



ARTIGO

Avaliação da toxicidade de drenagem ácida de mina de carvão, utilizando parâmetros físico-químicos e bioensaios

Juliane Menegon Macan¹, Geversson de Andrade Teixeira², Claus Tröger Pich³, Rozangela Curi Pedrosa⁴, Valfredo Tadeu de Fávère⁵ e Reginaldo Geremias^{6*}

Recebido: 11 de abril de 2012 Recebido após revisão: 29 de julho de 2012 Aceito: 31 de julho de 2012
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2200>

RESUMO: (Avaliação da toxicidade de drenagem ácida de mina de carvão, utilizando parâmetros físico-químicos e bioensaios). O presente trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade de drenagem ácida de mina de carvão, utilizando-se parâmetros físico-químicos e bioensaios. Os resultados permitem constatar que a drenagem apresentou baixo valor de pH e expressiva concentração dos metais alumínio, ferro, manganês e de sulfato. A drenagem provocou elevada toxicidade aguda em *Artemia* sp. bem como significativa fitotoxicidade e genotoxicidade em *Allium cepa* L. Conclui-se que a drenagem apresenta potencial tóxico, possivelmente em decorrência da presença dos contaminantes em solução.

Palavras chaves: mineração de carvão, efeito tóxico, *Artemia* sp., *Allium cepa* L.

ABSTRACT: (Evaluation of toxicity of acid coal mine drainage using physico-chemical parameters and bioassays). This study aimed to evaluate the toxicity of acid coal mine drainage by using physico-chemical parameters and bioassays. The results indicate that the drainage showed low pH and expressive concentrations of the metals aluminum, iron, manganese and sulfate. The drainage caused high acute toxicity in *Artemia* sp. as well as significant phytotoxicity and genotoxicity in *Allium cepa* L. In conclusion, the drainage has toxic potential, possibly due to the presence of contaminants in solution.

Key words: coal mining, toxic effect, *Artemia* sp., *Allium cepa* L.

INTRODUÇÃO

O processo de extração e beneficiamento de carvão mineral é uma das principais atividades econômicas do sul do Estado de Santa Catarina-Brasil. Entretanto, a mesma tem provocado sérios problemas ambientais, principalmente em decorrência da geração de contaminantes potencialmente tóxicos. Dentre os contaminantes se encontram as drenagens ácidas de mina de carvão, as quais se caracterizam pelos baixos valores de pH (<3,0) e expressiva concentração de metais como alumínio, ferro, manganês e de sulfatos (Geremias *et al.* 2003). Estes efluentes podem ser gerados pela mobilização de aquíferos presentes no subsolo em decorrência da abertura de poços de mina e de suas galerias, vindo a sofrer percolação e conseqüente deposição nas galerias, necessitando de sua drenagem até a superfície (Geremias 2008). O controle de formação e/ou minimização dos impactos das drenagens pode ser efetuado por vários processos, tais como inundações e vedação de minas subterrâneas, armazenamento subaquático de resíduos de mineração, misturas de resíduos minerais, controle migratório entre outros. Para o tratamento das drenagens, tem-se proposto estratégias que incluem a pré-correção de pH com agentes alcalinizantes e poste-

rior utilização de resinas iônicas, colunas de filtração, processos de adsorção, coagulação, floculação e flotação para remoção de metais (Johnson & Hallberg 2005).

Os contaminantes presentes na drenagem podem ser bioacumulados nos tecidos de vários organismos expostos, causando efeitos deletérios e até a morte (Souguir *et al.* 2001, Kakkar & Jaffery 2005). Portanto, é de grande relevância a realização de estudos de avaliação do potencial tóxico destas drenagens.

Para esta avaliação, pode-se utilizar parâmetros físico-químicos, tais como a determinação do pH e a concentração de metais e de sulfatos nas drenagens, uma vez que são os principais contaminantes presentes e que, potencialmente, podem promover impactos sobre o meio ambiente e à biota. Além disso, a utilização de valores de referência destes parâmetros preconizados por legislação de proteção ambiental também contribui para este processo. Neste contexto, pode-se propor os valores previstos pela Resolução nº357 de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), a qual dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes (CONAMA 2005).

1. Departamento de Farmácia, Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma, SC, Brasil.

2. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma, SC, Brasil.

3. Campus Araranguá, Universidade Federal de Santa Catarina. Araranguá, SC, Brasil.

4. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, Brasil.

5. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, Brasil.

6. Campus Curitiba, Universidade Federal de Santa Catarina. Curitiba, SC, Brasil.

*Autor para contato. E-mail: reginaldogeremias@gmail.com

A mesma preconiza os valores de referência de diversos parâmetros físico-químicos e, dentre os mesmos, encontram-se o intervalo de pH e as concentrações de metais em efluentes de qualquer fonte poluidora.

Além de parâmetros físico-químicos, é também relevante a utilização de bioensaios, como forma de se obter melhor avaliação da toxicidade da drenagem. Para este propósito, pode ser indicado testes de toxicidade aguda em microcrustáceos *Artemia* sp., os quais são amplamente empregados por apresentarem características importantes, tais como grande potencial reprodutivo, fácil aquisição no mercado e manutenção em laboratório, boa reprodutividade e confiabilidade dos resultados (Arambašić *et al.* 1995, Silva 2002, Pellegrini *et al.* 2007). A utilização de plantas superiores também tem sido indicada para a avaliação ecotoxicológica de ambientes contaminados por várias classes de poluentes (Calzoni *et al.* 2007). Em particular, se tem sugerido o uso de *Allium cepa* L. (cebola) como organismo bioindicador. Para este propósito, são avaliados diversos parâmetros fitotóxicos, tais como efeitos citogenéticos e mutagênicos, estresse oxidativo, bioacúmulo de contaminantes em diferentes tecidos e inibição de crescimento tecidual, podendo-se destacar a inibição de crescimento de raízes quando expostas à amostra teste (Fiskesjö 2006, Müller *et al.* 2007, Leme & Marin-Morales 2009, Alvim *et al.* 2011). Este bioensaio tem sido utilizado por oferecer benefícios como sensibilidade, reprodutibilidade, resposta em breve período de tempo, necessidade de pouco volume de amostra de contaminante, bem como baixo custo (Richa *et al.* 2005, Fatima & Ahmad 2005, Fatima & Ahmad 2006).

A mortalidade, enquanto parâmetro utilizado em ensaios de toxicidade aguda e crônica, pode ser considerada como um efeito drástico de avaliação. Neste contexto, o uso de biomarcadores de alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas em organismos-teste vem ganhando espaço como mecanismo de avaliação de impacto ambiental, uma vez que são capazes de detectar, precocemente, alterações biológicas antes da manifestação de efeitos de maior relevância (Streb *et al.* 2002). Dentre os biomarcadores, encontram os que indicam efeitos genotóxicos e para este propósito pode ser empregado teste de avaliação de dano ao DNA (ex: teste do Cometa) em células meristemáticas de *A. cepa* (Bortolotto *et al.* 2009). Salienta-se que existem poucos estudos que utilizam esta planta como organismo bioindicador de toxicidade de drenagem ácida de mina de carvão.

Partindo destes pressupostos é que o presente trabalho propôs avaliar o efeito tóxico e genotóxico de drenagem ácida de mina, utilizando parâmetros físico-químicos e bioensaios em *Artemia* sp. e *Allium cepa* L.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta da drenagem e determinação dos parâmetros físico-químicos

Amostras de drenagem ácida de mina (5 L) foram coletadas em uma empresa de mineração de carvão de subsolo situada na região sul do Estado de Santa Catarina/Brasil, sendo resguardada em sigilo a razão social da empresa. A coleta foi efetuada em frasco de polietileno e as amostras foram armazenadas sob refrigeração (4 °C) até os ensaios. O pH das amostras foi determinado por potenciometria (pHmetro CORNING - pH/ION ANALYZER 350), a concentração dos metais alumínio, ferro e manganês por Espectrofotometria de Absorção Atômica em Chama (espectrômetro VARIAN SPECTRA AA50) e a concentração de SO_4^{2-} por colorimetria (colorímetro HACH DR 2010). Todos os parâmetros físico-químicos foram feitos em duplicatas.

Toxicidade aguda em Artemia sp.

O ensaio de toxicidade aguda em *Artemia* sp. foi executado de acordo com Meyer *et al.* (1982), com algumas modificações. Para tanto, cistos de microcrustáceos de *Artemia* sp. (50mg) foram colocados em 100mL de solução salina a 2%, durante 24 horas, a 37 ± 2 °C, sob aeração e ao abrigo da luz para a eclosão em náupilos. Os náupilos recém eclodidos (n=10) foram expostos a 2 mL de diluições seriadas da drenagem, em placas multi-poços, por 24 horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Foi utilizada solução salina a 2% como controle negativo e para a preparação das diluições das amostras. Ao final da exposição, foi determinada a concentração letal média (CL_{50}) (Svensson *et al.* 2005) e, para tanto, foi empregado o método matemático *Trimmed Spearman-Kärber*, utilizando-se programa Probitos®.

Teste de fitotoxicidade em Allium cepa L.

Para avaliar o efeito fitotóxico foi realizado o teste de inibição do crescimento de raízes em *A. cepa* de acordo com Bortolotto *et al.* (2009), com adaptações. Para este teste, indivíduos de *A. cepa*, obtidos a partir de fontes comerciais, tiveram suas raízes retiradas e os bulbos (n=6) colocados na parte superior de tubos de polietileno de fundo cônico, contendo 50 mL das amostras de drenagem, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Para o controle negativo foi utilizada água mineral obtida comercialmente. As amostras foram reabastecidas diariamente de forma a manter os bulbos sempre em contato com as mesmas. Após 7 dias de exposição, o comprimento da maior raiz de cada bulbo foi medido e a inibição do crescimento das raízes foi calculada e expressa em percentagem.

Teste de genotoxicidade em *Allium cepa* L.

O potencial genotóxico foi avaliado pelo teste do Cometa proposto por Singh *et al.* (1988), com modificações. Para este propósito, *A. cepa* (n=6) foram expostos às mesmas condições do ensaio de fitotoxicidade. Ao final da exposição, células meristemáticas foram retiradas da região apical das raízes e transferidas para uma placa de petri contendo 95 µL de solução de extração de núcleo (PBS 1%, DMSO 1%, EDTA 5mM). Procedeu-se a maceração deste material até a sua homogeneização. O homogenato foi misturado em agarose de baixo ponto de fusão (0,75%) e espalhado sobre lâminas de microscópio (em duplicata) pré-cobertas com agarose (1,5%). As lâminas foram mergulhadas por 2 horas a 4 °C em solução de lise (NaCl 2,5 M; EDTA 100mM; TRIS 10mM; Triton X-100 1%; Lauril sarcosinato de sódio 1%; pH 10) e submetidas à eletroforese alcalina (NaOH 10 N; EDTA 200 mM; pH 13) por 30 minutos a 300 mA e 25 V (fonte para eletroforese CONSORT – modelo E8 44). Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas com tampão de neutralização (TRIS 0,4 M; pH 7,4), submetidas à coloração (Na₂CO₃ 0,5%, NH₄NO₃ 0,1%, AgNO₃ 0,1%, H₄[Si(W₃O₁₀)₄] 0,25%, formaldeído 0,15%), sendo a reação interrompida com ácido acético (1%). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 100X (microscópio óptico LEICA – DMIL). Os resultados foram expressos em Índice de Dano ao DNA (ID), com escore de 0 a 400, empregando-se unidade arbitrária.

Análise Estatística

Os resultados do teste de fitotoxicidade e genotoxicidade em *A. cepa* foram submetidos à análise de variância (ANOVA), complementada pelo Student-Newman Keuls (SNK) e Bonferroni post-hoc testes. As análises foram conduzidas usando software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc. San Diego, California, U.S.A.), assumindo um nível de significância de $p < 0,05$. Todos os resultados de fitotoxicidade e genotoxicidade foram expressos em média ± Desvio Padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parâmetros físico-químicos da drenagem

Os resultados dos parâmetros físico-químicos da drenagem ácida de mina de carvão e os valores previstos pela Resolução nº 357 do CONAMA estão apresentados

na Tabela 1. Pode-se constatar que a drenagem apresenta baixo valor de pH e expressiva concentração de ferro e manganês, quando comparados aos valores preconizados Resolução, além da presença de alumínio e de sulfatos. Semelhante perfil tem sido descrito na literatura, onde foi observada baixos valores de pH ($2,6 \pm 0,10$), a presença majoritária de metais como alumínio ($28,99 \pm 2,02$ mg.L⁻¹), ferro ($13,23 \pm 3,21$ mg.L⁻¹) e manganês ($13,03 \pm 2,28$ mg.L⁻¹), além de sulfatos (217 g.L⁻¹) em drenagem ácida de mina coletadas na região carbonífera do sul de Santa Catarina (Geremias *et al.* 2008). Menezes *et al.* (2011) também constaram valores baixo de pH (3,0) e presença dos metais como ferro (61,98 mg.L⁻¹) e manganês (4,0 mg.L⁻¹) em drenagem ácida coletadas em empresa carbonífera situada na mesma região catarinense.

Tem-se proposto que este perfil estaria relacionado ao processo de formação da drenagem, a qual pode ocorrer quando minerais sulfetados são expostos ao oxigênio e água, vindo a sofrer processos de oxidação e liberação de íons de ferro, H₃O⁺ e SO₄²⁻ (Younger 2002, Strosnider *et al.* 2011). Além disso, metais como alumínio, manganês, cobre, zinco, chumbo, mercúrio e cádmio presentes em minerais associados ao carvão mineral são capazes de serem solubilizados e mobilizados nas drenagens em função do baixo valor de pH das mesmas, o que justificaria a elevada concentração de metais observados em nossos estudos (Dias 1998).

De acordo com a Resolução, os efluentes de qualquer fonte poluidora poderão ser lançados de forma direta ou indireta na rede hidrográfica somente após a sua remediação e desde que apresentem parâmetros físico-químicos compatíveis com os valores de referência preconizados pela sua normativa e de outros dispositivos legais aplicáveis (CONAMA 2005). Neste sentido, observa-se que as drenagens avaliadas não estão em condições de serem lançadas no meio ambiente, uma vez que se apresentam potencialmente tóxicas, sendo capazes de comprometer o ecossistema, evidenciando-se a necessidade de seu tratamento.

Toxicidade aguda em microcrustáceos *Artemia* sp.

Na Figura 1 são mostrados os resultados obtidos da percentagem de mortalidade em *Artemia* sp. expostos a diferentes concentrações da drenagem. A partir destes resultados, pode-se determinar a concentração letal média, obtendo-se um valor de CL₅₀ = 7,56%, o que sugere relevante toxicidade. Geremias *et al.* (2008) também

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da drenagem ácida de mina de carvão e respectivos valores de referência previstos pela Resolução nº 357 do CONAMA

Parâmetros físico-químicos	Drenagem	Resolução nº 357/CONAMA
pH	2,89 ± 0,02	5,0 a 9,0
Alumínio (mg.L ⁻¹)	29,7 ± 1,0	NP
Ferro (mg.L ⁻¹)	22,7 ± 3,0	15,0
Manganês (mg.L ⁻¹)	15,7 ± 4,0	1,0
SO ₄ ²⁻ (mg.L ⁻¹)	2175 ± 35	NP

NP = Não Previsto

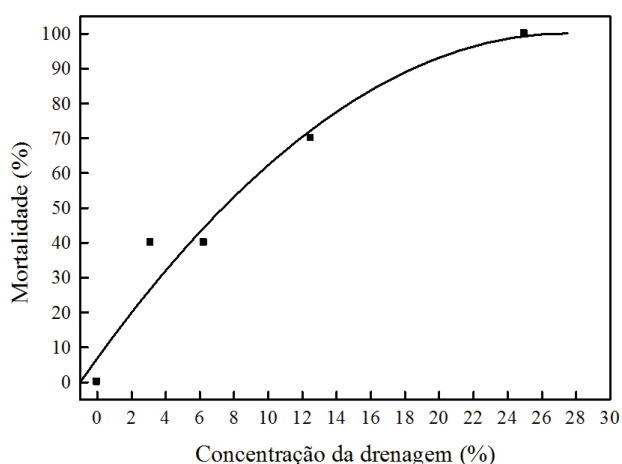


Figura 1. Toxicidade aguda em *Artemia* sp. expostas a diferentes concentrações de drenagem ácida de mina de carvão

constataram elevada toxicidade aguda em *Artemia* sp. ($CL_{50} = 4,97\%$) expostas à drenagem ácida de mina de carvão coletada em empresa mineradora situada na região carbonífera de Criciúma (SC), sendo também observado baixos valores de pH e expressiva concentração de metais em solução. Em trabalho efetuado na região carbonífera do sul de Santa Catarina, foi constatada expressiva toxicidade aguda em *Artemia* sp. expostas às águas de drenagem de mina de subsolo ($CL_{50} = 3,1\%$), a efluente de infiltração de bacias de decantação ($CL_{50} = 6,7\%$), bem como, às águas de rio atingidas pelos efluentes de mineração de carvão ($CL_{50} = 2,3\%$), sendo todas as amostras coletadas na região. Foi sugerido que a toxicidade seria decorrente dos baixos valores de pH (2,35 a 3,50) e das concentrações elevadas de metais, principalmente de ferro (78,20 a 415,62 $mg.L^{-1}$), manganês (13,35 a 16,50 $mg.L^{-1}$) e zinco (0,07 a 11,80 $mg.L^{-1}$) presentes nas amostras (Geremias *et al.* 2003)

Estudos têm evidenciado que ambientes aquáticos com baixo valor de pH e elevada concentração de metais e sulfatos podem provocar distúrbio respiratório, osmorregulatório, processos mutagênicos e cancerígenos e até a morte da biota exposta (Ridge & Seif 1998). Desta forma, pode-se sugerir que a toxicidade da drenagem observada em nossos estudos estaria associada à presença de contaminantes químicos em solução.

Fitotoxicidade em *Allium cepa* L.

Os resultados obtidos em relação à inibição do crescimento de raízes em *A. cepa* estão mostrados na Figura 2. É possível constatar que a drenagem promoveu fitotoxicidade na planta, uma vez que foi capaz de provocar expressiva inibição do crescimento das raízes (94%), quando comparada ao controle negativo. Semelhante perfil também tem sido encontrado na literatura, podendo-se citar o descrito por Geremias *et al.* (2009), os quais constataram que efluentes da mineração de carvão a uma baixa concentração (9,21%) foram capazes de inibir em 50% o crescimento de raízes de *A. cepa* exposta aos mesmos, sendo sugerido que o efeito fitotóxico estaria associado aos baixos valores de pH ($pH = 2,72$) e expressiva concentração de metais como ferro (35 $mg.L^{-1}$), alumínio (31,9 $mg.L^{-1}$), manganês (11,80 $mg.L^{-1}$), zinco (2,26 $mg.L^{-1}$) e chumbo (0,05 $mg.L^{-1}$) presentes no efluente.

Os mecanismos envolvidos na inibição de crescimento de raízes ainda não estão bem estabelecidos. Sugere-se que este efeito fitotóxico estaria relacionado à capacidade destes compostos serem acumulados pela planta e interagirem com sítios específicos localizados na parede celular (ex: interação com pectinas e hemiceluloses), na membrana plasmática (ex: interação com lipídeos ou proteínas) e no núcleo celular. Como consequência, poderiam ser desencadeadas diversas alterações fisioló-

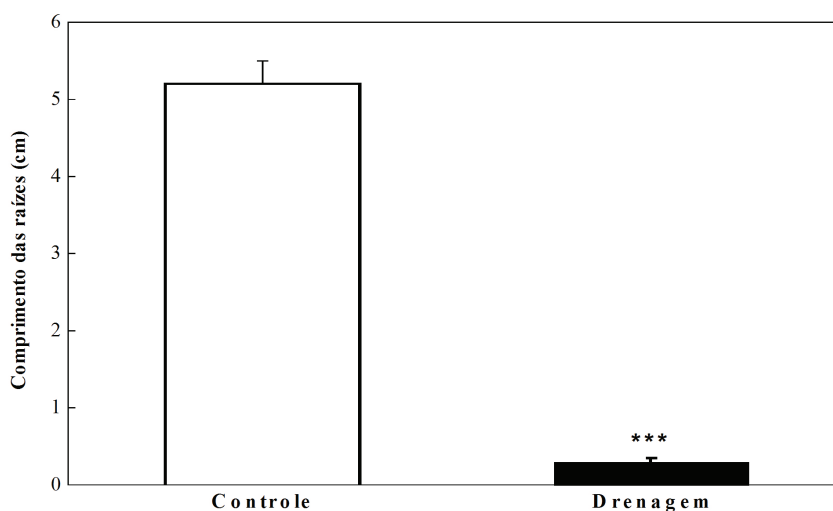


Figura 2. Comprimento das raízes de *Allium cepa* L. expostas à drenagem ácida de mina de carvão e à água mineral (controle negativo). ***Diferença significativa em relação ao controle negativo ($P < 0,001$).

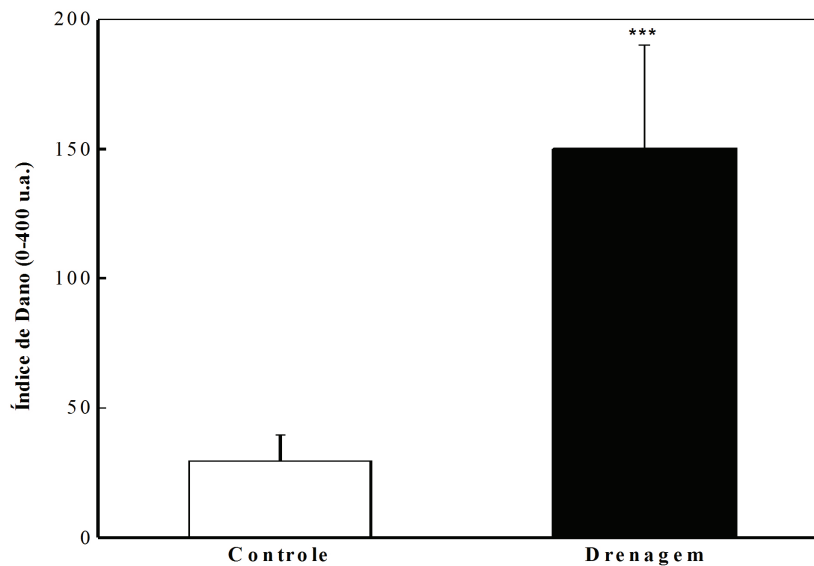


Figura 3. Índice de dano ao DNA em células do meristema de *Allium cepa* L. expostas à drenagem ácida de mina de carvão e à água mineral

gicas, bioquímicas e moleculares na célula, tais como alteração do fluxo de água e nutrientes, alteração da homeostase do fluxo de cálcio e comprometimento de eventos de sinalização celular, distúrbios do ciclo celular e da atividade mitótica de células meristemáticas. Estes efeitos poderiam trazer como resultados a inibição do crescimento de tecidos da planta, incluindo os das raízes, o que poderia justificar os resultados obtidos em nossos estudos (Dovgaliuk *et al.* 2001, Patrícia *et al.* 2003, Ezaki *et al.* 2008, Ledislav *et al.* 2006, Glińska *et al.* 2007).

Teste de genotoxicidade em *Allium cepa* L.

Os resultados do teste de avaliação de dano ao DNA (teste do Cometa) em *A. cepa* estão apresentados na Figura 3. Pode-se observar que a drenagem provocou danos sobre as células meristemáticas, uma vez que promoveu um aumento significativo do índice de dano ao DNA, quando comparado ao controle negativo. Resultados semelhantes têm sido apresentados na literatura, onde foi observada significativa elevação do índice de dano ao DNA (ID=122 ± 25) em células meristemáticas de *A. cepa* exposta à drenagem ácida de mina de carvão coletadas na região sul catarinense, quando comparado ao grupo controle negativo (ID = 9,5 ± 2,3) (Geremias *et al.* 2012). Em trabalho descrito por Geremias *et al.* (2009), também foi constatado significativo dano ao DNA (ID= 254,5 ± 15,1) em células meristemáticas de *A. cepa* exposta a efluentes de mineração de carvão em comparação com o grupo controle negativo (ID = 53,1 ± 5,9), sendo sugerido que o efeito genotóxico estaria associado à elevada acidez e expressiva concentração de metais presentes no efluente.

Estudos têm proposto que o efeito genotóxico frente à exposição à drenagem estaria associado à presença de metais em solução, os quais seriam bioacumulados pela planta e promoveriam o aumento da geração de espé-

cies reativas de oxigênio, com conseqüente dano oxidativo ao DNA nas células meristemáticas (Geremias *et al.* 2012).

CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que a drenagem ácida de mina de carvão apresentou baixo valor de pH e elevada concentração de ferro e manganês, quando comparados aos valores previstos pela Resolução nº357 do CONAMA, além da presença de alumínio e de sulfatos. Foi constatada expressiva toxicidade aguda em *Artemia* sp., além de efeito fitotóxico e genotóxico em *A. cepa* exposta à drenagem, o que poderiam estar associados aos contaminantes em solução. Portanto, a partir de todos os resultados obtidos em nossos estudos, pode-se sugerir que as drenagens ácidas de mina de carvão são potencialmente tóxicas para a biota exposta, havendo a necessidade de implantação de processo de tratamento das mesmas antes de serem lançadas ao meio ambiente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UNESCO, ao Laboratório de Bioquímica Experimental (Depto. de Bioquímica-UFSC), ao grupo QUITTECH (Depto. de Química-UFSC) e à UFSC-Campus Curitibanos e Campus Araranguá.

REFERÊNCIAS

- ALVIM, L. B., KUMMROW, F., BEIJO, L. A., LIMA, C. A. & BARBOSA, S. 2011. Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. *Ambi-Agua*, 6: 255-265.
- ARAMBAŠIĆ, M.B., BJELIĆ, S. & SUBAKOV, G. 1995. Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* St.: Comparative investigations and the practical applications. *Water Research*, 29: 497-503.

- BORTOLOTTI, T., BERTOLDO, J.B., SILVEIRA, F.Z., DEFAVERI, T.M., SILVANO, J. & PICH, C. T. 2009. Evaluation of the toxic and genotoxic potential of landfill leachates using bioassays. *Environ Toxicol Pharmacol*, 28: 288-293.
- CALZONI, G.L., ANTOGNONI, F., PARI, E., FONTI, P., GNES, A. & SPERANZA, A. 2007. Active biomonitoring of heavy metal pollution using *Rosa rugosa* plants. *Environ Pollut*, 149: 239-245.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 23 p. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> >
- DIAS, L. E. & MELLO, J. W. V. 1998. *Recuperação de áreas degradadas*. Viçosa: Folha de Viçosa Ltda. 251 p.
- DOVGALIUK, A. L., KALINIAK, T. B. & BLIUM, I. A. B. 2001. Cytogenetic effects of toxic metal salts on apical meristem cells of *Allium cepa* L. seed roots. *Tsitol Genet*, 35: 3-10.
- EZAKI, B., NAGAO, E., YAMAMOTO, Y., NAKASHIMAS S. & ENOMOTO, T. 2008. Wild plants, *Andropogon virginicus* L. and *Miscanthus sinensis* Anders, are tolerant to multiple stresses including aluminum, heavy metals and oxidative stresses. *Plant Cell Rep*, 27: 951-961.
- FATIMA, R. A. & AHMAD, M. 2005. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Sci Total Environ*, 346: 256-273.
- FATIMA, R. A. & AHMAD, M. 2006. *Allium cepa* EROD as a potential biomarker for the presence of certain pesticides in water. *Chemosphere*, 62: 527-537.
- FISKESJÖ, G. 2006. The *Allium* test in wastewater monitoring. *Environ Toxicol Water Qual*, 8: 291-298.
- GEREMIAS, R. 2008. *Utilização de rejeito de mineração de carvão como adsorvente para redução da acidez e remoção de íons de metais em drenagem ácida de mina de carvão*. 121f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.
- GEREMIAS, R., LAUS, R., MACAN, J. M., PEDROSA, R. C., LARANJEIRA, M. C. M., SILVANO, J. & FAVERE, V. T. 2008. Use of coal mining waste for the removal of acidity and metal ions Al (III), Fe (III) and Mn (II) in acid mine drainage. *Environ Technol*, 29: 863-886.
- GEREMIAS, R., PEDROSA, R. C., BENASSI, J. C., FAVERE, V. T., STOLBERG, J., MENEZES, C. T. B. & LARANJEIRA, M. C. M. 2003. Remediation of coal mining wastewaters using chitosan microspheres. *Environ Technol*, 24: 1509-1515.
- GEREMIAS, R., MACAN, J. M., TEIXEIRA, G. A., PICH, C. T., ÁVILA-JUNIOR, S., SCHOENFELDER, T., MENEZES, C. T.B., GRINEVIVIUS, V. M. A. S., LARANJEIRAS, M. C. M., FAVERE, V. T. & PEDROSA, R. C. 2009. Utilização de *Allium cepa* L. para o monitoramento da remediação de efluente de mineração de carvão. In: HERKOVITS, J. (Ed). *Química y Toxicología Ambiental en América Latina*. Buenos Aires: Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 200 p.
- GEREMIAS, R., BORTOLOTTI, T., WILHELM-FILHO, D., PEDROSA, R.C. & FÁVERE, V.T. 2012. Efficacy assessment of acid mine drainage treatment with coal mining waste using *Allium cepa* L. as a bioindicator. *Ecotoxicol Environ Saf*, 79: 116-121.
- GLIŃSKA, S., BARTCZAK, M., OLEKSIK, S., WOLSKA, A., GABARA, B., POSMYK, M. & JANAS, K. 2007. Effects of anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on meristematic cells of *Allium cepa* L. roots treated with heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf*, 68: 343-50.
- JOHNSON, D.B. & HALLBERG, K.B. 2005. Acid mine drainage remediation options: a review. *Science of the Total Environment*, 338: 3-14.
- KAKKAR, P. & JAFFERY, F. N. 2005. Biological markers for metal toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol*, 19: 335-349.
- LEDISLAV, T., JANA, H., IGOR, M., MARTA, S., BEATA, S. 2006. Aluminum-induced drought and oxidative stress in barley roots. *J Plant Physiol*, 163: 781-784.
- LEME, D. M. & MARIN-MORALES, M. A. 2008. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water-A case study. *Mutat Res*, 650: 80-86.
- MENEZES, C.T. B., BARROS, E.C., RUFINO, R.D., LUNA, J.M. & SARUBBO, L.A. 2011. Replacing synthetic with microbial surfactants as collectors in the treatment of aqueous effluent produced by acid mine drainage, using the dissolved air flotation technique. *Appl Biochem Biotechnol*, 163: 540-546.
- MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAM, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E. & MCLAUGHLIN, J. L. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*, 45: 31-34.
- MÜLLER, C., CHAGAS, F. F., PERES, M. T. L. P., HESS, S. C., FACENDA, O. & DALOSO, D. M. 2007. Potencial fitotóxico de algumas espécies Gleicheniaceae sobre *Allium cepa* L. *R Bras Bioc*, 5: 45-47.
- PATRICIA, R. S. B., MARCELO, M. & RENATO, A. J. 2003. Aluminum induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*, 62: 181-189.
- PELEGRINI, N. N. B. P., PELEGRINI, R. T. & PATERNIANI, J. E. S. 2007. Ecotoxicological evaluation of leachate from the Limeira sanitary landfill with a view to identifying acute toxicity. *Ambi-Agua*, 2: 34-43.
- RICHA, S., DINESH, K. & GUPTA, S. K. 2005. Bioremediation of municipal sludge by vermitechnology and toxicity assessment by *Allium cepa*. *Bioresour Technol*, 96: 1867-1871.
- RIDGE, T. & SEIF, J. M. 1998. *Coal Mine Drainage Prediction and Pollution Prevention in Pennsylvania*. Pennsylvania: The Pennsylvania Department of Environmental Protection. 400 p.
- SILVA, A. C. 2002. *Tratamento do percolato de aterro sanitário e avaliação da toxicidade*. 126f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.
- SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R. & SCHNEIDER, E. L. 1988. A simple technique for quantitation of levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175: 184-191.
- SOUGUIR, D., FERJANI, E., LEDOIGT, G. & GOUPIL, P. 2011. Sequential effects of cadmium on genotoxicity and lipoperoxidation in *Vicia faba* roots. *Ecotoxicology*, 20: 329-336.
- STREB, C., RICHTER, P., NTEFIDOU, M., LEBERT, M. & HADER, D. P. 2002. ECOTOX – Biomonitoring based on real time movement analysis of unicellular organisms. *J Gravit Physiol*, 9: 345-346.
- STROSNIDER, W. H. J., LLANOS LÓPEZ, F. S. & NAIRN, R. W. 2011. Acid mine drainage at Cerro Rico de Potosi I: unabated high-strength discharges reflect a five century legacy of mining. *Environ Earth Sci*, 64: 899-910.
- SVENSSON, B. M., MATHIASSEN, L., MÅRTENSSON, L. & BERGSTRÖM, S. 2005. *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from landfills. *Environ Monit Assess*, 102: 309-321.
- YOUNGER, P. L., BANWART, S. A., HEDIN, R. S. 2002. *Mine Water: Hydrology, Pollution, Remediation*. Dordrech: Kluwer Academic Publishers. 442 p.