and carcinogenic effects. **Toxicology**, v. 231, n. 2-3, p. 159-174, 2007.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 4, p. 214-219, 2008.

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.

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, n. 1, p. 80-86, 2008.

LI, J. J.; TAI, H. W.; YU, Y.; WEN, Y.; WANG, X. H.; ZHAO, Y. H. Comparison of toxicity of class-based organic chemicals to algae and fish based on discrimination of excess toxicity from baseline level. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 292-299, 2015.

LOPEZ, M. J.; GUISADO, G.; VARGAS-GARCÍA, M. C.; SUÁREZ-ESTRELLA, F.; MORENO, J. Decolorization of industrial dyes by ligninolytic microorganisms isolated from composting environment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 1, p. 42-45, 2006.

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/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.

MACDIARMID, A. G. Synthetic metals||: a novel role for organic polymers. **Current Applied Physics**, v. 1, n. 4-5, p. 269-279, 2001.

MAKHDOUMI, P.; HOSSINI, H.; ASHRAF, G. M.; LIMOEI, M. Molecular mechanism of aniline induced spleen toxicity and neuron toxicity in experimental rat exposure: a review. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 3, p. 201-213, 2019.

MALLÓN, R.; RODRÍGUEZ-OUBIÑA, J.; GONZÁLEZ, M. L. In vitro propagation of the endangered plant *Centaurea ultrae*: assessment of genetic stability by cytological studies, flow cytometry and RAPD analysis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 101, n. 1, p. 31-39, 2010.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella typhimurium* test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-221, 1983.

MARTINS, M. N. C.; SOUZA, V. V.; SILVA-SOUZA, T. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 148, p. 481-486, 2016.

MENCH, M.; SCHWITZGUÉBEL, J. P.; SCHROEDER P.; BERT, V.; GAWRONSKI, S.; GUPTA, S. Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n. 7, p. 876, 2009.

MOHANTA, V. L.; MISHRA, B. K. Integration of cancer and non-cancer human health risk assessment for Aniline enriched groundwater: a fuzzy inference system-based approach. **Environmental Geochemistry and Health**, p. 1-17, 2020.

MOLDAVAN, A. Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. **Science**, v. 80, n. 2069, p. 188-189, 1934.

MONTEIRO, M.; SANTOS, C.; MANN, R. M.; SOARES, A. M. V. M.; LOPES, T. Evaluation of cadmium genotoxicity in *Lactuca sativa* L. using nuclear microsatellites. **Environmental and experimental botany**, v. 60, n. 3, p. 421-427, 2007.

MORAES, M. M.; CAMARA, C. A. G.; SANTOS, M. L.; FAGG, C. W. Essential oil composition of *Eugenia langsdorffii* O. Berg.: relationships between some terpenoids and toxicity against *Tetranychus urticae*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 9, p. 1647-1656, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUHIRE, J.; LI, B. Q.; ZHAI, H. L.; LI, S. S.; MI, J. Y. A Simple Approach to the Toxicity Prediction of Anilines and Phenols Towards Aquatic Organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, p. 1-10, 2020.

NADLER, J. D.; POOLER, M.; OLSEN, R. T.; COLEMAN, G. D. In vitro induction of polyploidy in *Cercis glabra* Pamp. **Scientia Horticulturae**, v. 148, p. 126-130, 2012.

NIELSEN, M. H.; RANK, J. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the use of the *Allium* test. **Hereditas**, v. 121, n. 3, p. 249-254, 1994.

NILSSON, I.; MÖLLER, A.; MATTIASSON, B.; RUBINDAMAYUGI, M. S. T.; WELANDER, U. Decolorization of synthetic and real textile wastewater by the use of white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1-2, p. 94-100, 2006.

NORZAEI, S.; DJAHED, B.; KHAKSEFIDI, R.; MOSTAFAPOUR, F. K. Photocatalytic degradation of aniline in water using CuO nanoparticles. **Journal of Water Supply: Research and Technology—Aqua**, v. 66, n. 3, p. 178-185, 2017.

ORGE, C. A.; FARIA, J. L.; PEREIRA, M. F. R. Photocatalytic ozonation of aniline with TiO₂-carbon composite materials. **Journal of Environmental Management**, v. 195, p. 208-215, 2017.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, v. 52, n. 5, p. 683-691, 1987.

PERON, A. P.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Mutagenic potential of the waters of the Pirapó River (Apucarana, Paraná, Brazil) in meristematic root cells of *Allium cepa* L. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 7, n. 2, 2009.

PINHEIRO, H. M.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes and pigments*, v. 61, n. 2, p. 121-139, 2004.

PIRA, E.; PIOLATTO, G.; NEGRI, E.; ROMANO, C.; BOFFETTA, P.; LIPWORTH, L.; McLAUGHLIN, J. K.; VECCHIA, C. L. Bladder cancer mortality of workers exposed to aromatic amines: a 58-year follow-up. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, v. 102, n. 14, p. 1096-1099, 2010.

PIRSAHEB, M.; SHAHMORADI, B.; BEIKMOHAMMADI, M.; AZIZI, E.; HOSSINI, H.; ASHRAF, G. M. Photocatalytic degradation of Aniline from aqueous solutions under sunlight illumination using immobilized Cr: ZnO nanoparticles. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

PODGORNIK, H.; POLJANŠEK, I.; PERDIH, A. Transformation of Indigo carmine by *Phanerochaete chrysosporium* ligninolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, n. 2-3, p. 166-172, 2001.

QI, P.; CHEN, H.; LIU, Y. Treatment of aniline-contaminated wastewater by sequencing biofilm batch reactor system under Micro-Aerobic condition. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Science)*, v. 20, n. 5, p. 634-640, 2015.

QU, Y.; SPAIN, J. C. Molecular and biochemical characterization of the 5-nitroanthranilic acid degradation pathway in *Bradyrhizobium* sp. strain JS329. *Journal of Bacteriology*, v. 193, n. 12, p. 3057-3063, 2011.

RAMOS, Elaine da Silva. **O ensino da função orgânica amina por meio de um jogo didático em um enfoque CTS**. 2013. 152f. Dissertação (Mestrado em Ciência, Tecnologia e Ensino) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná.

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.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas*, v. 118, n. 1, p. 49-53, 1993.

REAPE, T. J.; MCCABE, P. F. Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis*, v. 15, n. 3, p. 249-256, 2010.

RESS, N. B.; WITT, K. L.; XU, J.; HASEMAN, J. K.; BUCHER, J. R. Micronucleus induction in mice exposed to diazoaminobenzene or its metabolites, benzene and

aniline: implications for diazoaminobenzene carcinogenicity. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 521, n. 1-2, p. 201-208, 2002.

ROUX, N.; TOLOZA, A.; RADECKI, Z.; ZAPATA-ARIAS, F. J.; DOLEZEL, J. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. **Plant Cell Reports**, v. 21, n. 5, p. 483-490, 2003.

SANDOVAL, A.; HOCHER, V.; VERDEIL, J. L. Flow cytometric analysis of the cell cycle in different coconut palm (*Cocos nucifera* L.) tissues cultured in vitro. **Plant Cell Reports**, v. 22, n. 1, p. 25-31, 2003.

SANTOS-FILHO, R.; VICARI, T.; SANTOS, S. A.; FELISBINO, K.; MATTOSO, N.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles and triggering of defense mechanisms in *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 42, n. 2, p. 425-435, 2019.

SCHNELL, S.; SCHINK, B. Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoyl-CoA in *Desulfobacterium anilini*. **Archives of Microbiology**, v. 155, n. 2, p. 183-190, 1991.

SCHÜHLE, K.; JAHN, M.; GHISLA, S.; FUCHS, G. Two Similar Gene Clusters Coding for Enzymes of a New Type of Aerobic 2-Aminobenzoate (Anthranilate) Metabolism in the *Bacterium Azoarcus evansii*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5268-5278, 2001.

SOUZA, T. S.; SOUZA, V. V.; LASCOLA, M. B. Assessment of surface water using *Allium cepa* test and histological analysis in Rhamdia quelen. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, n. 7, p. 420, 2018.

SOUZA, Vanessa Cristina. **Avaliação citogenotóxica de efluente têxtil tratado por processo biológico e físicoquímico**. 2017. 73f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

SUN, P.; GAO, S. M.; LIU, H.; CHEN, J. T. QSAR Analyzes for the Predictive Toxicity of Substituted Phenols and Anilines to Fish (carp). In: **Applied Mechanics and Materials**. Trans Tech Publications Ltd, 2013. p. 109-112.

SURESH, S.; SRIVASTAVA, V. C.; MISHRA, I. M. Adsorptive removal of phenol from binary aqueous solution with aniline and 4-nitrophenol by granular activated carbon. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, n. 3, p. 997-1003, 2011.

SZCZEPANIK, B.; SŁOMKIEWICZ, P. Photodegradation of aniline in water in the presence of chemically activated halloysite. **Applied Clay Science**, v. 124, p. 31-38, 2016.

TAKENAKA, S.; OKUGAWA, S.; KADOWAKI, M.; MURAKAMI, S.; AOKI, K. The metabolic pathway of 4-aminophenol in *Burkholderia* sp. strain AK-5 differs from that of aniline and aniline with C-4 substituents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5410-5413, 1997.

TAKEO, M.; OHARA, A.; SAKAE, S.; , OKAMOTO, Y.; KITAMURA, C.; KATO, DAI-ICHIRO; NEGORO, S. Function of a glutamine synthetase-like protein in bacterial aniline oxidation via γ -glutamylanilide. **Journal of bacteriology**, v. 195, n. 19, p. 4406-4414, 2013.

TAO, N.; LIU, G.; BAI, L.; TANG, L.; GUO, C. Genotoxicity and growth inhibition effects of aniline on wheat. **Chemosphere**, v. 169, p. 467-473, 2017.

TEDESCO, S. B.; LOUGHINGHOUSE, H. D. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. **Environmental contamination**, p. 137-156, 2012.

TRAVIS, A. S. Manufacture and uses of the anilines: a vast array of processes and products. **The chemistry of Anilines**, p. 715-782, 2007.

VAN DER ZEE, F. P.; VILLAVERDE, S. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes—a short review of bioreactor studies. **Water Research**, v. 39, n. 8, p. 1425-1440, 2005.

VÁZQUEZ-RODRÍGUEZ, G. A.; BELTRÁN-HERNÁNDEZ, R. I.; LUCHO-CONSTANTINO, C. A.; BLASCO, J. L. A method for measuring the anoxic biodegradability under denitrifying conditions. **Chemosphere**, v. 71, n. 7, p. 1363-1368, 2008.

VERMA, S.; SRIVASTAVA, A. Cytomorphologic parameters in monitoring cytogenotoxic effects of fertilizer in *Allium cepa* L. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 4, p. 159, 2017.

VIDAL, A. C. B.; JUNIOR, S. S. D. V.; OLIVEIRA, M. M.; CARVALHEIRA, G. M. G. Citogenética. da teoria cromossômica da hereditariedade à citogenética. **Embrapa**, v. 1, p. 52-52, 2017.

VISCARDI, M. H.; SILVEIRA, L. F.; VARGAS, L. K.; SILVA, F. R.; BENEDUZI, A. Environmental Quality and Cytogenotoxic Impact of the Waters of a Stream Receiving Effluents from Tannery Industry. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 6, p. 1-13, 2020.

WANG, J.; WANG, G.; ANSARI, G. A. S.; KHAN, M. F. Activation of oxidative stress-responsive signaling pathways in early splenotoxic response of aniline. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 230, n. 2, p. 227-234, 2014.

WANG, Y.; GAO, H.; NA, X. L.; DONG, SHU-YING; DONG, HONG-WEI; YU, J.; JIA, L.; WU, ANDYONG-HUI. Aniline induces oxidative stress and apoptosis of primary cultured hepatocytes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, vol. 13, n. 12, p. 1188, 2016.

WARD, E.; CARPENTER, A.; MARKOWITZ, S.; ROBERTS, D.; HALPERIN, W. Excess number of bladder cancers in workers exposed to ortho-toluidine and aniline. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 7, p. 501-506, 1991.

WIJEYARATNE, W. M.; WICKRAMASINGHE, P. G. Chromosomal Abnormalities in *Allium cepa* Induced by Treated Textile Effluents: Spatial and Temporal Variations. **Journal of Toxicology**, v. 2020, 2020.

XU, J. Determination of aniline potentially genotoxic impurity in rivaroxaban by HPLC*. **Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 37, n. 1, p. 105-110, 2017.

Xu, J.; Jia, H.; Ma, H.; Tian, C.; Zhu, C. Salinity relief aniline induced oxidative stress in *Suaeda salsa*: Activities of antioxidative enzyme and EPR measurements. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 205, p. 111293, 2020.

Xu, J.; Liu, Y.; Zhu, C.; Jia, H.; Tian, C.; Ma, H.; Lv, G. NaCl Improves *Suaeda salsa* Aniline Tolerance in Wastewater. **Sustainability**, 12(18), 7457, 2020.

XUE, G.; WANG, Q.; QIAN, Y.; GAO, P.; SU, Y.; LIU, Z.; CHEN, H.; LI, X.; CHEN, J. Simultaneous removal of aniline, antimony and chromium by ZVI coupled with H₂O₂: Implication for textile wastewater treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 368, p. 840-848, 2019.

YAN, H.; KAJITA, M.; TOSHIMA, N. Polymerization of aniline using iron (III) catalyst and ozone, and kinetics of oxidation reactions in the catalytic system. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 287, n. 8, p. 503-508, 2002.

YI, H.; LIU, J.; ZHENG, K. Effect of sulfur dioxide hydrates on cell cycle, sister chromatid exchange, and micronuclei in barley. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, n. 3, p. 421-426, 2005.

YUAN, B. Q.; LI, S.; XIONG, T. Cytogenetic and genotoxic effects of *Ipomoea cairica* (L.) Sweet leaf aqueous extract on root growth of *Allium cepa* var. *agrogarum* (L.). **Allelopathy Journal**, v. 46, n. 2, p. 205-214, 2019.

YUAN, J.; XIAO, J.; LI, F.; WANG, B.; YAO, Z.; YU, B.; ZHANG, L. Co-treatment of spent cathode carbon in caustic and acid leaching process under ultrasonic assisted for preparation of SiC. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 41, p. 608-618, 2018.

ŻABKA, A.; POLIT, J. T.; BERNASIŃSKA, J.; MASZEWSKI, J. DNA topoisomerase II-dependent control of the cell cycle progression in root meristems of *Allium cepa*. **Cell Biology International**, v. 38, n. 3, p. 355-367, 2014.

ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P. A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência Hoje**, v. 29, n. 174, p. 61-64, 2001.

ZHANG, X.; SONG, J.; JI, W.; XU, N.; GAO, N.; ZHANG, X.; YU, H Phase-selective gelators based on closed-chain glucose derivatives: their applications in the removal of dissolved aniline/nitrobenzene, and toxic dyes from contaminated water. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 3, n. 37, p. 18953-18962, 2015.

ZIDERMAN, I. I. Biblical dyes of animal origin. **Chemistry in Britain**, v. 22, n. 5, p. 419-421, 1986.

