
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DE AMOSTRAS AMBIENTAIS DE UMA
ÁREA DE MINERAÇÃO DE OURO (PARACATU-MG) CONTAMINADA COM
ARSÊNIO E OUTROS METAIS**

NÁDIA ALINE CORROQUÉ

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DE AMOSTRAS AMBIENTAIS DE UMA ÁREA
DE MINERAÇÃO DE OURO (PARACATU-MG) CONTAMINADA COM ARSÊNIO
E OUTROS METAIS**

NÁDIA ALINE CORROQUÉ

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutora em Ciências
Biológicas (Biologia Celular e
Molecular).

Rio Claro/SP

2019

C825a

Corroqué, Nádia Aline

Avaliação toxicogenética de amostras ambientais de uma área de mineração de ouro (Paracatu-MG) contaminada com arsênio e outros metais / Nádia Aline Corroqué. -- Rio Claro, 2019

154 f. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Maria Aparecida Marin-Morales

1. Biologia. 2. Toxicologia. 3. Biomonitoramento. 4. Água. 5.
Sedimento. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DE AMOSTRAS AMBIENTAIS DE UMA ÁREA DE MINERAÇÃO DE OURO (PARACATU-MG) CONTAMINADA COM ARSÊNIO E OUTROS METAIS

AUTORA: NADIA ALINE CORROQUÉ

ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES

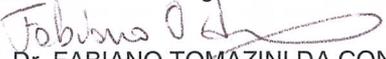
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. PAULA SUARES ROCHA
Faculdade de Tecnologia / UNICAMP



Prof. Dr. FABIANO TOMAZINI DA CONCEIÇÃO
Departamento de Planejamento Territorial e Geoprocessamento / IGCE Rio Claro



Prof. Dr. PAULO RENATO MATOS LOPES
x / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena



Prof. Dr. MATHEUS MANTUANELLI ROBERTO
x / Fundação Hermínio Ometto, UNIARARAS

Rio Claro, 27 de setembro de 2019

*Dedico este trabalho aos meus pais, Daniel e Angela,
ao meu irmão Marcelo e ao meu namorado Ricardo,
por todo o amor e apoio nas minhas decisões*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, Daniel e Angela, por todo o amor e compreensão em toda essa jornada acadêmica da minha vida. Vocês foram muito importantes para construção de tudo isso e para minha construção como ser humano, pois sem vocês ao meu lado não teria conseguido vencer tantos obstáculos.

Ao meu irmão, Marcelo por sempre estar ao meu lado, acreditando em mim, me incentivando e dando apoio, sendo além de irmão, um grande amigo. Aos meus queridos sobrinhos, que eu amo tanto, Léo e Bia, por tornarem meus dias melhores e mais felizes. À minha prima Bia, que entende os perrengues dessa vida acadêmica e está sempre por perto para ajudar a dar a volta por cima, obrigada pelas conversas e desabafos.

Ao meu namorado Ricardo, por todo o amor, companheirismo e compreensão. Com você descobri que as coisas ficam muito mais fáceis quando se tem ao lado alguém especial, tornando a vida muito mais leve. Obrigada por toda a força e incentivo e também por tornar meus dias mais felizes. Agradeço também à minha sogra, Suzy, a quem tenho muito carinho, sou muito agradecida pela torcida, por todo o apoio e todos os almoços e conversas de domingo.

À minha orientadora, Marin, muito obrigada pela conclusão de mais esse trabalho, depois de tantos anos de orientação. Foram anos de muito trabalho, mas muita aprendizagem também. Agradeço pela confiança, pela oportunidade, por todos os conhecimentos compartilhados (e que foram muitos mesmo) e por toda a sua amizade, pois além de ser uma excelente profissional, é uma excelente “mãerin” também!!

Ao Professor Dr. Amauri Antonio Menegário, por toda a atenção, ensinamentos e também colaboração na realização das análises químicas das amostras, cedendo reagentes e equipamentos essenciais para essas análises de grande valia para este trabalho. Agradeço também ao CEA, pelo acesso e uso de sua infra-estrutura.

À Lauren (CEA), que me auxiliou durante todo o processo de análise química, desde os procedimentos que antecedem a coleta das amostras até os resultados obtidos da análise.

Ao Professor Dr. Fabiano Tomazini da Conceição, por toda a disponibilidade e paciência para auxiliar no desenvolvimento e interpretação das análises geológicas que complementaram e enriqueceram muito este trabalho. Também agradeço por ter nos dado acesso ao seu laboratório (LAGEA – Laboratório de Geoquímica Ambiental), cedendo todos os equipamentos e reagentes necessários à execução das análises.

Às técnicas Suely e Carol (LAGEA), por toda a recepção e por serem tão prestativas, auxiliando e dando suporte para todos os procedimentos. Também agradeço ao Alexandre, por todas as orientações e acompanhamento para execução das extrações sequenciais.

Ao Professor Dr. Benjamin Piña (IDAEA/CSIC), por ter me recebido em seu laboratório para desenvolvimento do meu Doutorado Sanduíche e por todos os conhecimentos compartilhados. Também

agradeço ao pessoal do laboratório (Marta, Rubén, Anna, Eli, Inma, Mel, Karen e Fátima) pelas ajudas nos experimentos e pelos momentos agradáveis de conversas que me proporcionaram. Muchas gracias!

Agradeço também às chicas brasileiras que me acompanharam nessa odisseia do Doutorado Sanduíche e que se tornaram minhas irmãs queridas (Erica, Neidinha, Maybe, Pri, Ariane e Ana). Obrigada por terem compartilhado os dias e as experiências de vocês comigo, vou levar vocês em meu coração para sempre.

Ao Willian e à Kemellyn, por todos os momentos de co-orientação compartilhados, que foram muito importantes à minha formação, pois aprendi muito durante esse período. Vocês dois são alunos muito inteligentes, interessados e de fácil acompanhamento. Me sinto muito privilegiada por ter conseguido co-orientados tão especiais.

Ao pessoal do Laboratório de Mutagênese Ambiental (Raquel, Maria Tereza, Michele, Laís, Cleitinho, Bairral, Lê Gigeck, Lê Rocha, Lê Gonçalves, Jaque, Willian, Dri, Dânia, Franco, Matheus, Samantha, Mileni, Jaque Pira, Jorge, Thays, Kemellyn, Giovana, Gabriel, Rafaela, Gaby, Ana Cristina, Ana Paula, Maria Gabriela, Mariana, Lê Rosa) por todos os auxílios, conversas, discussões e pelo agradável convívio.

Um agradecimento especial também aos meus queridos e gentis amigos que me auxiliaram, seja nos procedimentos, discussões ou nas análises: Willian, Lê Rocha, Lê Gonçalves, Kemellyn, Giovana, Ana Cristina, Maria Gabriela, Maria Tereza, Lê Gigeck, Lais, Cleitinho, Dri. A vocês, o meu mais sincero muito obrigada!!

À minha “equipe de coleta”, Marin, professor Norberto, Maria Tereza e Willian, por me auxiliarem neste trabalho “sujo” e exaustivo. A presença e a contribuição de vocês foi muito importante para o sucesso dessa coleta, sem a qual, esse trabalho não existiria.

À Dri, nossa técnica mais querida, muito obrigada pelo seu apoio e ombro amigo, sempre a postos para tudo o que precisamos!! Obrigada também pelas comilanças compartilhadas! Agradeço também ao Gerson e à Cris, por sempre nos socorrer e nos auxiliar, e também por tornarem nosso ambiente mais alegre.

À minha amiga Larissa, amiga de longa data, mas que nunca deixou de estar ao meu lado (mesmo que distante) e de torcer por mim.

À CAPES, pela bolsa de Doutorado concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Instituto de Biociências da UNESP, por ceder sua infra-estrutura para execução do presente estudo.

Ao PDSE/CAPES, pela bolsa de Doutorado Sanduíche concedida.

Enfim, à todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

Muito obrigada!!

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

RESUMO

O crescente aumento das atividades antrópicas vem promovendo um aumento nos impactos causados ao meio ambiente. Dentre essas atividades humanas, a mineração, realizada no Brasil desde o século XVII e persistindo até os dias atuais, tem se destacado, quanto à sua potencialidade de causarem danos ambientais. O estado de Minas Gerais é um grande produtor de ouro e nele está localizado o município de Paracatu, onde se encontra a mina Morro do Ouro, que é considerada uma grande lavra a céu aberto, situada a poucos metros do perímetro urbano. Diante deste cenário, o presente estudo tem por objetivo avaliar a biodisponibilidade dos metais presentes nas amostras, as fontes poluidoras envolvidas com a contaminação desses metais e os riscos que esses metais promovem ao meio ambiente, por meio das análises químicas, extrações sequenciais e cálculos de Fator de Enriquecimento (EF), Índice de geoacumulação (Igeo) e Avaliação de Risco (RAC) e o potencial tóxico das amostras, por meio de bioensaios *in vivo* (*Allium cepa* e *Lactuca sativa*) e *in vitro* (cultura celular humana – HepG2/C3A). Para a avaliação do comprometimento dos rios que recebem influência da mineradora, foram coletadas amostras de água superficiais e de sedimentos de 3 regiões distintas: 1) jusante da mina Morro do Ouro, onde está localizado o município de Paracatu (P1, P2 e P3); 2) jusante da barragem de rejeitos da mina Morro do Ouro (P4, P5 e P6) e 3) rio de captação de água para abastecimento público de Paracatu (P7) e água de abastecimento fornecido pela ETA de Paracatu (P8). Também foram preparados dois extratos dos sedimentos coletados (solubilizado e lixiviado). Os resultados mostraram que essa região é altamente enriquecida com metais provenientes da própria constituição das rochas, no entanto, as atividades antrópicas, como as da mineradora, estão aumentando a biodisponibilização desses elementos no ambiente. Os bioensaios com *A. cepa* mostraram citotoxicidade e genotoxicidade para todas as amostras de água e genotoxicidade para todas as amostras de sedimento. Potencial mutagênico foi observado em algumas amostras de água (P2, P5 e P7) e sedimento (P2, P3 e P8), assim como citotoxicidade para sedimentos (P6 e P7). Para os bioensaios com *L. sativa*, nenhuma das amostras, nem de água, nem de sedimento, interferiram na taxa de germinação. Apenas as amostras do ponto P3 (solubilizado) induziram diminuição da germinação. Já para o desenvolvimento das sementes de *L. sativa*, as amostras de água induziram diminuição no crescimento de hipocótilo e da raiz (P1, P6 e P8) e as amostras de sedimento diminuíram o crescimento de hipocótilo (P1, P2, P3 e P5). Para os extratos solubilizado e lixiviado, foi observado um aumento no crescimento de raiz, para os dois extratos do ponto P4, mas não houve alteração no crescimento do hipocótilo. Os ensaios de viabilidade celular com o corante Azul de Tripan, realizados com cultura celular

HepG2/C3A, mostraram que as células foram mais sensíveis ao extrato solubilizado do que ao lixiviado. O ensaio do cometa, realizado pela exposição às amostras de água e sedimento (solubilizado), mostrou genotoxicidade apenas para o ponto P6 (solubilizado). A ausência de genotoxicidade nos demais pontos ocorreu, provavelmente, devido a um maior efeito citotóxico dessas amostras. O ensaio do MN com bloqueio de citocinese mostrou que todas as amostras de sedimento (solubilizado) foram genotóxicas, além de altamente citotóxicas, por ter elevados os índices de morte celular e de proliferação celular, enquanto mutagenicidade foi observada somente para as amostras dos pontos P2 e P3. Diante desses resultados, pode-se concluir que a mineração do Morro do Ouro possui alta potencialidade de causar danos aos ecossistemas dos corpos d'água e também aos humanos que vivem nessa área de estudo.

Palavras-chave: toxicidade; biomonitoramento; sedimento; água; citotoxicidade; genotoxicidade; mutagenicidade; *in vivo*; *in vitro*.

ABSTRACT

The increase of anthropic activities has been promoting an impact increase to the environment. Among these human activities, mining, conducted in Brazil since the XVII century, has stood out for its potential to cause environmental damage. The Morro do Ouro mine, located in Paracatu (state of Minas Gerais, considered a major gold producer) is a large open mining located a few meters from the urban perimeter. According to this scenario, the present study aims to evaluate the bioavailability of the metals present in the samples, the polluting sources involved with the contamination of these metals and the risks that these metals promote to the environment by chemical analysis, sequential extractions and calculations of Enrichment Factor (EF), Geoaccumulation Index (I_{geo}) and Risk Assessment (RAC) and the toxic potential of samples by *in vivo* (*Allium cepa* and *Lactuca sativa*) and *in vitro* bioassays (human cell culture - HepG2 / C3A). To evaluate the impact of rivers that receive influence from the mining company, surface water and sediment samples were collected from 3 different regions: 1) downstream of the Morro do Ouro mine, located in Paracatu (P1, P2 and P3); 2) downstream of the Morro do Ouro tailings dam (P4, P5 and P6) and 3) Paracatu water supply river (P7) and water supply provided by Paracatu WTS (Water Treatment Station) (P8). Afterwards, two extracts of each collected sediments (solubilized and leached) were prepared. The results demonstrated that this region is highly enriched with metals naturally derived from the rocks, however, anthropic activities, such as those of the mining company, are increasing the bioavailability of these elements in the environment. *Allium cepa* bioassays showed cytotoxicity and genotoxicity of the water samples and genotoxicity of the sediment samples. Furthermore, mutagenic potential was observed at some points (water: P2, P5 and P7; sediment: P2, P3 and P8). For sediment samples, cytotoxicity was also observed, but only at points P6 and P7. On the other hand, for *Lactuca sativa* bioassays, neither water nor sediment interfered with the germination rate. Only the samples of point P3 (solubilized) induced decreased germination. For the development of *L. sativa* seeds, water samples induced decrease in hypocotyl and root growth (P1, P6 and P8) and sediment samples decreased hypocotyl growth (P1, P2, P3 and P5). For solubilized and leachate extracts, an increase in root growth was observed for both P4 point extracts, but there was no change in hypocotyl growth. Cell viability assays with the Trypan Blue, performed with HepG2/C3A cell culture, showed that the cells were more sensitive to the solubilized extract than the leachate extract. The comet assay, performed with water and sediment samples (solubilized), showed genotoxicity only for point P6 (solubilized). The absence of genotoxicity at the other points was probably due to a greater

cytotoxic effect of these samples. The cytokinesis blocking MN assay showed that all the sediment samples (solubilized) were genotoxic as well as highly cytotoxic, since they presented high cell death and cell proliferation rates, while mutagenicity was observed only in P2 and P3 samples. According to these results, we can conclude that the mining of Morro do Ouro has high potential to cause damage to water bodies ecosystems and also to humans who live in the area.

Keywords: toxicity; biomonitoring; sediment; water; cytotoxicity; genotoxicity; mutagenicity; *in vivo*; *in vitro*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização do município de Paracatu-MG (latitude 17°13'20"S, longitude 46°52'29"W).....	39
Figura 2. Pontos de coleta das amostras de águas e sedimentos (Paracatu-MG).....	39
Figura 3. Aspecto geral do ambiente de coleta e amostras de água e sedimento (Paracatu-MG).....	41
Figura 4. Amostras de sedimento (solubilizado), após o período de decantação.....	41
Figura 5. Células HepG2/C3A utilizadas para o cálculo do Índice de proliferação por bloqueio de citocinese (CBPI).....	52
Figura 6. Metodologias utilizadas para avaliação ecotoxicológica e caracterização ambiental das amostras de água e sedimento coletadas (Paracatu-MG).....	53

Artigo 1

Figura 1. Localização do município de Paracatu-MG (latitude 17°13'20"S, longitude 46°52'29"W). Pontos de coleta das amostras de sedimento: A (P1), B (P2) e C (P3) - Córrego Rico; D (P4) - Córrego Santo Antônio; E (P5) - Ribeirão Santa Rita; F (P6) - Ribeirão São Pedro e G (P7) - Ribeirão Santa Isabel.....	59
Figura 2. Extração sequencial de Al, As, Cd, Pb, Cu, Sc, Fe e Mn nas amostras de sedimento de rios, nos seus diferentes pontos de coleta.....	71
Figura 3. Porcentagem de germinação (% G) de <i>Lactuca sativa</i> , para as diferentes amostras (solubilizado e lixiviado) de sedimento coletadas em sob influência da mineradora de ouro de Paracatu-MG.....	79
Figura 4. Médias de crescimento de hipocótilo e raiz de <i>Lactuca sativa</i> para as diferentes amostras de sedimento (solubilizado), coletados em rios sob influência de mineradora de ouro da cidade de Paracatu-MG.....	80
Figura 5. Médias de crescimento de hipocótilo e raiz de <i>Lactuca sativa</i> para as diferentes amostras de sedimento (lixiviado), coletados em rios sob influência de mineradora de ouro da cidade de Paracatu-MG.....	80
Figura 6. Raízes de <i>Lactuca sativa</i> após exposição às diferentes amostras de sedimento (solubilizado).....	81
Figura 7. Raízes de <i>Lactuca sativa</i> após exposição às diferentes amostras de sedimento (lixiviado).....	81

Artigo 2

Figura 1. Localização do município de Paracatu-MG (latitude 17°13'20"S, longitude 46°52'29"W). Pontos de coleta das amostras de água e sedimento: 1- (P1), 2- (P2) e 3- (P3) - Córrego Rico; 4- (P4) - Córrego Santo Antônio; 5- (P5) - Ribeirão Santa Rita; 6- (P6) - Ribeirão São Pedro; 7- (P7) - Ribeirão Santa Isabel; 8- (P8) - Água de abastecimento público.....	96
Figura 2. Índice Mitótico (IM), observado em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , após exposição das sementes às diferentes amostras de água e sedimento, coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.....	106

Figura 3. Índice de Morte Celular (IMC) observado em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , após exposição das sementes às diferentes amostras de água e sedimento, coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.....	107
Figura 4. Progressão dos efeitos citotóxicos observados em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> (Morte celular), após exposição das sementes em amostras de água e sedimentos de rios do entorno das atividades de uma mineradora de ouro de Paracatu-MG	108
Figura 5. Índice de Genotoxicidade (IGen), observado em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , após exposição às diferentes amostras de água e sedimento coletados na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.....	108
Figura 6. Efeitos genotóxicos observados em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , após exposição das sementes em amostras de água e sedimentos de rios do entorno das atividades de uma mineradora de ouro de Paracatu-MG.....	110
Figura 7. Aberrações Cromossômicas (AC) e Anormalidades Nucleares (AN) observadas em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , após exposição às diferentes amostras de água coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.....	111
Figura 8. Aberrações Cromossômicas (AC) e Anormalidades Nucleares (AN) observadas em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , após exposição às diferentes amostras de sedimento coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.....	112
Figura 9. Índice de Mutagenicidade (IMut) observado em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , após exposição das sementes às diferentes amostras de água e sedimento coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.....	112
Figura 10. Porcentagem de germinação (%G) observada em <i>Lactuca sativa</i> , após exposição às diferentes amostras de água e sedimento coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.....	114
Figura 11. Crescimento de hipocótilo e raiz de <i>Lactuca sativa</i> , para as diferentes amostras de água e sedimento coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.....	115
Figura 12. Raízes de <i>Lactuca sativa</i> , após exposição às diferentes amostras de água coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.....	115
Figura 13. Raízes de <i>Lactuca sativa</i> , após exposição às diferentes amostras de sedimento coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.....	116

Artigo 3

Figura 1. Localização do município de Paracatu-MG (latitude 17°13'20"S, longitude 46°52'29"W). Pontos de coleta das amostras de água e sedimento: 1- (P1), 2- (P2) e 3- (P3) - Córrego Rico; 4- (P4) - Córrego Santo Antônio; 5- (P5) - Ribeirão Santa Rita; 6- (P6) - Ribeirão São Pedro; 7- (P7) - Ribeirão Santa Isabel; 8- (P8) - Água de abastecimento público.....	127
Figura 2. Momento da cauda de Olive em células HepG2/C3A, após exposição da linhagem celular HepG2 às diferentes amostras de água e sedimento (solubilizado) coletadas em rios da região da mina Morro do Ouro (Paracatu-MG).....	134
Figura 3. Resultados de CBPI em células HepG2/C3A, após exposição às diferentes amostras dos sedimentos (solubilizado) analisados.....	135

Figura 4. Alterações observadas no ensaio do MN com bloqueio de citocinese em células HepG2/C3A, após exposição às diferentes amostras dos sedimentos (solubilizado) analisados.....	136
Figura 5. Efeitos observados em células HepG2/C3A, após exposição em amostras de água e sedimentos de rios do entorno das atividades de uma mineradora de ouro de Paracatu-MG.....	137
Figura 6. Índice de morte celular observado no ensaio do MN com bloqueio de citocinese em células HepG2/C3A, após exposição às diferentes amostras dos sedimentos (solubilizado) analisados.....	138

LISTA DE TABELAS

Tabela1. Descrição dos pontos de coleta das amostras de água e de sedimento de rios sob a influência de atividade de mineração de ouro da região de Paracatu-MG.....40

Tabela 2. Procedimentos para a extração sequencial realizada nos sedimentos de rios sob a influência de atividade de mineração de ouro da região de Paracatu-MG.....44

Artigo 1

Tabela1. Descrição dos pontos de coleta das amostras de sedimento de rios sob a influência de atividade de mineração de ouro da região de Paracatu-MG.....60

Tabela 2. Resultados da análise química dos metais presentes nos sedimentos de rios sob a influência de atividade de mineração de ouro da região de Paracatu-MG, nos seus diferentes pontos de coleta.....67

Tabela 3. Resultados da análise química dos metais presentes nos sedimentos de rios, nos seus diferentes pontos de coleta, após os ensaios de extração sequencial.....70

Tabela 4. Fatores de Enriquecimento (EF) obtidos para os metais presentes no sedimento de rios, nos seus diferentes pontos de coleta.....73

Tabela 5. Índices de geoacumulação (Igeo) para as amostras de sedimento de rios, nos seus diferentes pontos de coleta.....75

Tabela 6. Classificação para os valores de RAC (*Risk Assesment Code*) obtidos das amostras de sedimento de rios, nos seus diferentes pontos de coleta.....77

Tabela 7. Porcentagem de viabilidade celular da linhagem HepG2/C3A, obtida pelo Teste de exclusão do corante Azul de Tripan, após exposição das células às amostras de sedimento (solubilizado e lixiviado), coletados em rios sob influência de mineradora de ouro da cidade de Paracatu-MG.....83

Artigo 2

Tabela1. Descrição dos pontos de coleta das amostras de sedimento, distribuídos em uma área sob influência de uma mineradora de ouro (Paracatu-MG)95

Tabela 2. Dados obtidos pela sonda multiparâmetro Horiba (Multi Water Quality Chequer U-50 Series), após medições realizadas *in situ* nas amostras de água dos diferentes pontos de coleta de rios do entorno das atividades de uma mineradora de ouro de Paracatu-MG.....102

Tabela 3. Resultados das análises químicas para as concentrações de metais, realizadas com amostras de água dos diferentes pontos de coleta em rios do entorno das atividades de uma mineradora de ouro de Paracatu-MG.....103

Tabela 4. Resultados da análise química para os metais realizada com sedimentos superficiais dos diferentes pontos de coleta de que rios do entorno das atividades de uma mineradora de ouro de Paracatu-MG.....104

Tabela 5. Efeitos tóxicos gerais observados em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição às diferentes amostras de água e sedimento coletados na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.....113

Artigo 3

Tabela 1. Descrição dos pontos de coleta das amostras de sedimento, distribuídos em uma área sob influência de uma mineradora de ouro.....	128
Tabela 2. Resultados da análise química dos metais presentes nas águas de rios sob a influência de atividade de mineração de ouro da região de Paracatu-MG, nos seus diferentes pontos de coleta.....	133
Tabela 3. Quantificação estimada por extração sequencial dos metais presentes nos sedimentos (solubilizados) de rios sob a influência de atividade de mineração de ouro da região de Paracatu-MG, nos seus diferentes pontos de coleta.....	133

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ACN - Alterações Cromossômicas e Nucleares

AC - Alterações Cromossômicas

Al - Alumínio

AN - Anormalidades Nucleares

As - Arsênio

ATSDR - *Agency for Toxic Substances And Disease Registry* (Agência para o Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças)

BCRJ - Banco de Células do Rio de Janeiro

CBPI - Índice de proliferação por bloqueio de citocinese

CCME - *Canadian Council of Ministers of the Environment* (Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente)

Cd - Cádmiio

CN - Controle Negativo

CO₂ - Dióxido de carbono

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CP - Controle Positivo

Cu - Cobre

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EF - *Enrichment Factor* (Fator de Enriquecimento)

USEPA - *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)

Fe - Ferro

FeAsS - Arsenopirita

HCl - Ácido clorídrico

HepG2/C3A - Célula de Carcinoma Hepatocelular Humano

Hg - Mercúrio

HNO₃ - Ácido nítrico

IARC - *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer)

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBRAM - Instituto Brasileiro de Mineração

IGen - Índice de Genotoxicidade

Igeo - Índice de geoacumulação

IM - Índice Mitótico

IMC - Índice de Morte Celular

IMut - Índice de Mutagenicidade

ISO - *International Organization for Standardization* (Organização Internacional de Normalização)

MG - Minas Gerais

MMS - Metilmetano Sulfonato

MN - Micronúcleo

Mn - Manganês

NaCl - Cloreto de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

OD - Oxigênio dissolvido

OECD - *Organisation for Economic Co-operation and Development* (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORP - Potencial de oxirredução

PEL - *Probable Effect Level* (Nível de Efeito Provável)

Pb - Chumbo

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

RAC - *Risk Assessment Code* (Código de Avaliação de Risco)

Sc - Escândio

TDS - Sólidos totais dissolvidos

TEL - *Threshold Effect Level* (Nível Limiar de Efeito)

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	23
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1 A mineração no Brasil.....	24
3.2 Histórico e características da área de estudo	25
3.3 Legislação ambiental aplicada à mineração.....	26
3.4 Características e toxicidade de metais	27
3.4.1. Alumínio (Al)	27
3.4.2. Arsênio (As).....	28
3.4.3 Cádmiio (Cd).....	29
3.4.4 Chumbo (Pb).....	29
3.4.5 Cobre (Cu).....	30
3.4.6 Ferro (Fe).....	31
3.4.7 Manganês (Mn).....	32
3.4.8 Mercúrio (Hg)	32
3.5 Avaliação ecotoxicológica.....	33
3.5.1 Biomonitoramento	33
3.5.2 Bioindicadores de ensaios ecotoxicológicos <i>in vivo</i>	35
3.5.3 Bioindicadores de ensaios ecotoxicológicos <i>in vitro</i>	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Material biológico	38
4.1.1 Sementes de <i>Allium cepa</i> e <i>Lactuca sativa</i>.....	38
4.1.2 Cultura de células humanas	38
4.2 Amostras ambientais	38
4.2.1 Solubilizado	41
4.2.2 Lixiviado	42

4.3 Análises químicas e físico-químicas	42
4.3.1 Análises químicas.....	42
4.3.2 Análises físico-químicas	43
4.4 Extração sequencial.....	43
4.4.1 Análise da origem, do grau de contaminação e dos riscos da poluição	44
4.5 Bioensaios com <i>Allium cepa</i>	45
4.5.1 Exposição às amostras de água	45
4.5.2 Exposição às amostras de sedimento	46
4.5.3 Ensaio de ACN e Teste do MN em células meristemáticas.....	46
4.6 Bioensaios com <i>Lactuca sativa</i>	47
4.6.1 Exposição às amostras de água	48
4.6.2 Exposição às amostras de sedimento	48
4.6.3 Exposição às amostras de sedimento (extratos: solubilizado e lixiviado).....	48
4.6.4 Ensaio de germinação e de desenvolvimento das sementes	48
4.7 Bioensaios com células HepG2/C3A	49
4.7.1 Cultivo das células	49
4.7.2 Exposição às amostras.....	49
4.7.3 Viabilidade celular – Teste de exclusão do corante Azul de Tripán.....	50
4.7.4 Ensaio do cometa	50
4.7.5 Ensaio do MN com bloqueio de citocinese	51
4.8 Resumo das metodologias	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	54
Artigo 1. Avaliação de risco e influência ecotoxicológica das atividades de mineração da mina Morro do Ouro (Paracatu-MG)	55
Artigo 2. Análise ecotoxicológica de água e sedimentos de rios de uma região de mineração de ouro rica em arsenopirita	91
Artigo 3. Toxicidade de água e sedimento de uma área sob influência de mineração de ouro (Paracatu-MG), por meio de ensaios <i>in vitro</i>	124

6 CONCLUSÕES GERAIS	143
7 REFERÊNCIAS	146

1 INTRODUÇÃO

O meio ambiente vem sendo cada vez mais impactado por atividades antrópicas, que contaminam o ar, a água, o solo e o subsolo (CHASIN; PEDROZO, 2003). As áreas de mineração e metalurgias vêm sendo consideradas as principais fontes de contaminação por metais (ALLOWAY, 1990). De acordo com Oga, Camargo e Batistuzzo (2014), além das minerações e atividades industriais, as poeiras e a queima de combustíveis fósseis também contribuem para o acúmulo de metais em solos. Quando os poluentes atingem os corpos d'água, podem ocorrer alterações na composição, concentração, transporte e mobilidade desses poluentes, devido aos diferentes fatores ambientais aos quais estarão expostos (PEREIRA, 2004).

Devido aos importantes depósitos de minerais do território brasileiro, o setor de mineração vem sendo praticado no país desde o século XVII e, desde então, essa prática tem contribuído de forma significativa para a poluição ambiental. As explorações minerais podem ser subdivididas em três tipos principais, quanto ao mineral extraído: metálicos, não-metálicos e energéticos (BARRETO, 2001). Dentre os minerais metálicos, o ouro é de grande relevância econômica, se caracterizando como o segundo mineral mais exportado do país (IBRAM, 2018).

As reservas de ouro lavráveis no Brasil estão distribuídas nos estados do Pará (42,7%), Minas Gerais (28%), Mato Grosso (6,9%), Goiás (5%), Bahia (4,5%), dentre outros (12,9%), mas os principais estados produtores são Minas Gerais (64%), Goiás (11%), Bahia (11%) e Pará (3%) (IBRAM, 2012). A cidade de Paracatu está localizada na região noroeste do estado de Minas Gerais, onde se encontra a mina Morro do Ouro, que é considerada uma das maiores lavras a céu aberto do mundo (PARACATU, 2019). Essa mina opera com baixos teores de ouro, o que leva à necessidade de remobilização de grandes quantidades de minério, para uma produção significativa do metal (BIDONE *et al.*, 2016).

Para um estudo de monitoramento ambiental, é de grande importância a realização de bioensaios que avaliem o impacto dos contaminantes no ambiente (PLAZA *et al.*, 2005). De acordo com Houk (1992), para que seja feita uma eficaz análise ambiental, é necessário uma escolha adequada dos ensaios a serem utilizados na avaliação, sendo importante considerar, não só as características da amostra a ser investigada, mas também elementos como: validade e simplicidade do sistema-teste e custo relativo do ensaio a ser realizado. Além disso, também é importante a utilização de organismos-testes diferentes, que possam oferecer uma variedade maior de dados.

Diante deste cenário, fica clara a grande necessidade de maiores estudos na região de influência das atividades da mina Morro do Ouro, que possam quantificar os agentes poluidores e avaliar os seus efeitos sobre a biota aquática e demais organismos eventualmente expostos a essa contaminação, bem como os comprometimentos que possam causar sobre a saúde humana.

No presente estudo, foram realizados ensaios para detecção dos metais presentes em amostras de água e sedimento dos corpos hídricos da região; avaliação das possíveis origens e biodisponibilidade desses elementos; o comprometimento que esses poluentes promovem no ambiente; e avaliação de risco desses elementos sobre os organismos expostos. Além disso, foram realizados ensaios ecotoxicológicos das amostras de água e sedimento dos corpos d'água localizados nesta região, abrangendo três áreas distintas: a jusante da mineradora, onde está localizado o município de Paracatu-MG; o entorno da barragem de rejeitos da mineradora; e as relacionadas ao abastecimento público de Paracatu-MG (corpo hídrico de captação e água de abastecimento). Para avaliação da toxicidade destas amostras, foram realizados bioensaios *in vivo* com os organismos-teste *Allium cepa* (cebola) e *Lactuca sativa* (alface) e bioensaios *in vitro* com cultura de células hepáticas humanas HepG2/C3A.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivos:

- Avaliar a biodisponibilidade dos elementos metálicos presentes nos sedimentos, a possível fonte dos mesmos e os riscos que eles podem oferecer ao ambiente e à saúde humana, por meio de:
 - Análise de extração sequencial de metais, para identificar a distribuição dos metais nas diferentes fases que compõem as amostras;
 - Análise do Fator de enriquecimento (EF) de metais em amostras, para identificar fontes naturais ou antropogênicas desses elementos;
 - Análise do Índice de geoacumulação (Igeo), para avaliar o grau de poluição dos metais estudados;
 - Análise do Código de avaliação de risco (RAC), para avaliar o risco desses elementos no ambiente, de acordo com sua disponibilidade no sedimento;
- Avaliar a toxicidade de amostras ambientais (água e sedimento) de uma área sob influência de uma grande mineradora de ouro, localizada no município de Paracatu-MG, por meio de:
 - Análise do índice mitótico, alterações cromossômicas e nucleares, MN e morte celular, em células meristemáticas de *Allium cepa*;
 - Análise de germinação e desenvolvimento de sementes de *Lactuca sativa*;
 - Análise do ensaio do cometa e do MN com bloqueio de citocinese em cultura de células hepáticas humanas (HepG2/C3A).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A mineração no Brasil

A mineração no Brasil teve início no século XVII, mas, com a descoberta do ouro no século XVIII, esta atividade teve um grande pico, que colocou o Brasil como o primeiro grande produtor mundial de ouro. Após um período de declínio, surgiu no século XX, após a Segunda Guerra Mundial, um segundo ciclo mineral, que foi responsável pela construção, entre as décadas de 1970 e 1980, de grande parte do atual parque mineral do país. O Brasil possui em seu subsolo importantes depósitos de minerais, extraído dele, aproximadamente, 70 diferentes minerais, dentre eles: minerais metálicos (21), minerais não-metálicos (45) e minerais energéticos (4) (BARRETO, 2001).

A mineração é considerada um dos setores básicos da economia brasileira, responsável pela geração de uma grande quantidade de empregos. Segundo dados do Ministério de Minas e Energia (BRASIL, 2019), esse setor representou, em 2017, cerca de 4,69% do PIB nacional. Ainda de acordo com estes dados, em 2018, o setor mineral representou 20,8% do total de exportações no país (US\$ 239,9 bilhões) e, quando considerada somente a mineração, esse valor atingiu 10,5% das exportações brasileiras e 50,6% das exportações do setor mineral, totalizando 25,2 bilhões de dólares, o que representou um crescimento de 4,8%, em relação ao ano de 2017.

Dentre os minerais extraídos, está o ouro que tem alta relevância, sendo o segundo mineral mais exportado do Brasil, quando comparados os seus valores em dólares (IBRAM 2019). Segundo dados da IBRAM (IBRAM, 2012), as reservas de ouro lavráveis no Brasil estão distribuídas nos estados do Pará (42,7%), Minas Gerais (28%), Mato Grosso (6,9%), Goiás (5%), Bahia (4,5%) e outros estados (12,9%), mas os principais produtores são Minas Gerais (64%), Goiás (11%), Bahia (11%) e Pará (3%).

Além da importância socioeconômica, essa atividade também pode causar diversos impactos ambientais, pois altera intensamente a geomorfologia tanto da área minerada como das áreas vizinhas. De acordo com Farias (2002), os principais problemas provenientes da atividade mineradora no Brasil podem ser subdivididos em quatro grupos: poluição da água, poluição do ar, poluição do solo (subsistência do terreno) e poluição sonora. O estado de Minas Gerais, que é considerado o maior produtor de ouro do país, possui grandes áreas impactadas por rejeitos ricos em arsênio e suas águas superficiais com turbidez muito aumentada (FARIAS, 2002).

3.2 Histórico e características da área de estudo

Em 1722, apesar do ouro ainda não ter sido descoberto na região de Paracatu-MG, a região era conhecida e já havia expectativas da descoberta de metais preciosos no local. Em 1744, foi comunicado à Coroa o descobrimento das minas do vale do Paracatu. Após essa descoberta, houve um deslocamento humano em busca da abundância desse mineral que fluía dos veios d'água, o que contribuiu para o rápido crescimento do Arraial de São Luiz e Sant'Anna das Minas do Paracatu, que passou a ser chamado, em 1798, de Paracatu do Príncipe. A riqueza proveniente do ouro aluvial logo se dissipou, provocando uma decadência econômica na vila. Seu crescimento foi retomado com a agropecuária, mas teve um novo impulso no século XX, quando foi cogitada a mudança da capital federal para Paracatu. Embora essa transferência não tenha acontecido, a ida da capital para Brasília, manteve-se a cidade como local favorável para o crescimento, pois Paracatu fica às margens da BR 040, importante rodovia de acesso a Brasília (GONÇALVES, 2019; PARACATU, 2019).

A cidade de Paracatu tem hoje uma agricultura altamente tecnificada, implantada em larga escala, uma pecuária intensiva e uma exploração mineral das mais modernas do mundo. Contudo, na região ainda existe exploração agrícola rudimentar de subsistência e pecuária extensiva. Apenas os métodos antigos de mineração como o garimpo não são mais permitidos (PARACATU, 2019).

A área de mineração da cidade de Paracatu fica localizada a cerca de 250 m da zona urbana (KAFRUNI, 2015), onde está localizada a mina Morro do Ouro, que é uma das maiores minas de ouro a céu aberto do mundo, mas que opera com baixos teores de ouro, o que torna necessário a remoção de grandes quantidades de minério para produção de uma quantidade expressiva de ouro (BIDONE *et al.*, 2016). Essa mina, que está em operação desde 1987, começou sua produção com uma média de 0,78 g de ouro por tonelada de minério, tendo em torno de 0,5 milhões de toneladas moídas por ano, tendo, após 2013, uma produção de 55,7 milhões de toneladas moídas por ano, numa produção de 0,38 g de ouro para cada tonelada. As estimativas para os anos de 2019 e 2020 são de produção de 0,45 g e 0,39 g de ouro/tonelada, respectivamente, para um total de cerca de 38 milhões de toneladas de minério ao ano (SIMS, 2014).

Essa grande quantidade de minério extraído também gera quantidades elevadas de rejeitos e, conseqüentemente, uma grande preocupação, pelo fato desses rejeitos serem ricos em arsênio, proveniente de um mineral sulfeto-arsênico chamado arsenopirita (FeAsS) (LÁZARO *et al.*, 1997). O As é liberado da arsenopirita por processos inorgânicos ou bióticos (NORDSTROM; SOUTHAM, 1997), devido à oxidação do mineral por oxigênio (O₂) ou ferro

(Fe³⁺) (PLUMLEE, 1999). Além do As, também ocorre liberação de outros elementos, por meio de reações com sulfetos, formando sulfatos, hidróxidos e outros compostos oxidados (BIDONE *et al.*, 2016). Segundo Bidone *et al.* (2016), esse cenário tem gerado preocupação das autoridades locais, devido a casos de intoxicação humanas possivelmente relacionadas a água contaminada com As.

3.3 Legislação ambiental aplicada à mineração

De forma geral, cada país tem sua especificidade ao que se refere às concessões minerais e ao gerenciamento ambiental da atividade mineradora. O órgão responsável pelo estabelecimento das normas gerais e critérios de qualidade ambiental no Brasil é o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), enquanto que os Estados e Municípios são responsáveis pelo licenciamento, controle e fiscalização das áreas mineradas (FARIAS, 2002).

O CONAMA (Resolução nº 357/2005) classifica os corpos de água doce (a partir do parâmetro salinidade, igual ou inferior a 0,5‰) em: Classe especial - águas destinadas ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção; de preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; e de preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral; Classe 1 - destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; proteção de comunidades aquáticas; recreação (natação e mergulho) e irrigação de hortaliças e frutas que sejam consumidas cruas; Classe 2 - destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; proteção de comunidades aquáticas; destinadas à recreação (natação e mergulho); à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, nos quais pode ocorrer contato direto do público; à aquicultura e atividade de pesca; Classe 3 - destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; à pesca amadora; à recreação de contato secundário e dessedentação animal; Classe 4 - destinadas à navegação e harmonia paisagística. A resolução 357/2005 também estabelece as condições e padrões de qualidade das águas e fornece limites individuais para cada substância listada nas diferentes classes dos corpos d'água (BRASIL, 2005).

A Resolução CONAMA nº 454/2012 (BRASIL, 2012) estabelece os valores de referência e diretrizes de qualidade dos sedimentos. Essa resolução fornece os limites máximos de concentração de determinadas substâncias, para conservação e proteção da biota. A CONAMA 454/2012 é baseada no *Canadian Sediment Quality Guideline* (CCME, 1995; 2002), que estabelece os valores de referência de algumas substâncias e dois parâmetros a serem

considerados: *Threshold Effect Level* (TEL) e *Probable Effect Level* (PEL). De acordo com CCME (1995), o TEL é calculado para determinar uma faixa de concentrações químicas dos sedimentos onde os efeitos biológicos adversos nunca, ou quase nunca, são observados e o PEL o nível acima do qual os efeitos biológicos adversos são geralmente ou sempre observados. A CONAMA 454/2012 (BRASIL, 2012) também estabelece dois níveis para comparação dos resultados da caracterização química dos sedimentos: o Nível 1, que pode ser comparado ao TEL e o Nível 2, que pode ser comparado ao PEL. Ainda de acordo com a resolução (Brasil, 2012) o Artigo 12 apresenta a orientação de que deverão ser realizados ensaios de ecotoxicidade, quando as concentrações de As, Cd, Pb ou Hg estejam superior ao Nível 1 ou a concentração de qualquer substância (listada na tabela da Resolução 454/2012) se apresentar superior ao Nível 2.

3.4 Características e toxicidade de metais

3.4.1. Alumínio (Al)

O Al é um metal pertencente à família 3A da tabela periódica, com massa atômica de 26,98 u e número atômico igual a 13 (RUSSEL, 1994). É o metal mais abundante da crosta terrestre, por isso encontra-se amplamente distribuído. O Al, por ser muito reativo, é sempre encontrado na natureza combinado com outros elementos, sendo normalmente com oxigênio, silício e flúor. O Al é obtido a partir de minerais, principalmente a bauxita (Al_2O_3) (ATSDR, 2008).

Segundo a *Agency for Toxic Substances And Disease Registry* (ATSDR), o Al ocorre naturalmente no solo, água e ar, porém, pode ser encontrado em altas concentrações devido às atividades de mineração ou processamento de minérios de Al, assim como produção de metais, ligas ou compostos de Al. Usinas elétricas a carvão ou incineradoras também liberam Al ao ambiente, porém em pequenas quantidades (ATSDR, 2008).

O Al vem sendo relacionado, biologicamente, ao envelhecimento precoce, causando alterações neurológicas. Aumento nos índices de Al vem sendo demonstrado em portadores de esclerose cerebral (Alzheimer) e em crianças com dislexia. No humano, o Al é armazenado no cérebro, sangue e fígado (PASCALICCHIO, 2002). A maior parte do Al é absorvido de alimento, água e medicamentos, sendo eliminado do corpo, rapidamente, pelas fezes. Grande parte da pequena quantidade de Al que entra na corrente sanguínea é eliminada pela urina (ATSDR, 2008).

Não há dados sobre carcinogenicidade para este elemento nem na *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (WHO, 2019), nem na *United States Environmental Protection*

Agency (USEPA) (USEPA, 2019), não sendo também incluído nas listas de substâncias tóxicas dessas agências. No entanto, a IARC classifica a produção de Al como carcinogênica para humanos (Grupo 1), devido a casos de câncer de pulmão e bexiga em trabalhadores expostos a esses processos (WHO, 2019).

3.4.2. Arsênio (As)

O As é um semi-metal da família 5A da tabela periódica, com número atômico igual a 33 e massa atômica de 74,92 u (RUSSEL, 1994). A ocorrência do As é natural e este elemento encontra-se amplamente distribuído na crosta terrestre. No ambiente, geralmente se encontra combinado com outros elementos como oxigênio, cloro e enxofre, sendo chamado de As inorgânico. No solo e em vários tipos de rocha, o As inorgânico ocorre naturalmente em minerais e minérios que contenham cobre ou chumbo. Esses minérios, quando aquecidos em fundições, podem expelir As para o ar, como uma poeira fina. Quando se encontra combinado com o carbono ou hidrogênio, é chamado de arsênio orgânico (ATSDR, 2007). As principais fontes antropogênicas de liberação de arsênio são: mineração de materiais não-ferrosos e fundição, aplicação de praguicidas, combustão de carvão e madeira e incineração de lixo (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

O As, em suas formas inorgânicas arsenato e arsenito, são bem absorvidos no trato gastrointestinal, com taxas superiores a 95% de absorção. Já o arsênio orgânico tem menor absorção (75 a 85%). Quanto mais solúvel for um composto de As, maior será a absorção desse elemento pelo organismo (BARRA *et al.*, 2000). Após a ingestão, a meia-vida dessas espécies também tem grande variação: o arsenato tem eliminação de 66% da dose com meia-vida de 2,1 dias, 30% da dose com meia-vida de 9,5 dias e 3,7% com meia-vida de 38 dias; o arsenito tem excreção de 48% da dose dentro de 5 dias, com meia-vida de 30 horas; a arsenobetaina (forma orgânica encontrada em alimentos marinhos) não se biotransforma, sendo eliminada pelos rins, com meia-vida de 18 horas (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014). Segundo Abernathy *et al.* (1999), o As não interage diretamente com o DNA e não causa mutações, exceto quando ocorre curta exposição em altas doses, mas ele pode causar amplificação do gene e danos cromossômicos em baixas doses. Ele também pode inibir o sistema de reparo do DNA, estabelecendo-se efeitos mutagênicos por outros agentes.

A IARC (WHO, 2019) e a USEPA (USEPA, 2019) classificam o As inorgânico como carcinogênico para humanos, pertencendo aos grupos 1 da IARC para carcinogenicidade e ao grupo A da USEPA. A exposição crônica oral tem provocado, em humanos, efeitos gastrointestinais, anemia, neuropatia periférica, lesões na pele, hiperpigmentação e danos no

fígado ou rim. A inalação do As inorgânico tem sido associada com o câncer de pulmão, e a sua ingestão a câncer de pele, bexiga, fígado e pulmão (ATSDR, 2007a).

3.4.3 Cádmio (Cd)

O elemento Cd é um metal de transição da família 2B da tabela periódica, que possui massa atômica de 112,41 u e número atômico 48 (RUSSEL, 1994). Normalmente é encontrado na crosta terrestre associado a minérios de zinco, chumbo e cobre. As formas cloreto de cádmio e sulfato de cádmio são solúveis em água (ATSDR, 2012a).

De acordo com a ATSDR, as emissões de cádmio no solo, água e ar são causadas por refino e mineração de metais não-ferrosos, pela fabricação e aplicação de fertilizantes, por combustão de combustíveis fósseis e pela incineração e descarte de resíduos. O Cd pode também se acumular em organismos aquáticos e culturas agrícolas (ATSDR, 2012a). Em culturas agrícolas próximas a regiões com fontes poluidoras desse metal nem sempre é possível distinguir se o Cd é proveniente da superfície de deposição ou da captação pelas raízes das plantas (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

Em pessoas saudáveis, cerca de 3 a 7% do cádmio ingerido é absorvido, no entanto, pessoas com deficiência de ferro, tem esse valor de absorção aumentado para 15 a 20%. A meia-vida biológica do Cd é de 10 a 35 anos. Seus principais efeitos tóxicos para humanos estão relacionados aos distúrbios nos rins, ossos e sangue (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

De acordo com a IARC (WHO, 2019), o Cd é considerado carcinogênico para humanos (Grupo 1), baseado em evidências de tumores pulmonares de trabalhadores e de animais expostos por via inalatória. Já a USEPA (USEPA, 2019) classifica o Cd como provavelmente carcinogênico para humanos (Grupo B1), considerando as evidências limitadas de carcinogenicidade em humanos.

3.4.4 Chumbo (Pb)

O elemento Pb é um metal da família 4A da tabela periódica, com número atômico de 82 e massa atômica igual a 207,2 u (RUSSEL, 1994). O Pb tem ocorrência natural na crosta terrestre, no entanto normalmente é encontrado combinado com dois ou mais elementos, formando compostos de Pb. Os níveis de Pb aumentaram mais de 1.000 vezes no ambiente, nos últimos três séculos, em decorrência das atividades antrópicas, principalmente por emissão de fundições e fábricas de baterias (ATSDR, 2007b).

Na atmosfera, esse metal é encontrado na forma particulada, porém quando em partículas muito pequenas, pode percorrer grandes distâncias. O Pb pode ser removido do ar pela chuva ou por sedimentação no solo ou em águas superficiais. A sua concentração no ar teve grande declínio após a proibição do uso de Pb tetraetila como aditivo antidetonante na gasolina. No solo, a concentração de Pb geralmente é baixa, sendo mais encontrado nas camadas superficiais, devido à precipitação atmosférica, onde se adere fortemente às partículas. Na água, a contaminação ocorre principalmente por efluentes industriais, como siderúrgicas, escoamento urbano e barragens de mineração. Plantas e animais de áreas contaminadas podem acumular Pb em seus corpos, possibilitando a transferência desse elemento pela cadeia trófica (ATSDR, 2007b).

A absorção de Pb pelo trato gastrointestinal em adultos é de cerca de 3 a 10%, enquanto em crianças, a absorção é maior, em torno de 45 e 50%. Além disso, a presença de cálcio e fosfato na dieta diminui a taxa de absorção do Pb. A assimilação de Pb no corpo humano se dá, principalmente, nos ossos, cuja carga total em adultos chega a atingir 94% e em crianças 73% do Pb assimilado. A meia-vida de eliminação do Pb é de 27 anos. A presença de Pb nos ossos se dá em dois compartimentos: um estável, onde o Pb permanece por dezenas de anos, e um lábil, onde se mantém um equilíbrio entre o Pb dos ossos e dos tecidos moles e sangue. No sangue, a meia-vida deste elemento é de cerca de 30 dias. O Pb é excretado principalmente pela urina e pelas fezes, tendo como vias menores de eliminação o suor, saliva, cabelo, unhas e leite materno (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

A IARC (WHO, 2019) classifica o Pb como possivelmente carcinogênico para humanos (Grupo 2B), enquanto seus compostos inorgânicos são classificados como provavelmente carcinogênico para humanos (Grupo 2A) e seus compostos orgânicos como Grupo 3 - não classificáveis quanto a carcinogenicidade. Já a USEPA (USEPA, 2019) classifica o Pb como provavelmente carcinogênico para humanos (Grupo 2B), baseado em evidências suficientes de carcinogenicidade em animais.

3.4.5 Cobre (Cu)

O Cu é um metal de transição da família 1B da tabela periódica, com número atômico 29 e massa atômica de 63,54 u (RUSSEL, 1994). O Cu ocorre naturalmente em rochas, solo, água, sedimento e, em baixas concentrações, no ar. Esse elemento também ocorre naturalmente, em baixos níveis, em plantas e animais, sendo um elemento essencial a todos os organismos vivos, porém quando em níveis elevados ele pode ser tóxico. Em animais filtradores, como mexilhões e ostras, o Cu é encontrado em concentrações mais elevadas (ATSDR, 2004).

No ambiente, o Cu normalmente é encontrado em regiões próximas de minas, fundições, ambientes industriais, aterros sanitários e locais de disposição de resíduos. No solo, o Cu fica fortemente ligado à matéria orgânica e outros componentes como argila, areia e outros, nas camadas mais superficiais. Quando o Cu é liberado na água, ele pode ser transportado pelas águas superficiais como compostos de Cu, Cu livre ou ainda ligado a partículas em suspensão. O Cu presente nos corpos d'água acaba se acumulando nos sedimentos. No ar, o Cu é transportado em partículas emitidas por fundições e plantas de processamento de minério, onde são levados pelo vento até serem depositados nos solos e águas superficiais (ATSDR, 2004).

A USEPA (USEPA, 2019) classifica o Cu como do Grupo D – não classificável quanto à carcinogenicidade humana, enquanto a IARC não tem esse elemento na sua lista de substâncias tóxicas (WHO, 2019).

3.4.6 Ferro (Fe)

O Fe é um metal de transição, pertencente à família 8B da tabela periódica, cujo número atômico é 26 e massa atômica 55,84 u (RUSSEL, 1994).

Não há dados sobre este elemento na ATSDR, nem sobre carcinogenicidade na IARC (WHO, 2019), nem na USEPA (USEPA, 2019), não constando nas listas de substâncias tóxicas destas agências.

Apesar do Fe ser um elemento essencial e não constar nas listas de substâncias tóxicas das agências internacionais aqui apresentadas, em quantidades elevadas ele pode promover danos à saúde. Alguns órgãos, como o fígado e o coração, e células, como as beta do pâncreas, podem ser mais afetados pela sobrecarga de Fe (hemocromatose). Além disso, há muitas evidências de que, além de sinergizar a oxidação de ácidos graxos polinsaturados, o Fe intracelular livre também promove danos ao DNA (EATON; QIAN, 2002). Os níveis de Fe devem ser mantidos dentro de uma faixa estreita, pois sua deficiência pode causar problemas, como a anemia. De acordo com Toyokuni (2009), em seu artigo de revisão, o Fe, quando em excesso, tem importante papel na promoção de danos oxidativos de tecidos biológicos e células. A indução de estresse oxidativo, derivado do excesso de Fe, gera radicais livres que aumentam os riscos de câncer (TOYOKUNI, 2011; 2016). O autor ainda discute em seus artigos, que a boa compreensão dos processos carcinogênicos induzidos pelo Fe é de elevada relevância para a prevenção de cânceres induzidos por esse elemento.

3.4.7 Manganês (Mn)

O Mn é um metal de transição, pertencente à família 7B da tabela periódica, com número atômico igual a 25 e massa atômica igual a 54,93 u (RUSSEL, 1994). O Mn ocorre naturalmente no ar, solo, água e alimentos, no entanto, normalmente é encontrado combinado com outros elementos como oxigênio, enxofre e cloro. O Mn é um elemento traço essencial e é necessário em doses baixas para manutenção do organismo. Doses adicionais de Mn podem ser encontradas no ar, água e solo em decorrência da liberação da manufatura, uso e descarte de produtos à base de Mn (ATSDR, 2012b).

No solo, a mobilização e retenção do Mn vão depender de fatores como estado químico do Mn e tipo do solo. Quando disposto na água, a maior parte do Mn pode se ligar a partículas na água ou se fixar no sedimento. O Mn pode entrar no corpo humano por inalação, ingestão de alimentos e bebidas e uma quantidade muito pequena, pode ser absorvida por contato dérmico. Dentro do corpo, os compostos de Mn podem se decompor em outros produtos químicos, mas o Mn não pode ser decomposto, sendo eliminado, na sua maioria, por meio das fezes dentro de alguns dias (ATSDR, 2012b).

De acordo com a USEPA (USEPA, 2019) o Mn é classificado como Grupo D – não classificável quanto à carcinogenicidade humana, considerando que os estudos existentes são inadequados para avaliação da carcinogenicidade deste elemento. Já a IARC não tem esse elemento na sua lista de substâncias tóxicas (WHO, 2019).

3.4.8 Mercúrio (Hg)

O Hg é um metal de transição, pertencente à família 2B da tabela periódica, com número atômico igual a 80 e massa atômica igual a 200,59 u (RUSSEL, 1994). A ocorrência de Hg no ambiente é natural e pode ocorrer de 3 formas: Hg metálico (Hg elementar), Hg inorgânico e Hg orgânico. Os compostos inorgânicos ocorrem quando o Hg se liga a elementos como cloro, enxofre ou oxigênio, sendo também chamados de sais de Hg. Quando ocorre ligação do Hg com o carbono, são formados os compostos orgânicos de Hg (metilmercúrio, etilmercúrio e fenilmercúrio). As formas mais comuns encontradas no ambiente são Hg metálico, sulfeto mercúrico, cloreto mercúrico e metilmercúrio (ATSDR, 1999).

A liberação de Hg no ambiente ocorre por processos naturais como erosão e atividade vulcânica, mas também por liberação adicional de atividades antrópicas. Do Hg liberado por atividades humanas, cerca de 80% é liberado no ar, por queima de combustíveis fósseis, mineração, fundição e incineração de resíduos sólidos, 15% é liberado no solo, por fertilizantes, fungicidas e resíduos sólidos urbanos e 5% é liberado na água, por efluentes industriais. O Hg

inorgânico pode ser convertido em metilmercúrio pela ação de microrganismos (bactérias, fitoplâncton no oceano e fungos). Esse metilmercúrio pode entrar na água e no solo, permanecendo nesse local por muito tempo. Na água, o Hg se deposita no fundo, normalmente na superfície dos sedimentos. O metilmercúrio tem acumulação via cadeia trófica, enquanto o Hg inorgânico não se acumula. Os peixes de topo de cadeia alimentar podem apresentar elevados níveis de metilmercúrio. Plantas como milho, trigo e ervilhas, apresentam níveis muito baixos de Hg, mesmo quando cultivadas em solos com altos teores de Hg. Já os cogumelos, quando cultivados em solos contaminados, podem acumular altos níveis de Hg (ATSDR, 1999). 95% do metilmercúrio presente nos peixes pode ser absorvido no trato digestivo humano, já o Hg inorgânico é absorvido, em média, apenas 7%. A meia-vida do metilmercúrio no organismo humano é, em média, de 50 dias, com variação de 20 a 70 dias. No cabelo, a meia-vida é de 60 dias, com variação de 35 a 100 dias. Aproximadamente 10% da carga corpórea de metilmercúrio é encontrada no cérebro, onde lentamente ocorre sua desmetilação. O metilmercúrio é principalmente excretado pelas fezes, na forma de Hg inorgânico (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

De acordo com a IARC (WHO, 2019) e a USEPA (USEPA, 2019) o Hg e seus compostos inorgânicos não são classificáveis quanto a sua carcinogenicidade para o ser humano, pertencendo no grupo 3 da IARC e ao grupo D da USEPA. Já o metilmercúrio é classificado como possivelmente carcinogênico para humanos, tanto pela IARC (WHO, 2019) como pela USEPA (USEPA, 2019), sendo do grupo 2B para a IARC e do grupo C para a USEPA.

3.5 Avaliação ecotoxicológica

3.5.1 Biomonitoramento

O aumento das atividades antrópicas, como a industrialização, a agricultura e intensa urbanização, elevou os impactos ao meio ambiente, com contaminações severas do ar, da água e do solo (CHASIN; PEDROZO, 2003). Esses impactos são amplamente estudados pela comunidade científica, devido aos danos que podem causar na saúde humana e ao meio ambiente (HARA; MARIN-MORALES, 2017; PRIAC; BADOT; CRINI, 2017; PAMPLONA-SILVA; GONÇALVES; MARIN-MORALES, 2018; SOMMAGGIO *et al.*, 2018a; CARITÁ; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2019).

A poluição ambiental pode ter várias origens, como químicas, físicas ou biológicas. Quando os poluentes atingem os corpos d'água, eles estão sujeitos à ação de diversos fatores ambientais, tais como diluição, hidrodinâmica, gravidade, luz, temperatura, microbiota e

macrobiota, que podem alterar a composição, concentração e até mesmo a dinâmica da contaminação, devido à influência que promovem na mobilidade dos poluentes (PEREIRA, 2004). Além disso, há uma grande complexidade nas misturas que vêm sendo descartadas no ambiente, o que aumenta a necessidade de avaliação dos impactos causados aos ecossistemas e à saúde humana.

As análises físico-químicas, oferecem importantes informações sobre os compostos presentes no ambiente, mas esses dados são apenas quantitativos. Assim, para uma melhor avaliação dos impactos derivados das atividades antropogênicas, são necessários ensaios que ofereçam informações complementares, como as conferidas pelos ensaios ecotoxicológicos, pois permitem compreender a interação e/ou interferência dessas substâncias sobre os organismos expostos (FLEEGER; CARMAN; NISBET, 2003; CHEN; WHITE, 2004; PEREIRA, 2004; RANK; JENSEN; JESPERSEN, 2005; PRIAC; BADOT; CRINI, 2017).

Os estudos de biomonitoramento se tornam ainda mais importantes e necessários quando espécies nativas estão sujeitas a sofrer alterações ou danos biológicos, quando há suspeitas de consumo de organismos que possam oferecer riscos à saúde da população humana ou quando existe indicativo de alteração na qualidade de um dado ambiente (SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003).

Para uma maior eficácia nos biomonitoramentos, é necessário o uso de diferentes ferramentas de análise, que sejam capazes de ampliar informações já obtidas no estudo. Essas ferramentas são denominadas de biomarcadores e bioindicadores. Os biomarcadores, por definição, são as respostas biológicas, passíveis de serem mensuradas, que aparecem em decorrência da presença de um contaminante no ambiente, ou que infiram o possível grau de contaminação do local avaliado (WALKER *et al.*, 1996). Os bioindicadores são as espécies escolhidas para serem usadas nas avaliações, de acordo com a sensibilidade e tolerância que apresentem, frente aos poluentes a serem avaliados (WASHINGTON, 1984).

A toxicidade de um contaminante pode ter efeito agudo ou crônico sobre os organismos expostos. É considerado efeito agudo, aquele dado por respostas rápidas e mais severas dos organismos a determinados estímulos, como a letalidade e a imobilidade. Já os efeitos crônicos são respostas subletais a um estímulo, que continua atuando por um longo tempo, induzindo efeitos deletérios aos organismos, que promovem alterações na reprodução, crescimento, comportamento, longevidade, entre outros (RAND; PETROCELLI, 1985).

3.5.2 Bioindicadores de ensaios ecotoxicológicos *in vivo*

Organismos vivos atuam como “biosensores” para os ensaios ecotoxicológicos, sendo ferramentas importantes para a compreensão dos efeitos de contaminantes em determinados ambientes, assim como os possíveis impactos causados por eles (DORNFELD, *et al.*, 2001; ESPÍNDOLA; BRIGANTE; DORNFELD, 2003). Para uma maior amplitude dessa compreensão é recomendado o uso de diferentes bioindicadores.

Bioindicadores vegetais são reconhecidos e validados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como eficientes modelos para avaliação de danos genotóxicos (PALMIERI *et al.*, 2016). Os bioindicadores *Allium cepa* (LEME; MARIN-MORALES, 2009; BIANCHI *et al.*, 2016; HARA; MARIN-MORALES, 2017; PAMPLONA-SILVA; GONÇALVES; MARIN-MORALES, 2018; SOMMAGGIO *et al.*, 2018a; CARITÁ; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2019) e *Lactuca sativa* (SOBRERO; RONCO, 2004; CHARLES *et al.*, 2011; BAGUR-GONZÁLEZ *et al.*, 2011; PRIAC; BADOT; CRINI, 2017) têm sido muito utilizados em avaliações de impactos ambientais.

A espécie *A. cepa* é considerada vantajosa, para uso em bioensaios, por apresentar respostas rápidas (SMAKA-KINCL *et al.*, 1996) e por possuir células meristemáticas homogêneas, com cromossomos grandes e em número reduzido ($2n=16$) (FISKESJÖ, 1985), características estas que facilitam o processo de coloração e propicia uma melhor análise dos danos cromossômicos e das alterações na divisão celular (KURAS *et al.*, 2006; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Além disso, *A. cepa* tem apresentado alta correlação com outros ensaios, como os realizados com mamíferos (CHAUHAN; SAXENA; GUPTA, 1999; RANK; NIELSEN, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 2003). Fiskesjö (1985), ainda descreve outras vantagens para essa espécie, como rápido crescimento das raízes, grande número de células em divisão, alta tolerância a diversas condições de cultivo, disponibilidade durante o ano todo e facilidade no manuseio. De acordo com vários estudos realizados, os ensaios realizados com *A. cepa* têm se mostrado muito eficientes para avaliar parâmetros como citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de amostras ambientais (BIANCHI; ESPINDOLA; MARIN-MORALES, 2011; NUNES *et al.*, 2011; HERRERO *et al.*, 2012; MAZZEO *et al.*, 2015; HARA; MARIN-MORALES, 2017; SOMMAGGIO *et al.*, 2018a; CARITÁ; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2019).

Bioensaios com *L. sativa* são considerados ensaios simples, rápidos e sensíveis para avaliação de impactos ambientais (GOPALAN, 1999). Os ensaios de fitotoxicidade com este organismo-teste são vantajosos por serem muito reprodutíveis, de baixo custo, de rápida germinação e não necessitarem de grandes volumes de amostras, uma vez que pequenos

volumes são necessários para o desenvolvimento dos ensaios (PRIAC; BADOT; CRINI, 2017). Os efeitos de fitotoxicidade de determinados contaminantes são avaliados pelas variações no índice de germinação das sementes e pelo potencial de desenvolvimento das plântulas, nos primeiros 5 dias de crescimento (BAGUR-GONZALEZ, 2011). De acordo com Sobrero e Ronco (2004), o período de germinação é uma etapa de grande sensibilidade a contaminantes ou fatores extrínsecos ao organismo, enquanto que a avaliação da elongação da raiz e hipocótilo permite a observação dos efeitos tóxicos de contaminantes em concentrações muito baixas, não observáveis no teste de germinação. Esses dois testes, quando desenvolvidos concomitantemente, constituem marcadores complementares de fitotoxicidade. Os bioensaios com *L. sativa* vêm sendo indicados pela *U.S. Environmental Protection Agency* (USEPA, 1996) e outros órgãos reguladores (ISO, 2004; OECD, 2003) para avaliação de efeitos de diferentes substâncias.

3.5.3 Bioindicadores de ensaios ecotoxicológicos *in vitro*

Os modelos *in vitro*, desenvolvidos com cultura celular de mamíferos, têm sido considerados vantajosos devido à organização do material genético dessas células ser semelhante à das células *in vivo*; pela facilidade na padronização das condições dos ensaios (RABELLO-GAY, 1991); por serem de grande reprodutibilidade; alta sensibilidade; relativamente rápidos; e financeiramente acessíveis (ROGERO *et al.*, 2003). Também possuem a vantagem de necessitarem de pequenas quantidades de amostras nos testes e por evitar o sacrifício de animais (CARVALHO, 1996), não esbarrando, desta forma, nas questões de ética de pesquisa.

Segundo Mazzeo *et al.* (2013), as linhagens celulares de mamíferos têm sido amplamente utilizadas em avaliações de potencial genotóxico e mutagênico de poluentes ambientais. O ensaio do MN com bloqueio de citocinese é um teste validado e padronizado para uso em estudos de toxicologia (VRAL; FENECH; THIERENS, 2011). Os MNs podem ser avaliados em diferentes tipos celulares (FENECH, 2000) e são indicadores de instabilidade genômica e danos cromossômicos (LAJMANOVICH *et al.*, 2014). Esse ensaio vem sendo utilizado em avaliações do potencial genotóxico e mutagênico de amostras ambientais (BOETTCHER *et al.*, 2010; BIANCHI; CABRAL-DE-MELLO; MARIN-MORALES, 2015; MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2016; HARA; MARIN-MORALES, 2017; SOMMAGGIO *et al.*, 2018b). Outra ferramenta muito utilizada para avaliar o potencial genotóxico de amostras ambientais é o ensaio do cometa (KAMER; RINKEVICH, 2002; BOETTCHER *et al.*, 2010; MANZANO *et al.*, 2015; BIANCHI; CABRAL-DE-MELLO;

MARIN-MORALES, 2015). De acordo com Singh *et al.* (1988), o ensaio do cometa permite a análise de danos no DNA (quebras em fita simples, quebras na dupla fita e sítios álcali lábeis) em células individualizadas. Um outro parâmetro que pode ser avaliado por células mantidas em cultura é o de citotoxicidade, utilizado para verificar a ação de um contaminante sobre a viabilidade celular. O teste de viabilidade celular muitas vezes é também utilizado como teste preliminar, que serve de indicativo para a seleção das concentrações da substância ou da amostra investigada que permitam uma porcentagem suficiente de células (80%), necessárias para dar seguimento a outros ensaios (genotoxicidade e mutagenicidade) com a cultura celular (KOMISSAROVA; SAHA; ROSSMAN, 2005). Diversos autores têm utilizado esse biomarcador para monitorar a qualidade ambiental (LEME *et al.*, 2011; BIANCHI; CABRAL-DE-MELLO; MARIN-MORALES, 2015; SUARES-ROCHA *et al.*, 2015; MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2016; SOMMAGGIO *et al.*, 2018b).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material biológico

4.1.1 Sementes de *Allium cepa* e *Lactuca sativa*

Foram desenvolvidos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade com sementes de *Allium cepa* (variedade Baia Periforme) e de fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa*, variedade crespa Grand Rapids. Foram utilizadas sementes isentas de defensivos, obtidas junto à empresa “Isla Sementes Ltda[®]”.

4.1.2 Cultura de células humanas

Foram obtidas, junto ao *Banco de Células do Rio de Janeiro* (BCRJ), células de hepatoma humano HepG2/C3A (BCRJ: 0291), que é um clone derivado das células HepG2 (BCRJ: 0103), que foram mantidas em cultura no Laboratório de Mutagênese Ambiental do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro, para a realização dos bioensaios de avaliação de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de amostras ambientais de águas e sedimentos, coletadas em um região sobre a influência de uma mineradora de ouro de Minas Gerais.

4.2 Amostras ambientais

Foram coletadas, no ano de 2016 (inverno), amostras de água e sedimento de diferentes pontos de rios do entorno das atividades da mina Morro do Ouro, localizada no município de Paracatu-MG (Figura 1). As amostras foram coletadas no inverno, por ser uma estação seca, sendo um período mais crítico para avaliação de corpos d’água para o abastecimento público. Os pontos P1, P2 e P3 correspondem a pontos de coletas do córrego Rico, cuja nascente se encontra dentro da área da mineradora. Os pontos P4, P5 e P6 estão localizados na região em que se encontra a barragem de rejeitos da mineradora (barragem Santo Antônio). O ponto 4 refere-se ao córrego Santo Antônio, o P5 ao ribeirão Santa Rita e o P6 ao ribeirão São Pedro. O ponto P7 está localizado no ribeirão Santa Isabel, que é utilizado para a captação de água de abastecimento público do município de Paracatu. O P8, que foi coletado dentro do município, especificamente no cavalete do consumidor, para obtenção de amostra da água fornecida à população para consumo. O esquema representativo dos pontos de coleta deste estudo está apresentado na Figura 2 e descrito na Tabela 1.

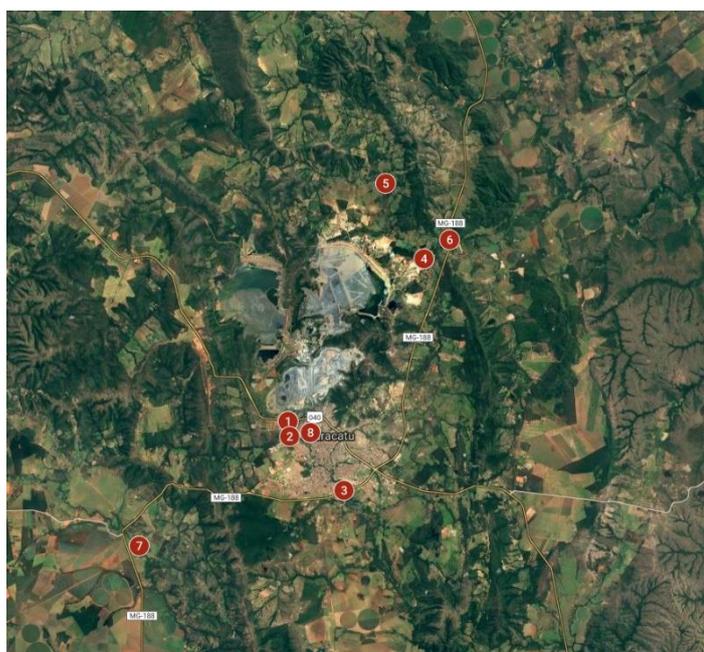
A água e o sedimento dos rios foram coletados por meio de amostragem composta. As amostras de água superficial foram coletadas com o auxílio de um balde e as amostras de

sedimento, com o auxílio de um pegador de Ekman-Birge. Após a coleta, as amostras de água foram fixadas com ácido acético (2%), para inibição das atividades microbiológicas, nos frascos de análise biológica e com ácido nítrico (2%) nos frascos de análise química. Para acondicionamento destas amostras, foram utilizados frascos e embalagens de polietileno de alta densidade (Figura 3), que são atóxicos e inertes, uma vez que vidros e metais não são indicados para amostras contendo metais (ANA; CETESB, 2011). Tanto as amostras de água quanto as de sedimento foram mantidas refrigeradas, durante o transporte, e armazenadas, a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, no Laboratório de Mutagênese Ambiental na Unesp, Rio Claro, até o momento das análises.

Figura 1. Localização do município de Paracatu-MG (latitude $17^{\circ}13'20''$ S, longitude $46^{\circ}52'29''$ W).



Figura 2. Pontos de coleta das amostras de águas e sedimentos (Paracatu-MG).



1- (P1), 2- (P2) e 3- (P3) - Córrego Rico; 4- (P4) - Córrego Santo Antônio; 5- (P5) - Ribeirão Santa Rita; 6- (P6) - Ribeirão São Pedro; 7- (P7) - Ribeirão Santa Isabel; 8- (P8) - Água de abastecimento público.
Fonte: Adaptado de Google My Maps

Tabela1. Descrição dos pontos de coleta das amostras de água e de sedimento de rios sob a influência de atividade de mineração de ouro da região de Paracatu-MG.

Pontos	Recursos hídricos	Localização	Coordenadas (UTM)			Tipo
			Fuso	X	Y	
P1	Córrego Rico	A jusante da mineradora e a montante da confluência com o Córrego Espalha	23 K	298912	8096066	Arenoso
P2	Córrego Rico	A jusante da confluência com o Córrego Espalha e a montante do perímetro urbano (Paracatu)	23 K	298976	8095370	Arenoso
P3	Córrego Rico	Ao final do perímetro urbano (Paracatu)	23 K	301513	8092911	Arenoso
P4	Córrego Santo Antônio	A jusante da barragem de rejeitos	23 K	305055	8103539	Argiloso
P5	Ribeirão Santa Rita	Antes da confluência com o Córrego São Domingos	23 K	303276	8106996	Argiloso
P6	Ribeirão São Pedro	Após receber contribuições do ribeirão Santa Rita e do Córrego Santo Antônio	23 K	306214	8104425	Argiloso
P7	Ribeirão Santa Isabel	Antes da captação da ETA (COPASA)	23 K	292183	8090285	Argiloso
P8	-	Água de abastecimento público - cavalete do consumidor	23 K	299936	8095537	-

Figura 3. Aspecto geral do ambiente de coleta e amostras de água e sedimento (Paracatu-MG).

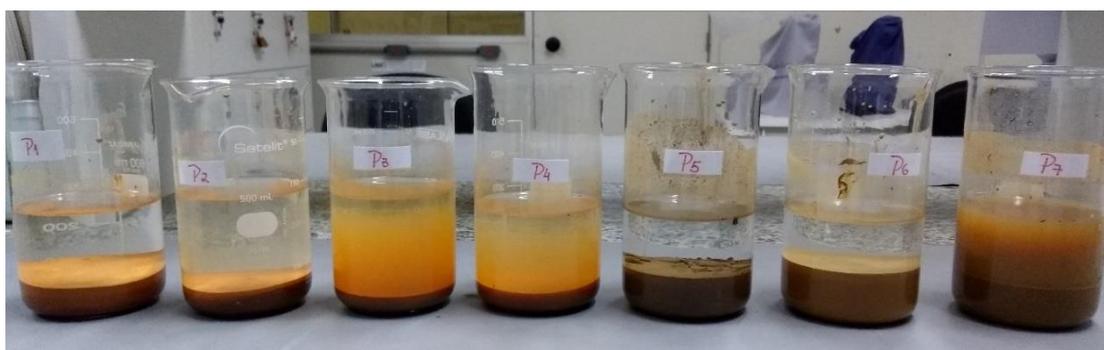


A - Vista da mina Morro do Ouro; B - Acondicionamento das amostras de sedimentos coletadas; C - Acondicionamento das amostras de águas coletadas. Fonte: Próprio autor.

4.2.1 Solubilizado

O extrato solubilizado de cada amostra de sedimento foi obtido conforme procedimentos indicados na norma NBR 10006 da ABNT (2004a). Foram dissolvidos 62,5 g da amostra de sedimentos (peso seco) em 250 mL de água ultrapura, seguido de agitação em baixa velocidade (neste estudo foi utilizada a velocidade 2, do agitador Marconi, Modelo MA 039), por 5 minutos. Em seguida, os béqueres contendo as amostras foram cobertos com filme PVC e colocados em repouso, por 7 dias, em incubadora BOD ($22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$), para decantação (Figura 4). Após esse período, foi coletada a fase líquida de cada uma das amostras, e posteriormente filtrada em membrana de $0,45\text{ }\mu\text{m}$. Os extratos obtidos foram então armazenados em geladeira (4 °C), até seu uso nos bioensaios.

Figura 4. Amostras de sedimento (solubilizado), após o período de decantação.



Fonte: Próprio autor

4.2.2 Lixiviado

Para obtenção do extrato lixiviado das amostras de sedimento, foi utilizada a metodologia proposta pela norma NBR 10005 da ABNT (2004b), com adaptações. De acordo com os cálculos requeridos na metodologia, foram determinadas a porcentagem de sólidos (acima de 0,5% de sólidos) e a solução de extração a ser utilizada, denominada de solução de extração 1 (contendo ácido acético e NaOH, pH $4,93 \pm 0,05$). Todas as amostras de sedimento foram filtradas em filtro de fibra de vidro ($0,6 \mu\text{m}$) e transferidas para os frascos de lixiviação, onde foi adicionada a solução de extração 1, mantendo a seguinte proporção: massa de solução de extração = 20 x massa da fase sólida.

Os frascos de lixiviação foram fechados e mantidos sob agitação em mesa agitadora (Marconi, MA 139), velocidade 3, temperatura ambiente ($24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), por um período de 18 horas. Em seguida, as amostras foram filtradas em filtro de fibra de vidro de $0,6 \mu\text{m}$, para a obtenção do extrato lixiviado. Esses extratos foram armazenados em geladeira ($4 \text{ }^\circ\text{C}$), para uso posterior nos bioensaios.

4.3 Análises químicas e físico-químicas

4.3.1 Análises químicas

O procedimento de digestão total para quantificação do teor total dos elementos traço foi realizado com as amostras de sedimento e com o material de referência, certificado SRM 1944, conforme o método USEPA 3051A modificado, utilizando 0,150 g de amostra seca dos sedimentos, associados a 3 mL de HNO_3 e 1 mL de HCl glacial. A digestão ocorreu por aquecimento em micro-ondas (Berghof SpeedWave 4). O aquecimento utilizado para a digestão foi feito em uma rampa de aquecimento de 2 etapas. Etapa 1 (aquecimento): pressão 50 bar, potência 80%, temperatura $175 \text{ }^\circ\text{C}$, por 10 min. Etapa 2 (resfriamento): pressão 0 bar, temperatura $50 \text{ }^\circ\text{C}$, por 20 min.

Para as determinações multi elementares de alumínio (Al), arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), escândio (Sc), ferro (Fe), manganês (Mn) e mercúrio (Hg) nas amostras de água e de sedimento, foi utilizada a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES – iCAP 6000 Series ICP Spectrometer, Thermo Scientific), equipado com um nebulizador V-groove (Glass Expansion, AUS) e câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, AUS). O sistema ICP-OES foi operado, de acordo com as condições: potência aplicada 1150 W; vazão do gás do plasma 10 L min^{-1} ; vazão do gás auxiliar $0,5 \text{ L min}^{-1}$; vazão do gás de nebulização $0,75 \text{ L min}^{-1}$; vazão de introdução da amostra $3,0 \text{ mL min}^{-1}$. Foram empregadas as linhas espectrais para as determinações de Al (396,1 nm), As

(189,0 nm), Cd (226,5 nm), Cu (324,7 nm), Fe (259,9 nm), Hg (184,9 nm), Mn (257,6 nm), Pb (220,3 nm) e Sc (361,3 nm). Todas as análises químicas foram realizadas no Centro de Estudos Ambientais (CEA/UNESP- Campus de Rio Claro).

4.3.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas de temperatura, pH, potencial de oxirredução (ORP), condutividade, turbidez, oxigênio dissolvido (OD), sólidos totais dissolvidos (TDS) e salinidade das amostras de água foram realizadas, *in situ*, no momento da coleta, com sonda multiparâmetro Horiba (Multi Water Quality Chequer U-50 Series).

4.4 Extração sequencial

A distribuição dos metais presentes nas amostras de sedimento foi avaliada pelo método de extração sequencial, proposto por Mortatti *et al.* (2013). Neste método, uma alíquota de 1g de cada amostra de sedimento passou por quatro etapas de extração sequencial, conforme descritas a seguir e resumidas na Tabela 2.

Fase 1 (F1) – Fração solúvel e trocável: Nesta fase, foram adicionados 10 mL de nitrato de magnésio ($Mg(NO_3)_2$) a 0,5 M, pH 5,0, em tubos Falcon contendo as amostras de sedimento. Em seguida, os tubos foram submetidos a agitação, por 2 horas, a 25 °C.

Procedimento intermediário entre as fases 1 e 2: Após a agitação, os tubos foram centrifugados por 30 min a 3.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo Falcon (tubo para análise), a amostra residual do tubo foi misturada com 10 mL de água Mili-Q e agitada para homogeneização. Os tubos foram centrifugados novamente, por 15 min a 3.000 rpm e o sobrenadante transferido para o tubo de análise. Os tubos de análise tiveram seu volume completado para 50 mL, com água mili-Q, e mantidos sob refrigeração (4 °C), até a realização das análises químicas, para a determinação dos metais. Os tubos contendo a amostra residual, foram deixados em estufa ventilada (40 °C) *overnight*.

Fase 2 (F2) – Fração ligada a carbonatos: 10 mL de acetato de sódio (NaOAc) 1,0 M, pH 4,5 foram adicionados aos tubos de amostra residual, obtidos na F1. Essa suspensão foi colocada em agitação por 5 horas, a 25 °C. Em seguida, foi realizado, novamente, o procedimento intermediário descrito anteriormente.

Fase 3 (F3) – Fração ligada aos óxidos de Fe e Mn: foi adicionado 10 mL de cloridrato de hidroxilamônio (NH₂OH.HCl) 0,04 M em ácido acético 25% (v/v) aos tubos de amostra residual da F2. Em seguida, a suspensão foi colocada em agitação, por 5 horas, a 85 °C. Decorrido esse tempo, foi realizado novo procedimento intermediário, conforme já descrito anteriormente.

Fase 4 (F4) – Fração ligada à matéria orgânica: foram adicionados 3 mL de ácido nítrico (HNO₃) 0,02 M e 8 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 35% aos tubos de amostra residual da F3. A suspensão dos tubos foi colocada em agitação por 5 horas, a 85 °C. Após a agitação, os tubos passaram por processo de resfriamento, por 30 min a 25 °C. Em seguida, foram adicionados aos tubos, 20 mL de acetato de amônio (NH₄Ac) 0,85 M em HNO₃ a 5% (v/v). Os tubos foram colocados em agitação por 30 min, a 25 °C. Posteriormente, foram seguidos os passos do procedimento intermediário, citado nas etapas anteriores.

Todos os tubos foram acidificados com HNO₃ (pH ± 2,0).

Tabela 2. Procedimentos para a extração sequencial realizada nos sedimentos de rios sob a influência de atividade de mineração de ouro da região de Paracatu-MG.

Fase	Extrator	Agitação (horas)	Temperatura (°C)
F1	10 ml Mg (NO ₃) ₂ 0,5 M	2	25
F2	10 ml NaOAc 1 M	5	25
F3	10 ml NH ₂ OH.HCl 0,4 M em 25% HOAc	5	85
	3 ml HNO ₃ 0,02 M + 8 ml H ₂ O ₂ (35%)	5	85
F4	Esfriar por 30 min		
	20 ml NH ₄ OAc 0,85 M em 5% HNO ₃	0,5	25

4.4.1 Análise da origem, do grau de contaminação e dos riscos da poluição

Após as análises químicas, foram realizados os cálculos para definição do fator de enriquecimento (*Enrichment Factor* - EF) das amostras coletadas. Os valores obtidos foram comparados com um *background* geoquímico natural, para estimar as áreas e identificar a origem dos elementos traço, bem como outros possíveis contaminantes (HARIKUMAR; JISHA, 2010; ZHANG; LIU, 2002; MILLER *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2016). Neste estudo, optou-se por utilizar como valores de referência geoquímica uma média entre os pontos P5 (ribeirão Santa Rita) e P7 (ribeirão Santa Isabel), por estes representarem características dos compartimentos geoquímicos da região e por não estarem contaminados por nenhum tipo de atividade da mineradora.

Para o cálculo do EF, foi utilizado o escândio (Sc) como elemento normalizador, por esse elemento apresentar um comportamento conservador ao longo do tempo. O EF foi calculado de acordo com a equação:

$$EF = \frac{(Mi/Sc)_{amostra}}{(Mi/Sc)_{referência}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: $(Mi/Sc)_{amostra}$ = razão entre a concentração do metal de interesse (Mi) e o Sc na amostra; $(Mi/Sc)_{referência}$ = razão entre a concentração do metal de interesse (Mi); Sc = elemento de referência (*background* geoquímico).

Para avaliar o grau de contaminação dos metais estudados, foi utilizado o Índice de geoacumulação (Igeo), de acordo com a equação de Müller (1979):

$$Igeo = \log_2([M]_{sed}/1,5[M]_{background}) \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: $[M]_{sed}$ = concentração do metal nos sedimentos coletados; e $[M]_{background}$ = concentração do mesmo metal M no *background* geoquímico de referência.

Também foi calculado o Código de Avaliação de Risco – *Risk Assessment Code* (RAC), de acordo com Perin (1985), considerando as frações que estão na fase trocável e ligada aos carbonatos, uma vez que estas são mais facilmente remobilizadas para o meio aquático. Foi utilizada a equação:

$$RAC = \left(\frac{[M]_{F1} + [M]_{F2}}{[M]_{total}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: $[M]_{F1}$ = concentração do metal de interesse na fase F1 (Fração solúvel e trocável); $[M]_{F2}$ = concentração do metal de interesse na fase F2 (Fração ligada aos carbonatos); e $[M]_{total}$ = concentração total do metal de interesse (F1+F2+F3+F4+Residual).

4.5 Bioensaios com *Allium cepa*

4.5.1 Exposição às amostras de água

Sementes de *A. cepa* foram dispostas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, forradas com papel de filtro, contendo 5 mL das diferentes amostras de água coletadas (P1 até P8). As

amostras de água para essa exposição foram diluídas (água do ponto – água ultrapura 1:2 -v/v), para se obter taxa de germinação e crescimento suficientes para continuidade do ensaio. Os tratamentos controles foram realizados em água ultrapura, para o controle negativo (CN), e em 10 mg/L de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3), para o controle positivo (CP).

4.5.2 Exposição às amostras de sedimento

Sementes de *A. cepa* foram dispostas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 50 g de sedimento bruto (*in natura*) das diferentes amostras coletadas (P1 até P7) e água (ultrapura), suficiente para atingir a capacidade de retenção de água nos sedimentos. Os controles foram realizados com areia e água ultrapura, para o CN, e em 10 mg/L de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3), para o CP. A areia utilizada nos controles foi previamente lavada em 3 banhos de água ultrapura, seguida de autoclavagem e secada em estufa (60 °C).

Os dois bioensaios foram realizados em triplicata, contendo 100 sementes em cada placa. As placas foram mantidas por 5 dias em incubadora BOD (22 °C ± 1 °C), com fotoperíodo de 12 horas. As radículas, com aproximadamente 2,0 cm de comprimento, foram coletadas e em seguida, fixadas em solução de Carnoy (etanol - ácido acético 3:1 - v/v), por 6 a 18 h em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, o fixador foi substituído por nova solução do fixador recém preparada. As raízes fixadas foram armazenadas em geladeira, a 4 °C, até a sua utilização na confecção das lâminas, para avaliação de alterações cromossômicas e nucleares (ACN) e de micronúcleo (MN).

4.5.3 Ensaio de ACN e Teste do MN em células meristemáticas

O teste de ACN e MN em células meristemáticas de radículas de *A. cepa* foi realizado de acordo com o protocolo de Grant (1982), com algumas modificações. As radículas fixadas foram submetidas à hidrólise e coloração em reativo de Schiff, por 2 horas. Para confecção das lâminas, os meristemas foram colocados em lâminas contendo uma gota de carmim acético (2%), recobertos com lamínulas e suavemente esmagados. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas permanentes foram montadas com resina sintética, para posterior análise.

Para a análise dos efeitos citotóxicos, foram avaliados os índices mitóticos (IM) e índices de morte celular (IMC). Para o *endpoint* de morte celular, foram consideradas as células

com núcleos deslocados para a periferia celular, células com citoplasma vacuolizado e células com núcleos irregulares. O IM e o IMC foram calculados de acordo com as equações:

$$\text{IM} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células em divisão celular}}{\text{Total de células observadas}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{IMC} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células em processo de morte celular}}{\text{Total de células observadas}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Para a análise da genotoxicidade, foram considerados diversos tipos de alterações cromossômicas (AC) e anormalidades nucleares (AN) (perdas, pontes, aderências cromossômicas, brotos nucleares, células binucleadas, entre outros) nas diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), que constituíram o índice de genotoxicidade (IGen). Já para o *endpoint* de mutagenicidade, foram consideradas as quebras cromossômicas e a presença de MN, que constituíram o índice de mutagenicidade (IMut). Para cálculo do IGen e do IMut, foram utilizadas as equações:

$$\text{IGen} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células com AC e AN}}{\text{Total de células observadas}} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

$$\text{IMut} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células com MN e quebras}}{\text{Total de células observadas}} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

A análise dos parâmetros acima citados (IM, IMC, IGen e IMut), foi realizada pela contagem de cerca de 6000 células para cada tratamento, sendo 500 células por lâmina, em um total de 12 lâminas analisadas (4 lâminas por réplica). Para as análises estatísticas, os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk, para normalidade, e Levene, para homogeneidade. Em seguida, foi selecionado o teste mais apropriado para cada análise.

4.6 Bioensaios com *Lactuca sativa*

Todos os bioensaios com *L. sativa* foram realizados em triplicata, contendo 20 sementes em cada placa. As placas foram mantidas em incubadora BOD (22 °C ± 1 °C), sem fotoperíodo, por 120 horas.

4.6.1 Exposição às amostras de água

Sementes de *L. sativa* foram dispostas em placas de Petri de 7 cm de diâmetro, forradas com papel de filtro, contendo 3 mL das diferentes amostras de água coletadas (P1 até P8). As amostras de água para essa exposição foram diluídas em água ultrapura, na proporção de 1:6 (amostras: água ultrapura) para obtenção de germinação de todas as amostras para continuidade do ensaio. Os tratamentos controles foram realizados em água ultrapura, para o CN, e com sulfato de zinco heptahidratado (0,05 M) de acordo com Lopes (2014), para o CP.

4.6.2 Exposição às amostras de sedimento

Sementes de *L. sativa* foram dispostas em placas de Petri de 7 cm de diâmetro, contendo 30 g de sedimento bruto das diferentes amostras coletadas (P1 até P7) e água (ultrapura), suficiente para atingir a capacidade de retenção de água nos sedimentos. Os tratamentos controles foram realizados com areia e água ultrapura, para o CN, e com areia e sulfato de zinco heptahidratado (0,05 M), para o CP.

4.6.3 Exposição às amostras de sedimento (extratos: solubilizado e lixiviado)

Sementes de *L. sativa* foram dispostas em placas de Petri de 7 cm de diâmetro, forradas com papel de filtro contendo 3 mL das diferentes amostras de extratos de sedimento (solubilizado e lixiviado). As amostras dos extratos dos sedimentos (lixiviado) foram diluídas em água ultrapura, na proporção de 1:11 - v/v, que possibilitou melhor crescimento radicular e menor indução de necrose na região meristemática das raízes. Os tratamentos controles foram realizados com água ultrapura, para o controle negativo (CN), e com sulfato de zinco heptahidratado (0,05 M) (LOPES, 2014), para o CP. Para a exposição com o sedimento (lixiviado), foi realizado também um controle da solução de extração ($C_{\text{solução}}$), contendo a mesma solução utilizada para o ensaio de lixiviação dos sedimentos.

4.6.4 Ensaio de germinação e de desenvolvimento das sementes

Após o período de exposição, foram quantificadas as sementes que germinaram em cada placa, cujos valores obtidos foram utilizados para o cálculo da porcentagem de germinação (% G), pela equação:

$$\%G = \frac{\text{Total de sementes germinadas}}{\text{Total de sementes na placa}} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

Posteriormente, as sementes germinadas, tiveram suas raízes e hipocótilos mensurados com paquímetro digital. Foram calculadas as médias dos comprimentos das raízes e dos hipocótilos, para cada triplicata, e os resultados foram comparados, estatisticamente, com o controle, para análise do crescimento.

Para as análises estatísticas, os dados foram submetidos aos Testes de Shapiro-Wilk, para normalidade e Levene, para homogeneidade. Em seguida, foi selecionado o teste mais apropriado, para cada análise: %G e crescimento (raiz e hipocótilo).

4.7 Bioensaios com células HepG2/C3A

4.7.1 Cultivo das células

Para a realização dos experimentos com a linhagem HepG2/C3A, as células foram descongeladas e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, 3 g de glicose, 1,2 g de bicarbonato de sódio e 1 mL de antibiótico (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 0,1 mg/mL). Os frascos contendo as células foram mantidos em estufa de CO₂, a 37 °C, por um período de, pelo menos, 2 repiques, para fins de estabilização celular. Os repiques para confecção dos frascos foram realizados lavando-se os frascos duas vezes com PBS, tripsinizados com 0,5 mL de Tripisina-EDTA (0,5%), por 5 minutos, a 37 °C e posterior inativação com 1,5 mL de meio DMEM suplementado. Na sequência, as células foram passadas em seringa estéril de 1 mL, para dissociação das mesmas. Após a confluência das células nos frascos repicados, foram realizados novos repiques. As células foram transferidas dos frascos para as placas de 6 poços, para realização do teste de viabilidade celular; e para novos frascos (pré-frascos) para os ensaios do cometa e do MN, em que cada um recebeu a quantidade de células necessária para a realização do experimento correspondente. Para o teste de viabilidade celular (Azul de Tripán), foram utilizadas aproximadamente 5x10⁵ células por poço, para o ensaio do cometa 5x10⁵ células por pré-frasco e para o ensaio do MN, 1x10⁶ células por pré-frasco. Estas células foram mantidas a 37 °C em estufa de CO₂, por 24h, para estabilização das condições. Esse período corresponde a 1 ciclo de divisão celular e ao tempo necessário para que as células possam se aderir ao poço ou frasco. Em seguida, as células foram expostas aos tratamentos.

4.7.2 Exposição às amostras

Após o período de estabilização, o meio contido nos frascos/placas foi descartado e substituído por um novo meio de cultura suplementado (ensaio do cometa e MN) e não suplementado (teste de viabilidade celular), contendo as amostras.

Para o teste de viabilidade celular, foram realizados dois diferentes ensaios com as amostras de sedimento, um com o extrato solubilizado e outro com o extrato lixiviado, nas concentrações de 200 e 400 $\mu\text{L}/\text{mL}$. A concentração inicial de 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ equivale a 20% do volume total do poço/frasco de cultura, condição essa em que não ocorre indução de efeitos citotóxicos e /ou genotóxicos em decorrência da mudança de osmolaridade (REIFFERSCHIED *et al.*, 2008; HARA; MARIN-MORALES, 2017). O CN foi realizado com meio de cultura sem soro e PBS; o C_{solução} com meio de cultura sem soro + a solução de extração do lixiviado, nas concentrações de 200 e 400 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e o CP com Triton X-100 (diluído em meio de cultura sem soro – solução a 1%). Os ensaios foram realizados em duplicata e, após o período de exposição de 3 horas, as células foram coletadas e utilizadas no teste de viabilidade celular.

Para os ensaios do cometa e do MN, foram realizados dois tipos de exposições, uma com as amostras de água e outra com as amostras de sedimento (solubilizado), ambas na concentração de 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Os controles foram preparados da seguinte forma: controle negativo (CN), contendo meio DMEM suplementado e PBS (200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e controle positivo (CP), contendo meio DMEM suplementado e MMS (4×10^{-2} M). Os ensaios foram realizados em triplicata. Após o período de exposição por 3 horas, as células foram submetidas ao ensaio do cometa e ao ensaio do MN com bloqueio de citocinese.

Todas as amostras utilizadas nos bioensaios de cultura celular foram previamente filtradas em membrana estéril de 0,22 μm .

4.7.3 Viabilidade celular – Teste de exclusão do corante Azul de Tripán

Para análise da viabilidade celular, as células foram coletadas e transferidas para tubos tipo Falcon. Em seguida, a solução celular foi homogeneizada para retirada de 20 μL , que foram misturados com 20 μL de Azul de Tripán (0,4%, GIBCO, Cat. Nº 15250-061). A contagem das células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer, em microscopia de luz (aumento de 400x). O teste foi realizado em duplicata e os dados obtidos foram, posteriormente, transformados em porcentagem, para a obtenção do percentual de viabilidade de cada concentração testada.

Para as análises estatísticas, esses dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk, para normalidade, e Levene, para homogeneidade. Em seguida, foi selecionado o teste mais apropriado para a análise.

4.7.4 Ensaio do cometa

Após o tempo de exposição aos tratamentos, a suspensão celular obtida foi coletada e transferida para tubos tipo Falcon, para centrifugação por 5 minutos a 1.500 rpm. Em seguida,

o sobrenadante foi retirado e a suspensão, homogeneizada. Após a homogeneização, a suspensão foi transferida para outros tubos, por meio de uma seringa de insulina de 1 mL, para obtenção de células isoladas. Foi realizado com esse material o ensaio de viabilidade celular (Azul de Tripán), considerando viabilidade maior que 80%, para continuidade do teste.

Para o ensaio do cometa, as lâminas pré-gelatinizadas foram montadas com 20 µL da suspensão celular e 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão, a 37 °C. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, aproximadamente 8 g de NaOH sólido para 1 L, pH 10) e mantidas no escuro, a 4 °C (em geladeira), por 1 hora. Em seguida, as lâminas foram dispostas em uma cuba de eletroforese, contendo uma solução tampão (NaOH 10 N + EDTA 200 mM, pH>13), por 20 minutos, para a deslicoidização do DNA. A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 39 V e 300 mA (~ 0,8 V/cm). Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas, por 15 minutos, em tampão de neutralização (pH 7,2). Em seguida, as lâminas foram dispostas para secagem e posterior fixação com etanol absoluto, por 10 minutos. As lâminas foram coradas com 50 µL de solução de GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1 M, e 45 mL de água destilada), no momento da realização das análises microscópicas.

Foram analisados 50 nucleóides por lâmina (WIKLUND; AGURELL, 2003; LOVEL; OMORI, 2008; REISINGER *et al.*, 2018), totalizando 300 nucleóides por tratamento, em microscópio de epifluorescência (Leica, modelo 4000B). Os nucleóides foram avaliados por meio do *software Comet Assay IV*, sendo considerado o parâmetro de momento da cauda de Olive, de acordo com a OECD - 489 (2014a).

Para as análises estatísticas, foram consideradas as médias dos valores de momento da cauda de Olive para cada lâmina, em comparação com as médias do CN. Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk, para normalidade, e Levene, para homogeneidade. Em seguida, foi selecionado o teste mais apropriado para a análise.

4.7.5 Ensaio do MN com bloqueio de citocinese

Após o período de exposição, o meio de cultura foi substituído por outro, contendo 3 µg/mL de citocalasina B. Esses frascos foram incubados, por 30 horas, a 37 °C, em estufa de CO₂, para obtenção de células binucleadas. Decorrido este tempo, as células foram coletadas, tratadas com solução hipotônica fria de citrato de sódio (0,01%) e centrifugadas (1.500 rpm por 5 minutos). Após descarte do sobrenadante, foram adicionados ao pellet a solução fixadora de

Carnoy (metanol-ácido acético 3:1, v/v) e 2 gotas de formaldeído. Os tubos foram mantidos em geladeira (-6 °C), até o momento da confecção das lâminas.

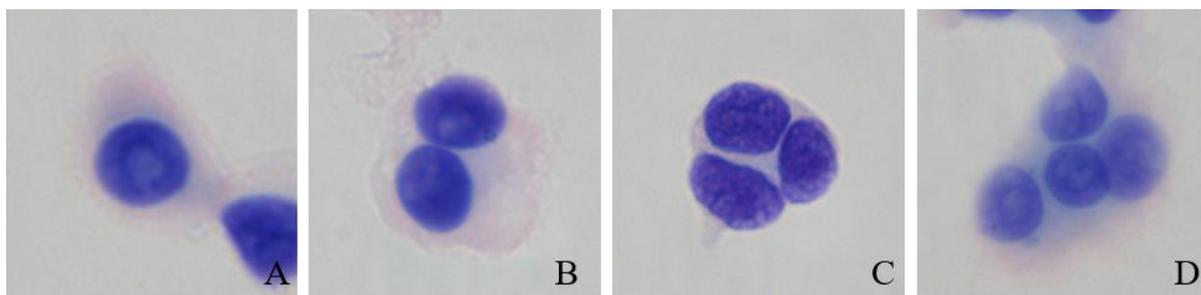
Para confecção das lâminas, elas foram previamente lavadas com Extran, abundantemente enxaguadas e mantidas em água ultrapura a 4 °C. A suspensão celular obtida dos tratamentos foi gotejada sobre as lâminas contendo um filme de água e, em seguida, foram dispostas para secagem em temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com reagente de Schiff, por 2 horas, seguida de coloração com Giemsa 5%, por 5 minutos.

Para avaliação da presença de pontes nucleoplasmáticas, brotos e MNs, foram analisadas, em microscopia de luz (aumento de 1.000x), 1.000 células binucleadas por lâmina, sendo 2 lâminas por frasco, totalizando 6.000 células por tratamento, conforme proposto por Fenech (2007). Também foi quantificado o índice de proliferação por bloqueio de citocinese (CBPI) (Figura 5), de acordo com a OECD - 487 (2014b). Para o cálculo do CBPI, foram analisadas 500 células por lâmina e em seguida, utilizada a equação:

$$\text{CBPI} = \frac{N1 + (2 \times N2) + (3 \times N3) + (4 \times N4)}{\text{Total de células}} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde: N1 é o número de células com 1 núcleo; N2 é o número de células com 2 núcleos; N3 é o número de células com 3 núcleos e N4 é o número de células com 4 núcleos ou mais.

Figura 5. Células HepG2/C3A utilizadas para o cálculo do Índice de proliferação por bloqueio de citocinese (CBPI).



A - Célula com um núcleo; B - Célula com dois núcleos; C - Célula com três núcleos; D - Célula com quatro núcleos. Aumento: 1.000 x. Fonte: Próprio autor.

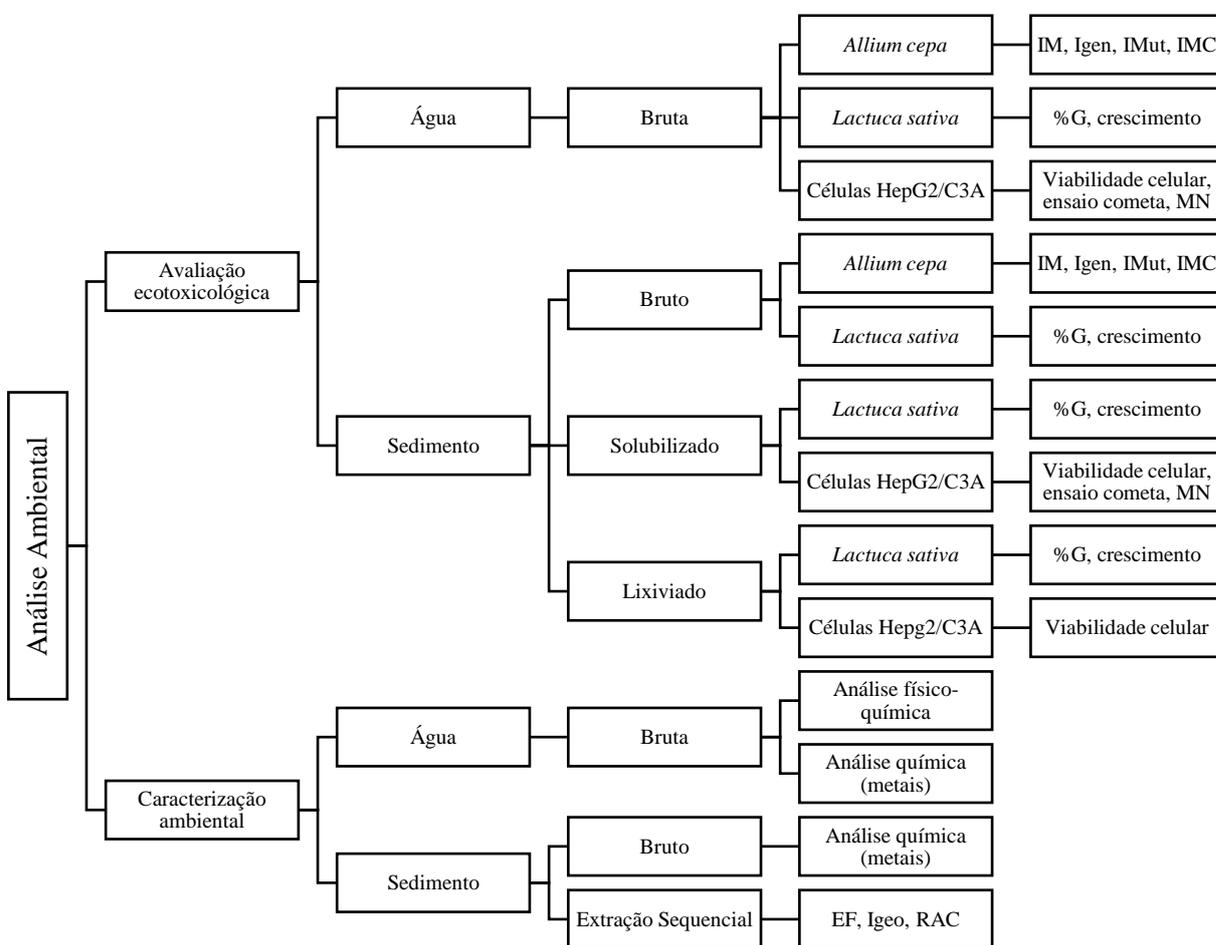
Para avaliação de morte celular, foi realizado o cálculo de índice de morte celular, como segue:

$$\text{Índice de Morte Celular} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de células em processo de morte celular}}{\text{N}^\circ \text{ total de células observadas}} \quad (\text{Equação 10})$$

Para as análises estatísticas, os resultados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk, para normalidade, e Levene, para homogeneidade. Em seguida, foi selecionado o teste mais apropriado para a análise.

4.8 Resumo das metodologias

Figura 6. Metodologias utilizadas para avaliação ecotoxicológica e caracterização ambiental das amostras de água e sedimento coletadas (Paracatu-MG).



5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões pertinentes a esse estudo estão apresentados na forma de artigos.

Artigo 1

“Avaliação de risco e influência ecotoxicológica das atividades de mineração da mina Morro do Ouro (Paracatu-MG)”

Artigo 2

“Análise ecotoxicológica de água e sedimentos de rios de uma região de mineração de ouro rica em arsenopirita”

Artigo 3

“Toxicidade de água e sedimento de uma área sob influência de mineração de ouro (Paracatu-MG), por meio de ensaios *in vitro*”

Artigo 1. Avaliação de risco e influência ecotoxicológica das atividades de mineração da mina Morro do Ouro (Paracatu-MG)

Nádia Aline Corroqué; Fabiano Tomazini da Conceição; Kemellyn Cristina Panchera; Giovana Segati Canizela; Lauren Nozomi Marques Yabuki; Maria Tereza Pamplona-Silva; Willian Barbosa Simioni; Amauri Antonio Menegário; Maria Aparecida Marin-Morales.

Resumo

A mineração é uma atividade que produz benefícios no setor socioeconômico do país, porém, que causa muitos impactos ambientais. Algumas regiões são naturalmente enriquecidas com metais de interesse econômico, sendo alvo de diversos tipos de extração. O município de Paracatu-MG, pelas suas importantes reservas de ouro (mina Morro do Ouro), é considerado o maior produtor de ouro brasileiro. Diante disso, o presente estudo tem por objetivo avaliar o potencial tóxico das amostras de sedimento por meio de bioensaios *in vivo* (*Lactuca sativa*) e *in vitro* (cultura celular humana – HepG2/C3A) e a biodisponibilidade dos metais presentes nestas amostras, assim como as fontes dessa contaminação por metais, por meio das análises químicas e extrações sequenciais. Para essa avaliação, foram coletadas amostras de 3 regiões distintas: 1) a jusante da mina Morro do Ouro, onde está localizado o município de Paracatu; 2) a jusante da barragem de rejeitos da mina Morro do Ouro e 3) de rio envolvido com a captação de água para abastecimento público. Os ensaios de toxicidade dos sedimentos foram desenvolvidos com extratos solubilizado e lixiviado obtidos das amostras dos sedimentos coletados. De acordo com os resultados obtidos, a área 1 se encontra poluída tanto por fontes naturais, quanto por fontes antropogênicas, apresentando elevados níveis de enriquecimento de As. Já a área 2 se encontra poluída principalmente por fontes antropogênicas, provenientes da barragem de rejeitos da mineradora. Os ensaios com *L. sativa* indicaram diminuição de germinação no ponto P3 (área 1), para o extrato solubilizado, e aumento no crescimento de raiz no ponto P4 (área 2), para os dois extratos. Esses resultados indicam potencial fitotóxico do ponto P3, provavelmente em decorrência dos teores elevados de As, Fe e Mn, que podem estar interferindo na germinação dessas sementes. Já o crescimento de raiz, observado no P4, pode estar relacionado aos baixos índices de metais fitotóxicos, o que facilitou o melhor desenvolvimento dessas raízes. Já os ensaios de viabilidade celular mostraram que ambos os extratos (solubilizado e lixiviado) não foram tóxicos às células HepG2/C3A, quando expostos por 3 horas.

Palavras-chave: *Lactuca sativa*; células HepG2/C3A; extração sequencial de metais; toxicidade; citotoxicidade; biomonitoramento ambiental.

1. Introdução

As atividades mineradoras fazem parte de um setor importante da economia brasileira, representando uma porcentagem significativa do PIB nacional (BRASIL, 2019) e de geração de empregos. Porém, essas atividades também são responsáveis por impactos negativos nas mais diferentes malhas ambientais (água, ar e solo), além de estarem relacionadas também à poluição sonora (FARIAS, 2002).

Dentre as importantes atividades de mineração brasileiras, está a extração de ouro. Essas mineradoras são altamente rentáveis, cujo produto se caracteriza como o segundo mineral mais exportado do país (IBRAM, 2018). O estado de Minas Gerais se destaca neste cenário de mineração, por ser o maior produtor de ouro do Brasil, mas, devido a isso, também é o estado que possui as maiores extensões de áreas degradadas. O município de Paracatu, situado na região noroeste deste estado, é considerado um grande produtor de ouro. O município possui uma das maiores minas de ouro a céu aberto do mundo, mina esta, localizada a cerca de 250 metros da zona urbana (KAFRUNI, 2015). Segundo Möller *et al.* (2001) e Rugolo Filho (2004), na mina Morro do Ouro, o ouro ocorre associado com diversos sulfetos, como pirita, calcopirita e pirrotita, entre eles a arsenopirita. A arsenopirita, por sua vez, libera o arsênio para o meio quando oxidado por oxigênio (O_2) ou ferro (Fe^{3+}) (PLUMLEE, 1999).

Muitos contaminantes que alcançam os corpos d'água se misturam à coluna d'água ou se decantam, atingindo os sedimentos dos leitos dos rios. Tanto as águas como os sedimentos aquáticos são matrizes dinâmicas complexas compostas por matéria orgânica; material particulado mineral, variável em tamanho e composição química; e materiais inorgânicos de origem biogênica (CHEN; WHITE, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2006). A matéria orgânica dos sedimentos confere a essa matriz uma característica altamente adsorvente (GAGNÉ *et al.*, 1999), conseqüentemente, de muita eficiência para reter poluentes. Os metais podem se associar aos sedimentos por adsorção às partículas minerais (óxidos de Fe/Mn, argilas, substâncias húmicas), com compostos inorgânicos em reações de precipitação (carbonatos, sulfetos, fosfatos) ou por interação com a matéria orgânica (microrganismos, detritos, húmicos) (BAIRD, 2002).

Sedimentos contaminados podem agir também como fontes de poluição, uma vez que, sob determinadas condições (dragagem ou enchentes), podem disponibilizar os poluentes para a coluna d'água (HOLLERT *et al.*, 2003; SCHWARTZ *et al.*, 2006). Assim, as características dos sedimentos de um rio e, conseqüentemente a qualidade das águas superficiais, estão altamente relacionadas aos contaminantes derivados das atividades humanas do local (MOZETO, 1996; COTTA; REZENDE; PIOVANI, 2006). As alterações nas

condições ambientais e físico-químicas, como a ação de microrganismos, pH, potencial redox, agentes quelantes, entre outras, são os fatores determinantes para fixação ou liberação para o meio de metais presentes nos sedimentos. Desta forma, os contaminantes dos sedimentos podem também afetar a qualidade dos recursos hídricos, se bioacumulando ou se transferindo através da cadeia trófica (FÖRSTNER; WITTMANN, 1983; MOZETO, 1996).

Os ensaios de fitotoxicidade são desenvolvidos por meio de testes de germinação e de crescimento radicular de bioindicadores vegetais específicos. São ensaios de fácil e rápida execução, muito sensíveis e muito eficientes para avaliação dos efeitos de toxicidade aguda de diferentes substâncias químicas (MISIK *et al.*, 2014; PALMIERI *et al.*, 2014; MENDES *et al.*, 2016; MAÑAS; DE LAS HERAS, 2017). Para essa análise, a espécie *Lactuca sativa* (alface) tem sido muito utilizada e recomendada (SOBRERO; RONCO, 2004; CHARLES *et al.*, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2017).

Os ensaios com cultura celular de mamíferos são úteis para triagem rápida de toxicidade, elucidação de mecanismos de toxicidade e compreensão de interações complexas entre diferentes substâncias tóxicas (SERVARAJ; YEAGER-ARMSTEAD; MURRAY, 2012). Essas culturas celulares são de fácil padronização das condições do ensaio e apresentam organização do material genético semelhante às células *in vivo*. Por essas razões, são consideradas eficientes ferramentas para serem usadas em avaliações ambientais (RABELLO-GAY, 1991). Dentre os ensaios desenvolvidos com linhagens celulares para avaliação da viabilidade, realizado por meio da integridade da membrana celular, tem sido comumente utilizado o teste de exclusão do corante Azul de Tripán (MISHELL; SHIIGI, 1980). Este teste se baseia no princípio de que células viáveis (brancas) possuem membranas citoplasmáticas intactas, o que permite a exclusão de certos corantes como o Azul de Tripán, impedindo assim, sua entrada para o citoplasma, enquanto células inviáveis absorvem o corante, apresentando o citoplasma com coloração azul (STROBER, 1997; FRESHNEY, 2005; LOUIS; SIEGEL, 2011).

De acordo com esse cenário, este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade de amostras de sedimento de uma região de mineração de ouro (Paracatu-MG), por meio de bioensaios *in vivo* (*Lactuca sativa*) e *in vitro* (cultura celular humana – HepG2/C3A), realizados com extratos obtidos por duas diferentes metodologias de extração (solubilizado e lixiviado), assim como avaliar a biodisponibilidade dos elementos presentes nos sedimentos e a possível fonte desses elementos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material biológico

2.1.1. Cultura de células humanas

Foram obtidas, junto ao *Banco de Células do Rio de Janeiro* (BCRJ), células de hepatoma humano HepG2/C3A (BCRJ: 0291), que é um clone derivado das células HepG2 (BCRJ: 0103). Essas células vêm sendo mantidas no Laboratório de Mutagênese Ambiental do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro e foram utilizadas em bioensaios de citotoxicidade.

2.1.2. Sementes de *Lactuca sativa*

Foram desenvolvidos ensaios de fitotoxicidade (germinação e crescimento de raiz/hipocótilo) com sementes de *Lactuca sativa*, variedade crespa Grand Rapids, isentas de defensivos, obtidas junto à empresa “Isla Sementes Ltda[®]”.

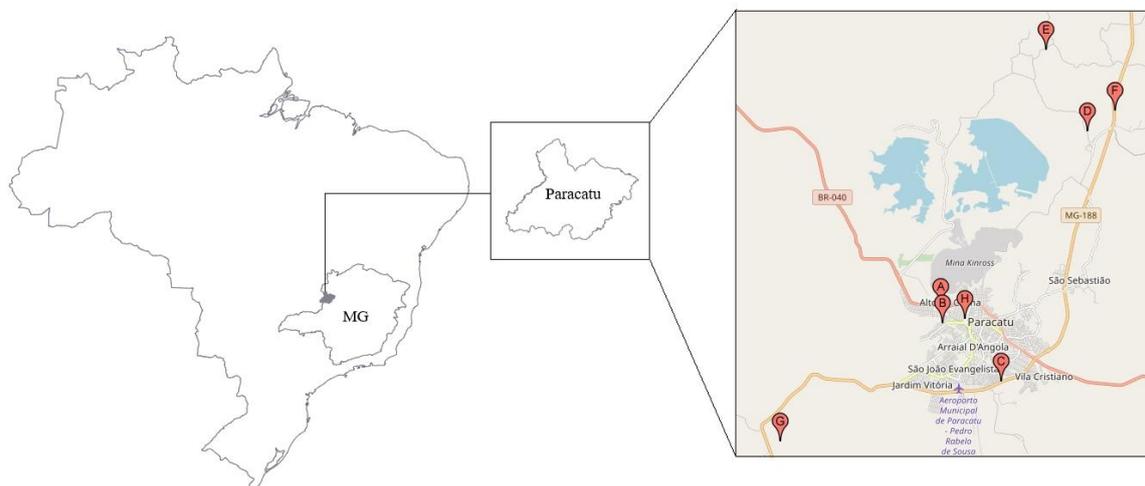
2.2. Amostras ambientais

Foram coletadas, no ano de 2016 (inverno), sedimentos de diferentes pontos de rios de uma área que está sob a influência de atividade de uma mineradora de ouro, localizada no município de Paracatu-MG, como segue: pontos P1, P2 e P3, localizados no Córrego Rico; pontos P4, P5 e P6, localizados na região da barragem de rejeitos Santo Antônio, no córrego Santo Antônio, ribeirão Santa Rita e ribeirão São Pedro, respectivamente; ponto P7, localizado no ribeirão Santa Isabel, próximo ao ponto de captação de água para abastecimento público do município de Paracatu. O esquema representativo dos pontos de coleta deste estudo está apresentado na Figura 1 e descrito na Tabela 1.

Os sedimentos dos rios foram coletados por meio de amostragem composta, com o auxílio de um pegador de Ekman-Birge. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em embalagens de polietileno de alta densidade, que são atóxicos e inertes, uma vez que vidros e metais não são indicados para amostras contendo metais (ANA; CETESB, 2011). As amostras de sedimento foram mantidas refrigeradas, durante o transporte, e armazenadas, a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, no Laboratório de Mutagênese Ambiental na Unesp, Rio Claro, até o momento das análises.

Após a coleta, os sedimentos foram mantidos refrigerados e transportados ao Laboratório de Mutagênese Ambiental na Unesp/Rio Claro, onde foram armazenados a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento de sua utilização nas análises ecotoxicológicas.

Figura 1. Localização do município de Paracatu-MG (latitude 17°13'20"S, longitude 46°52'29"W). Pontos de coleta das amostras de sedimento: A (P1), B (P2) e C (P3) - Córrego Rico; D (P4) - Córrego Santo Antônio; E (P5) - Ribeirão Santa Rita; F (P6) - Ribeirão São Pedro e G (P7) - Ribeirão Santa Isabel.



Fonte: Adaptado de Google Maps

2.2.1. Solubilizado

O extrato solubilizado de cada amostra de sedimento foi obtido por meio dos procedimentos indicados na norma NBR 10006 da ABNT (ABNT, 2004a). Foram dissolvidos 62,5 g da amostra (peso seco) em 250 mL de água ultrapura, seguido de agitação em baixa velocidade, por 5 minutos. Em seguida, os béqueres contendo as amostras foram cobertos com filme PVC e colocados em repouso, por 7 dias, em incubadora BOD ($22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$), para decantação. Após esse período, foi coletada a fase líquida de cada uma das amostras, e posteriormente filtrada em membrana de $0,45\text{ }\mu\text{m}$. Os extratos obtidos foram então armazenados em geladeira (4 °C), até seu uso nos bioensaios.

2.2.2. Lixiviado

Para obtenção do extrato lixiviado das amostras de sedimento, foi utilizada a metodologia proposta pela norma NBR 10005 da ABNT (ABNT, 2004b), com adaptações. De acordo com os cálculos requeridos na metodologia, foram determinadas a porcentagem de sólidos (acima de 0,5% de sólidos) e a solução de extração a ser utilizada, denominada de solução de extração 1 (contendo ácido acético e NaOH, $\text{pH } 4,93 \pm 0,05$). Todas as amostras foram filtradas em filtro de fibra de vidro ($1,6\text{ }\mu\text{m}$) e transferidas para os frascos de lixiviação. A solução de extração foi colocada em frasco de lixiviação, mantidas na proporção: Massa de solução de extração = 20 x massa da fase sólida.

Tabela1. Descrição dos pontos de coleta das amostras de sedimento de rios sob a influência de atividade de mineração de ouro da região de Paracatu-MG.

Pontos	Córrego	Localização	Coordenadas (UTM)			Tipo
			Fuso	X	Y	
P1	Córrego Rico	A jusante da mineradora e a montante da confluência com o Córrego Espalha	23 K	298912	8096066	Arenoso
P2	Córrego Rico	A jusante da confluência com o Córrego Espalha e a montante do perímetro urbano (Paracatu)	23 K	298976	8095370	Arenoso
P3	Córrego Rico	Ao final do perímetro urbano (Paracatu)	23 K	301513	8092911	Arenoso
P4	Córrego Santo Antônio	A jusante da barragem de rejeitos	23 K	305055	8103539	Argiloso
P5	Ribeirão Santa Rita	Antes da confluência com o Córrego São Domingos	23 K	303276	8106996	Argiloso
P6	Ribeirão São Pedro	Após receber contribuições do ribeirão Santa Rita e do Córrego Santo Antônio	23 K	306214	8104425	Argiloso
P7	Ribeirão Santa Isabel	Antes da captação da ETA (COPASA)	23 K	292183	8090285	Argiloso

Os frascos de lixiviação foram fechados e mantidos sob agitação em mesa agitadora (Marconi, MA 139), velocidade 3, temperatura ambiente ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), por um período de 18 horas. Em seguida, as amostras foram filtradas em filtro de fibra de vidro de $1,6\text{ }\mu\text{m}$, para a obtenção do extrato lixiviado. Esses extratos foram armazenados em geladeira ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), para uso posterior nos bioensaios.

2.3. Análise química

O procedimento de digestão total, para quantificação do teor total dos elementos traço, foi realizado para as amostras de sedimento e para o material de referência, certificado SRM 1944, conforme o método USEPA 3051A modificado, utilizando $0,150\text{ g}$ de amostra seca com a adição de 3 mL de HNO_3 e 1 mL de HCl glacial, onde a digestão ocorreu, com aquecimento por radiação micro-ondas (Berghof SpeedWave 4). O aquecimento utilizado para a digestão foi realizado em uma rampa de aquecimento com 2 etapas. Etapa 1 (aquecimento): pressão 50 bar , potência 80% , temperatura $175\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 10 min . Etapa 2 (resfriamento): pressão 0 bar , temperatura $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 20 min .

Para as determinações multi elementares de alumínio (Al), arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), escândio (Sc), ferro (Fe), manganês (Mn) e mercúrio (Hg) foi utilizada a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES – iCAP 6000 Series ICP Spectrometer, Thermo Scientific), equipado com um nebulizador V-groove (Glass Expansion, AUS) e câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, AUS). O sistema ICP-OES foi operado de acordo com as seguintes condições: potência aplicada 1150 W ; vazão do gás do plasma $10\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; vazão do gás auxiliar $0,5\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; vazão do gás de nebulização $0,75\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; vazão de introdução da amostra $3,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Foram empregadas as linhas espectrais: Determinações de Al, As, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb e Sc (Al $396,1\text{ nm}$; As $189,0\text{ nm}$; Cd $226,5\text{ nm}$; Cu $324,7\text{ nm}$; Fe $259,9\text{ nm}$; Hg $184,9\text{ nm}$; Mn $257,6\text{ nm}$; Pb $220,3\text{ nm}$ e Sc $361,3\text{ nm}$). Todas as análises químicas foram realizadas no Centro de Estudos Ambientais (CEA/UNESP- Campus de Rio Claro).

2.4. Extração sequencial

A distribuição dos metais presentes nas amostras de sedimento foi analisada por meio do método de extração sequencial, proposto por Mortatti *et al.* (2013). Neste método, uma alíquota de 1 g de cada amostra de sedimento passa por quatro etapas de extração sequencial, conforme descritas a seguir.

Fase 1 (F1) – Fração solúvel e trocável: Nesta fase, foi adicionado 10 mL de nitrato de magnésio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) a 0,5 M, pH 5,0, em tubos Falcon contendo as amostras de sedimento. Em seguida, os tubos foram submetidos a agitação por 2 horas, a 25 °C.

Procedimento intermediário entre as fases 1 e 2: Após a agitação, os tubos foram centrifugados por 30 min a 3000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo Falcon (tubo para análise), a amostra residual do tubo foi misturada com 10 mL de água Mili-Q e agitada para homogeneização. Os tubos foram centrifugados novamente, por 15 min a 3.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para o tubo de análise. Os tubos de análise tiveram seu volume completado para 50 mL, com água mili-Q, e mantidos sob refrigeração (4 °C), até a realização das análises químicas, para a determinação dos metais. Os tubos contendo a amostra residual, foram deixados em estufa ventilada (40 °C) overnight.

Fase 2 (F2) – Fração ligada a carbonatos: 10 mL de acetato de sódio (NaOAc) 1,0 M, pH 4,5 foram adicionados aos tubos de amostra residual, obtidos na F1. Essa suspensão foi colocada em agitação por 5 horas, a 25 °C. Em seguida, foi realizado, novamente, o procedimento intermediário descrito anteriormente.

Fase 3 (F3) – Fração ligada aos óxidos de Fe e Mn: foi adicionado 10 mL de cloridrato de hidroxilamônio ($\text{NH}_2\text{OH.HCl}$) 0,04 M em ácido acético 25% (v/v) aos tubos de amostra residual da F2. Em seguida, a suspensão foi colocada em agitação, por 5 horas, a 85 °C. Decorrido esse tempo, foi realizado novo procedimento intermediário, conforme já descrito.

Fase 4 (F4) – Fração ligada à matéria orgânica: foram adicionados 3 mL de ácido nítrico (HNO_3) 0,02 M e 8 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 35% aos tubos de amostra residual da F3. A suspensão dos tubos foi colocada em agitação por 5 horas, a 85 °C. Após a agitação, os tubos passaram por processo de resfriamento, por 30 min a 25 °C. Em seguida, foram adicionados aos tubos, 20 mL de acetato de amônio (NH_4Ac) 0,85 M em HNO_3 a 5% (v/v). Os tubos foram colocados em agitação por 30 min, a 25 °C. Posteriormente, foram seguidos os passos do procedimento intermediário, citado nas etapas anteriores.

Todos os tubos foram acidificados com HNO_3 (pH \pm 2,0).

Todas as etapas da extração sequencial foram realizadas no Departamento de Planejamento Territorial e Geoprocessamento (DEPLAN-IGCE/UNESP - Campus de Rio Claro).

2.4.1. Análise da origem, do grau de contaminação e dos riscos da poluição

Após as análises químicas, foram realizados os cálculos para definição do fator de enriquecimento (Enrichment Factor - EF) das amostras coletadas. Os valores obtidos foram comparados com um *background* geoquímico natural, para estimar as áreas e identificar a origem dos elementos traço, bem como possíveis contaminantes (HARIKUMAR; JISHA, 2010; ZHANG; LIU, 2002; MILLER *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2016). Neste estudo, optou-se por utilizar como valores de referência geoquímica uma média entre os pontos P5 (ribeirão Santa Rita) e P7 (ribeirão Santa Izabel), por estes representarem características dos compartimentos geoquímicos da região e por não estarem contaminados por nenhum tipo de atividade da mineradora.

Para o cálculo do EF foi utilizado o escândio (Sc) como elemento normalizador, por esse elemento apresentar um comportamento conservador ao longo do tempo. O EF foi calculado de acordo com a equação:

$$EF = \frac{(Mi/Sc)_{amostra}}{(Mi/Sc)_{referência}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: $(Mi/Sc)_{amostra}$ = razão entre a concentração do metal de interesse (Mi) e o Sc na amostra;
 $(Mi/Sc)_{referência}$ = razão entre a concentração do metal de interesse (Mi); Sc = elemento de referência (*background* geoquímico).

Para avaliar o grau de contaminação dos metais estudados, foi utilizado o Índice de geoacumulação (Igeo), de acordo com a equação de Müller (1979):

$$Igeo = \log_2([M]_{sed}/1,5[M]_{background}) \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: $[M]_{sed}$ = concentração do metal nos sedimentos coletados; e $[M]_{background}$ = concentração do mesmo metal M no *background* geoquímico de referência.

Também foi calculado o Código de Avaliação de Risco – *Risk Assessment Code* (RAC) de acordo com Perin *et al.* (1985), considerando as frações que estão na fase trocável e ligada aos carbonatos, uma vez que estas são mais facilmente remobilizadas para o meio aquático. Foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{RAC} = \left(\frac{[\text{M}]_{\text{F1}} + [\text{M}]_{\text{F2}}}{[\text{M}]_{\text{total}}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: $[\text{M}]_{\text{F1}}$ = concentração do metal de interesse na fase F1 (Fração solúvel e trocável); $[\text{M}]_{\text{F2}}$ = concentração do metal de interesse na fase F2 (Fração ligada aos carbonatos); e $[\text{M}]_{\text{total}}$ = concentração total do metal de interesse (F1+F2+F3+F4+Residual).

2.5. Bioensaios com *Lactuca sativa*

Sementes de *L. sativa* foram dispostas em placas de Petri de Petri 7 cm de diâmetro, forradas com papel de filtro, contendo 3 mL das diferentes amostras de extratos de sedimento (solubilizado e lixiviado). Os tratamentos controles foram realizados com água ultrapura, para o controle negativo (CN), e com sulfato de zinco heptahidratado (0,05 M) (LOPES, 2014), para o controle positivo (CP). Para a exposição com o sedimento lixiviado foi realizado também um controle da solução de extração ($C_{\text{solução}}$), contendo a mesma solução utilizada para o ensaio de lixiviação dos sedimentos e todas as amostras foram diluídas na proporção de 1:11 (extrato : água ultrapura – v/v, respectivamente), proporção essa, que possibilitou melhor crescimento radicular e menor indução de necrose na região meristemática das raízes. Todos os testes de germinação foram realizados, em triplicata, com 20 sementes em cada placa.

As placas foram mantidas em incubadora BOD (22 °C ± 1 °C), sem fotoperíodo, por um período de exposição de 120 horas. Após esse período, as sementes e raízes foram utilizadas para as análises.

2.5.1. Ensaio de germinação e de desenvolvimento das sementes

Após o período de exposição, foram quantificadas as sementes que germinaram em cada placa, cujos valores obtidos foram utilizados para o cálculo da porcentagem de germinação (% G), pela equação:

$$\%G = \frac{\text{Total de sementes germinadas}}{\text{Total de sementes na placa}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Posteriormente, as sementes germinadas, tiveram suas raízes e hipocótilos medidos com paquímetro digital. Foram calculadas as médias dos comprimentos das raízes e dos hipocótilos, para cada triplicata, e os resultados foram comparados estatisticamente com o controle, para análise do crescimento.

Para as análises estatísticas, os dados foram submetidos aos Testes de Shapiro-Wilk, para normalidade e Levene, para homogeneidade. Em seguida, foi selecionado o teste mais apropriado para cada análise: %G e crescimento (raiz e hipocótilo).

2.6. Cultivo celular

Para a realização dos experimentos com a linhagem HepG2/C3A, as células foram descongeladas e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, 3 g de glicose, 1,2 g de bicarbonato de sódio e 1 mL de antibiótico (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 0,1 mg/mL). Os frascos contendo as células foram mantidos em estufa de CO₂, a 37 °C, por um tempo suficiente de estabilização para a obtenção de, pelo menos, 2 repiques celulares. Os repiques para confecção dos frascos foram realizados lavando-se os frascos duas vezes com PBS, tripsinizados com 0,5 mL de Tripisina-EDTA (0,5%), por 5 minutos, a 37 °C e posterior inativação com 1,5 mL de meio DMEM suplementado. Em seguida, as células foram passadas em seringa estéril de 1 mL, para dissociação das células. Após a confluência das células nos frascos repicados, foram realizados novos repiques, transferindo as células dos frascos para as placas de 6 poços, para realização do teste de viabilidade celular.

2.6.1. Viabilidade celular – Teste de exclusão do corante Azul de Tripán

O teste de viabilidade com o corante Azul de Tripán (0,4%, GIBCO, Cat. Nº 15250-061) foi realizado em placas de 6 poços. Foram semeadas, aproximadamente, 5×10^5 células por poço, em um volume total de 2 mL de meio com soro. As placas foram incubadas por um período de 24 horas, para estabilização. Após esse período, o meio foi retirado e substituído por um novo meio de cultura (sem soro), contendo os tratamentos. Foram realizados dois diferentes ensaios com as amostras de sedimento, um com o extrato solubilizado e outro com o extrato lixiviado, nas concentrações de 200 e 400 µL/mL. A concentração inicial de 200 µL/mL equivale a 20% do volume total do poço/frasco de cultura, condição essa em que não ocorre indução de efeitos citotóxicos e /ou genotóxicos em decorrência da mudança de osmolaridade (REIFFERSCHIED *et al.*, 2008; HARA; MARIN-MORALES, 2017). Para ambos os ensaios, foram realizados também os testes controle. O CN foi realizado com meio de cultura sem soro e PBS; o C_{solução} com meio de cultura sem soro + a solução de extração do lixiviado nas concentrações de 200 e 400 µL/mL e o CP com Triton X-100 (diluído em meio de cultura sem soro – solução a 1%).

Para análise da viabilidade celular, as células foram coletadas e misturadas com 20 µL de Azul de Tripán com 20 µL da solução celular homogeneizada. A contagem foi realizada em

Câmara de Neubauer, em microscopia de luz (aumento de 400x). O teste foi realizado em duplicata e os dados obtidos foram, posteriormente, transformados em porcentagem, para a obtenção do percentual de viabilidade de cada concentração testada.

Para as análises estatísticas, esses dados foram submetidos aos Testes de Shapiro-Wilk, para normalidade e Levene, para homogeneidade. Em seguida, foi selecionado o teste mais apropriado para a análise.

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise química dos sedimentos

Os resultados obtidos pelo ICP OES, para análise química total dos metais, nas amostras de sedimentos coletadas estão apresentados na Tabela 2.

Os resultados do presente estudo foram comparados com os valores de referência sugeridos pela Resolução CONAMA nº 454 (BRASIL, 2012), que estabelece diretrizes brasileiras de qualidade de sedimentos. Essa resolução traz os limites máximos de concentração de contaminantes permitidos nesta malha ambiental, com vistas à proteção da biota. Essa resolução está baseada no *Canadian Sediment Quality Guideline* (CCME, 1995; 2002), e os valores do Nível 1 pré-estabelecidos são equivalentes aos propostos pela *Threshold Effect Level* (TEL), índice este que traz o limiar abaixo do qual há menor probabilidade de efeitos adversos à biota. Os valores de Nível 2, que é o limiar acima do qual há maior probabilidade de efeitos adversos à biota, são equivalentes ao *Probable Effect Level* (PEL). Ainda de acordo com a resolução (BRASIL, 2012), quando as concentrações de As, Cd, Pb ou Hg forem superiores às propostas no Nível 1 ou quando a concentração de qualquer substância (listada na tabela da Resolução) for superior ao Nível 2, deverão ser também realizados ensaios de ecotoxicidade.

Conforme a Resolução CONAMA nº 454 (BRASIL, 2012), pelos resultados obtidos neste estudo, quanto à concentração de metais nas amostras de sedimentos (Tabela 2), foi possível observar que os valores para As (exceto para o P7) e Cd estão acima do Nível 2, que alerta para a possibilidade de indução de efeitos adversos à biota. Os valores de As (Tabela 2) superam muito o limite pré-estabelecido (8 a 114 vezes, variando de acordo com a localização dos pontos) para o valor de referência de Nível 2 (17 mg/kg). Nos pontos P2 e P3, pertencentes ao córrego Rico, antes e após a área urbana do município de Paracatu, os valores de As observados (Tabela 2) foram de 1.940 mg/kg e 1.725 mg/kg, enquanto que nos pontos P4 e P6, correspondentes ao córrego Santo Antônio e ribeirão São Pedro, localizados após a barragem de sedimentos da mineradora, os valores observados foram de 150 mg/kg e 478,1 mg/kg.

Tabela 2. Resultados da análise química dos metais presentes nos sedimentos de rios sob a influência de atividade de mineração de ouro da região de Paracatu-MG, nos seus diferentes pontos de coleta.

	Pontos de Coleta							Referência*	
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	Nível 1	Nível 2
Alumínio (Al)	16771,0 ± 3382,0	5326,0 ± 504,0	4320,0 ± 201,0	8110,0 ± 1275,0	4318,0 ± 776,0	13899,0 ± 805,0	8864,00 ± 1228,00	-	-
Arsênio (As)	77,0 ± 9,0	1940,0 ± 337,0	1725,0 ± 224,0	150,0 ± 21,0	31,0 ± 1,0	478,1 ± 0,3	12,00 ± 0,30	5,90	17,000
Cadmio (Cd)	9,0 ± 1,0	12,0 ± 1,0	11,0 ± 2,0	8,0 ± 1,0	4,9 ± 0,2	6,4 ± 0,1	5,50 ± 0,10	0,60	3,500
Chumbo (Pb)	28,0 ± 2,0	43,0 ± 4,0	50,0 ± 4,0	35,0 ± 5,0	16,2 ± 0,4	38,0 ± 1,0	25,00 ± 1,00	35,00	91,300
Cobre (Cu)	40,0 ± 3,0	34,0 ± 6,0	29,0 ± 3,0	28,0 ± 3,0	29,0 ± 4,0	47,0 ± 1,0	30,29 ± 0,02	35,70	197,00 0
Escândio (Sc)	8,2 ± 0,2	6,0 ± 1,0	4,0 ± 1,0	5,0 ± 1,0	2,7 ± 0,1	6,1 ± 0,3	4,40 ± 0,40	-	-
Ferro (Fe)	21871,0 ± 4866,0	23114,0 ± 4123,0	28595,0 ± 2472,0	19699,0 ± 5736,0	8401,0 ± 1923,0	15985,0 ± 895,0	14883,00 ± 639,00	-	-
Manganês (Mn)	201,0 ± 41,0	184,0 ± 39,0	173,0 ± 43,0	177,0 ± 18,0	213,0 ± 7,0	493,0 ± 13,0	322,00 ± 20,00	-	-
Merúrio (Hg)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,17	0,486

Os valores estão expressos em mg/kg (média±desvio padrão). LQ = Limite de Quantificação (Al = 36,158; As = 5,143; Cd = 0,442; Cu = 1,710; Fe = 8,954; Hg = 2,801; Mn = 0,287; Pb = 4,508; Sc = 1,163). *Legislação CONAMA Nº 454/2012 (sedimentos de água doce)

Valores pouco menores de As foram registrados para os pontos P1 (77 mg/kg) e P5 (31 mg/kg), porém ainda superiores aos limites do Nível 2 (Tabela 2). Os menores valores encontrados para As neste estudo foram os observados para o ponto P7 (12 mg/kg), que não recebe influência do efluente da mineradora. Embora esses valores estejam dentro dos Níveis 1 e 2 pré-estabelecidos na legislação, eles já devem ser considerados como um alerta para a necessidade de realização de testes ecotoxicológicos neste ponto, pelo fato do As ser um metal que configura risco ambiental e por estar localizado pouco antes da captação da ETA que abastece o município de Paracatu.

Para o Cd, todos os pontos analisados mostraram valores superiores (1,4 até 3,4 vezes maiores) (Tabela 2) aos pré-estabelecidos para o Nível 2 (3,5 mg/kg). Os maiores valores observados foram no córrego Rico, nos pontos P1 (9 mg/kg), P2 (12 mg/kg) e P3 (11 mg/kg), seguidos do córrego Santo Antônio-P4 (8 mg/kg), ribeirão São Pedro-P6 (6,4 mg/kg), ribeirão Santa Isabel-P7 (5,5 mg/kg) e ribeirão Santa Rita-P5 (4,9 mg/kg). Assim como o As, o Cd também é um metal de maior risco de acordo com Brasil (2012), e valores acima de 0,6 mg/kg já alertam para a necessidade de uma maior investigação na área, bem como a realização de ensaios ecotoxicológicos para o ponto P7.

As maiores concentrações de Pb (Tabela 2) foram registradas para os pontos P2 (43 mg/kg), P3 (50 mg/kg), P4 (35 mg/kg) e P6 (38 mg/kg). Apesar de nenhum desses valores serem superiores aos limites estabelecidos pelo Nível 2 (91,3 mg/kg), eles estão acima ou no limite maior do Nível 1 (35 mg/kg), o que já sugere, pela legislação, a necessidade de melhor investigação dos sedimentos desses pontos.

Foram encontrados valores de Cu (Tabela 2) maiores que os estabelecidos pelo Nível 1 (35,7 mg/kg) nos pontos P1 (40 mg/kg) e P6 (47mg/kg). Apesar dos valores serem superiores ao Nível 1, esses não ultrapassam o Nível 2 (197 mg/kg), o que de acordo com a legislação vigente, não requer estudos mais detalhados.

O Al e o Fe, apesar de não possuírem valores de referência para fins comparativos, apareceram em quantidades muito elevadas (Tabela 2), em todos os pontos de coleta estudados. Os valores de Al observados no estudo ficaram entre 4318 (P5) e 16771 mg/kg (P1), enquanto os de Fe ficaram entre 8401 (P5) e 28595 (P3) mg/kg.

3.2. Extração sequencial

3.2.1. Análise química

Os resultados obtidos pelo ICP OES, para análise química dos metais de cada fase da extração sequencial, realizada nas amostras de sedimento coletadas nos rios sob a influência de atividade de mineração de ouro da região de Paracatu-MG estão apresentados na Tabela 3 e esquematizados na Figura 2. Na Figura 2, não foram esquematizados os dados referentes ao Hg, por estes estarem abaixo dos limites de quantificação.

Pelos resultados da extração sequencial realizada no presente estudo, é possível quantificar a biodisponibilidade de cada elemento metálico, no decorrer das transformações que ocorreram nos sedimentos, seja por ação física, química ou biológica. De acordo com Tessier, Campbell e Bisson (1979), as frações F1 e F2 são as mais facilmente remobilizadas para o meio aquático, correspondendo as liberações de metais mais hidrosolúveis, enquanto as frações F3 e F4 representam as dos metais de baixa hidrosolubilidade e a fração residual (R), os metais de menor mobilidade nos sedimentos.

De acordo com os resultados observados na Tabela 3, pode-se verificar que de todos os elementos analisados, somente o Mn esteve presente em todas as frações, inclusive nas frações mais lábeis (F1 e F2). Estudos realizados por Ferreira (2014), nesta mesma área (Paracatu-MG), registraram resultados semelhantes, quanto à presença do Mn em amostras estudadas pelos autores. No entanto, Ferreira (2014) encontrou maiores valores deste elemento na fração F3 (óxidos de Fe e Mn), enquanto no presente estudo, os maiores valores observados foram na fração F2, que é mais lábil, e que demonstra uma grande relação de ligação com os carbonatos. Ainda assim, esse elemento se encontra amplamente distribuído também nas frações F3 e F1.

Para a maioria dos elementos analisados, foi possível observar que mais de 50% do total do elemento se encontra distribuído na fração R (Figura 2), onde apenas Cu e Fe se encontram na faixa de 40% e Mn com cerca de 30%. O Sc foi o elemento que apresentou maior distribuição na fração R, com cerca de 80 a 90% do elemento nesta fração. Os estudos de Ferreira (2014) também corroboram estes dados das maiores concentrações dos metais As, Fe, Mn, Pb e Zn estarem presentes na fração R dos sedimentos dos rios da região de Paracatu. De acordo com Murray *et al.* (1999), os metais encontrados na fração R são mais estáveis, sendo então os que mais se mantém associados à estrutura cristalina de alguns minerais.

O Al e o Cu apresentaram um comportamento relativamente semelhante, apresentando maiores valores de concentração nas frações F3 (óxidos de Fe e Mn) e F4 (matéria orgânica) (Tabela 3). No entanto, o Al teve valores ainda maiores de concentração na fração R, apresentando cerca de 60 e 80% do total do elemento associado à essa fração, enquanto o Cu

Tabela 3. Resultados da análise química dos metais presentes nos sedimentos de rios, nos seus diferentes pontos de coleta, após os ensaios de extração sequencial.

Fases de extração	Pontos de coleta	Alumínio	Arsênio	Cadmio	Chumbo	Cobre	Escândio	Ferro	Mercúrio	Manganês
F1	P1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3,66	<LQ	11,45
	P2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,15	<LQ	14,26
	P3	<LQ	0,56	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3,74	<LQ	18,39
	P4	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	7,32	<LQ	15,05
	P5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,67	<LQ	51,74
	P6	<LQ	0,79	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	16,05	<LQ	104,82
	P7	24,40	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	68,41	<LQ	93,90
F2	P1	303,11	3,59	0,40	2,45	1,20	0,93	2418,92	<LQ	40,88
	P2	207,54	9,60	0,29	2,68	2,45	0,36	1708,79	<LQ	91,59
	P3	116,80	10,51	0,11	2,07	2,04	0,16	409,44	<LQ	48,02
	P4	154,00	4,05	0,27	2,48	2,88	0,46	1575,32	<LQ	48,47
	P5	127,86	3,55	0,11	1,15	1,95	0,21	518,96	<LQ	44,52
	P6	281,89	14,84	0,39	4,95	5,26	0,61	2390,56	<LQ	108,16
	P7	193,38	3,32	0,30	2,21	2,31	0,45	1911,05	<LQ	24,89
F3	P1	1001,73	4,40	1,01	7,37	9,46	0,34	7742,30	<LQ	20,82
	P2	602,40	8,64	0,72	6,01	6,23	0,16	5478,80	<LQ	39,50
	P3	522,37	11,75	0,51	4,59	4,01	0,12	3942,23	<LQ	39,22
	P4	609,31	4,54	1,19	7,98	6,15	0,00	8901,80	<LQ	41,97
	P5	411,56	6,06	0,26	1,69	0,97	0,00	2138,81	0,17	43,89
	P6	717,84	18,47	1,32	7,29	8,21	0,56	10035,90	<LQ	108,46
	P7	565,31	5,73	0,95	4,66	1,24	0,00	7374,25	<LQ	68,67
F4	P1	551,98	1,43	0,12	2,34	7,32	0,15	141,19	<LQ	3,46
	P2	331,90	8,50	0,41	1,48	4,36	0,00	45,89	0,15	4,64
	P3	270,22	5,15	0,13	1,36	3,65	0,00	359,59	<LQ	6,89
	P4	558,34	1,59	0,09	2,52	13,47	0,11	203,62	<LQ	4,62
	P5	596,52	2,06	0,06	0,73	4,53	0,00	123,14	<LQ	7,45
	P6	615,11	2,73	0,13	3,16	11,80	0,14	526,46	<LQ	13,11
	P7	883,19	1,91	0,20	2,00	11,48	0,31	1184,37	<LQ	14,85

Os valores estão expressos em mg/kg. LQ = Limite de Quantificação. F1 = Fase 1 (Fração solúvel e trocável); F2 = Fase 2 (Fração ligada a carbonatos); F3 = Fase 3 (Fração ligada aos óxidos de Fe e Mn); F4 = Fase 4 (Fração ligada à matéria orgânica).

Figura 2. Extração sequencial de Al, As, Cd, Pb, Cu, Sc, Fe e Mn nas amostras de sedimento de rios, nos seus diferentes pontos de coleta.



F1 = Fase 1 (Fração solúvel e trocável); F2 = Fase 2 (Fração ligada a carbonatos); F3 = Fase 3 (Fração ligada aos óxidos de Fe e Mn); F4 = Fase 4 (Fração ligada à matéria orgânica); R = Fração residual.

teve em torno de 40 a 60%. O Al e o Cu também foram os metais que apresentaram maior porcentagem do elemento ligado à matéria orgânica (F4) (Figura 2). Os demais elementos tiveram sua dissociação em menor quantidade nesta fração. Esses resultados estão de acordo com outros autores, que observaram maior afinidade do Cu com a matéria orgânica (MORTATTI *et al.*, 2013) e altas porcentagens de Cu ligado aos óxidos de Fe e Mn (LIANG *et al.*, 2018).

Dentre as frações F1 até F4, o As e o Fe apresentaram maiores valores de dissociação nas frações F2 (carbonatos) e F3 (óxidos de Fe e Mn), conforme observado na Tabela 3. O As apresentou maior predominância de distribuição na fração R (Figura 2), com valores em torno de 60 a 90%. O Fe, teve valores em torno de 40 a 60%, na maioria dos pontos, no entanto, em alguns pontos (P6 e P7), mais de 40% deste elemento está distribuído na fração F3. Nos estudos realizados por Ferreira (2014) e Aguiar (2018), elementos como As e Fe foram observados com maior predominância na fração R. Aguiar (2018) ainda observou valores relevantes de As ligado à matéria orgânica, discordando dos resultados do presente estudo, onde foi observada maior dissociação do As ligado a carbonatos e a óxidos de Fe e Mn do que a matéria orgânica.

Apesar das porcentagens de As nas frações F2 (pontos P2, P3 e P6) e F3 (pontos P2, P3 e P6) serem relativamente baixas, quando comparadas com a fração R (Figura 2), esses valores, quando comparados com os níveis estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2012), já estão acima do Nível 1, o que demonstra que não só os valores totais estão acima dos níveis de segurança, mas também as frações lábeis destes sedimentos. Estes dados também são preocupantes, porque a F2, assim como a F1, são as frações lábeis mais bioacessíveis no meio ambiente. Apesar do As não estar presente em grande quantidade na matéria orgânica, o ponto P2 também apresentou valores acima do Nível 1 nesta fase (F4).

Assim como os demais metais, o Cd e o Pb também tiveram maior predominância de distribuição na fração R (Figura 2), apresentando valores em torno de 60 a 90% para o Cd e 50 a 80% para o Pb. O comportamento destes dois elementos também foi semelhante entre as frações F1 a F4, mostrando maior dissociação desses metais na fração F3 (óxidos de Fe e Mn). Outros estudos também mostraram maiores valores de Pb (MORTATTI *et al.*, 2002; MORTATTI *et al.*, 2013; LIANG *et al.*, 2018) e Cd (MORTATTI *et al.*, 2013) associados aos óxidos de Fe e Mn. Os valores observados de Cd (fração F3) também ultrapassaram os valores do Nível 1 da legislação vigente (BRASIL, 2012) nos pontos P1, P2, P3, P4, P6 e P7. Apesar da fração lábil F3 ser menos acessível do que F1 e F2, esses valores registrados acima do nível de segurança são indicativos de alerta, quanto a toxicidade dos sedimentos dos rios estudados,

uma vez que essa malha ambiental pode remobilizar contaminantes para a coluna d'água correspondente (HOLLERT *et al.*, 2003; SCHWARTZ *et al.*, 2006).

3.2.2. Análise de fontes naturais e antropogênicas

3.2.2.1. Fator de Enriquecimento (EF)

O cálculo do EF, que expressa a relação de abundância entre um elemento de interesse e um elemento conservador, comparado à relação correspondente entre esses dois elementos no material de origem (BOWEN, 1979), tem se mostrado uma ferramenta eficiente para a detecção e quantificação de metais pesados (STERCKEMAN *et al.*, 2006). Contudo, é necessário que o elemento de referência tenha pouca variabilidade e seja pouco afetado por intemperismos (LOSKA *et al.*, 1997). Além disso, tem sido recomendado também o uso de um *background* de referência com valores regionais ou naturais do local (FERRAND; HAMELIN; MONACO, 1999; RODRIGUES; NALINI JUNIOR, 2009; HARIKUMAR; JISHA, 2010; MORTATTI; MORAES; PROBST, 2012; FERNANDES *et al.*, 2016).

Assim, para os cálculos de EF do presente estudo (Tabela 4), foi utilizado o Sc como elemento normalizador e a média dos pontos P5 e P7, como valores de referência geoquímica, uma vez que estes pontos refletem as características geoquímicas da região, e não possuem influência direta das atividades de mineração.

Tabela 4. Fatores de Enriquecimento (EF) obtidos para os metais presentes no sedimento de rios, nos seus diferentes pontos de coleta.

	Pontos de Coleta						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Alumínio	1,11*	0,47	0,57	0,86	0,76	1,23*	1,18*
Arsênio	1,57*	52,64*	70,20*	4,88*	1,68*	12,97*	0,49
Cadmio	0,72	1,27*	1,75*	0,64	0,40	0,74	0,95
Chumbo	0,60	1,22*	2,13*	1,20*	0,91	1,08*	1,07*
Cobre	0,60	0,68	0,88	0,68	1,17*	0,95	0,88
Ferro	0,82	1,16*	2,15*	1,18*	0,84	0,80	1,12*
Manganês	0,33	0,40	0,57	0,46	0,93	1,08*	1,05*

EF ≤ 1: as contribuições para o metal em análise são naturais; EF > 1: as contribuições para o metal em análise podem ser relacionadas a fontes naturais ou antropogênicas. *EF>1.

Foram adotados nesse estudo a avaliação de EF sugerida por Fernandes *et al.* (2016). Nesta avaliação, valores de EF ≤ 1 são considerados contribuições naturais do metal em análise,

ou seja, proveniente dos processos de erosão, enquanto valores de $EF > 1$, contribuições são relacionadas a fontes naturais ou antropogênicas, como as atividades de mineração da região do presente estudo.

Os resultados de EF mostraram $EF > 1$ para As, Cd, Pb e Fe dos pontos P2 e P3 (córrego Rico), enquanto que o P1, situado logo a jusante das atividades da mineradora, apresentou esse índice elevado somente para Al e As (Tabela 4). De acordo com os resultados elevados de Cd, Pb e Fe, para os pontos P2 e P3, e os índices menores desses elementos em P1, pode-se inferir que o processo de enriquecimento desses metais nos pontos de coleta se devem, provavelmente, a fatores múltiplos, como fontes naturais, antrópicas e geomorfologia dos locais de coleta. As fontes naturais consideradas para esta região de estudo são as decorrentes da própria característica geoquímica da região, constituída do mineral arsenopirita que, devido à ciclagem biogeoquímica e intemperismo, já disponibiliza para o ambiente elementos como o Fe e As, além de outros como Al, Cd e Pb, fator comprovado pelo fato de serem também encontrados nos pontos de referência deste estudo. As fontes antrópicas, como as atividades da mineração, também contribuem para o aumento de metais tóxicos nas águas superficiais e sedimentos dos rios da região. Esse fator pode ser comprovado pelos altos índices de As nos pontos próximos às atividades da mineradora, o que confirma um aporte adicional de Fe e As nesses locais.

O córrego Santo Antônio (P4), afluente do ribeirão São Pedro (P6), está localizado a jusante da barragem de rejeitos. Esse corpo d'água exibiu índices maiores que 1 para As, Pb e Fe, enquanto que esses mesmos elementos não foram observados ou observados em menores índices no ribeirão Santa Rita (P5), um dos corpos d'água considerados como pontos controle. Por esses resultados, pode-se inferir que os índices elevados desses metais presentes no córrego Santo Antônio são de origem antrópica, muito provavelmente, relacionados à barragem de rejeitos da mineradora, que libera, principalmente As, pós extração do ouro do mineral arsenopirita, para esse corpo d'água, contaminação esta que se estende também para o ponto P6. Como pode ser observado na Tabela 4, o As apresentou altos índices de enriquecimento em quase todos os pontos de coleta, inclusive no *background* (P5), sendo exceção apenas para o P7 (rio de captação de água de abastecimento público), o que reforça a sugestão de que a contaminação por metais na região pode ser decorrente de fatores múltiplos.

3.2.2.2. Índice de geoacumulação (Igeo)

Para avaliar o nível de contaminação desta área de estudos, foi utilizado o índice de geoacumulação (Igeo), proposto por Müller (1979). Esse índice evidencia o nível de poluição de um elemento de interesse, baseado em valores de *background* geoquímico. Neste estudo, o

background geoquímico utilizado nos cálculos foi o mesmo utilizado para o EF (média dos pontos P5 e P7). A interpretação dos resultados de Igeo seguiu uma escala qualitativa de poluição do metal de interesse, onde $Igeo < 1$ caracteriza ausência de poluição (Classe 0); $1 < Igeo < 3$, poluição moderada (Classe I); $3 < Igeo < 5$, poluição forte (Classe II); $Igeo > 5$, poluição extrema (Classe III). Os resultados obtidos para o Igeo das amostras de sedimento coletados nos rios estudados sob a influência da mineradora de ouro de Paracatu-MG, estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5. Índices de geoacumulação (Igeo) para as amostras de sedimento de rios, nos seus diferentes pontos de coleta.

	Pontos de Coleta						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Alumínio	0	0	0	0	0	0	0
Arsênio	I	III	III	I	0	II	0
Cadmio	0	0	0	0	0	0	0
Chumbo	0	0	0	0	0	0	0
Cobre	0	0	0	0	0	0	0
Ferro	0	0	0	0	0	0	0
Manganês	0	0	0	0	0	0	0

Classe 0: ausência de poluição ($Igeo < 1$); Classe 1: poluição moderada ($1 < Igeo < 3$); Classe 2: poluição forte ($3 < Igeo < 5$); Classe 3: poluição extrema ($Igeo > 5$).

Pelos índices Igeo, foi possível observar que nenhum dos pontos analisados neste estudo apresentou níveis de poluição para os elementos Al, Cd, Pb, Cu, Fe e Mn ($Igeo < 1$). Esses resultados indicam que a presença desses elementos é proveniente de fontes naturais e que não há poluição por esses elementos devido a enriquecimento por atividades antrópicas presentes nos locais avaliados. Entretanto, o As apresentou Igeo de classe I (poluição moderada), para os pontos P1 e P4, classe II para o ponto P6 (poluição forte) e classe III (poluição extrema) para os pontos P2 e P3.

Por esses dados podemos reforçar as discussões já apresentadas para os índices de EF, de que a contaminação da região, por esse metal, é derivada de fatores múltiplos. Considerando que os pontos de referência (P5 e P7) apresentaram ausência de poluição, mas presença de As (Tabela 2) com valores de alerta pela CONAMA 454 (BRASIL, 2012), pode-se inferir que isso ocorre devido às características naturais de altos teores de As. Os níveis de poluição registrados para P2 e P3, associados aos índices de EF, confirmam que há uma contribuição dos níveis de As nesses pontos também por fontes antrópicas (Tabela 4). Já para os pontos próximos à

barragem de rejeitos, foi possível observar poluição moderada (P4) e poluição forte (P6), sugerindo que a mineradora também está influenciando na qualidade desses sedimentos, que estão sendo enriquecidos com As proveniente da barragem de rejeitos do Morro do Ouro. Os níveis mais baixos de poluição do P1 (classe I) reforçam as discussões apresentadas para EF, de que a declividade do terreno pode estar influenciando o carreamento dos contaminantes rio abaixo, minimizando os impactos das fontes naturais e antrópicas deste ponto e impactando os pontos P2 e P3, que acumulam esses contaminantes em seus sedimentos.

Os estudos realizados por Mello *et al.* (2014), para avaliar os teores de As no material particulado atmosférico da cidade de Paracatu, evidenciaram que houve variação dos teores deste metal, de forma espacial e sazonal, controlados pela origem da poeira dos solos, direção e velocidade do vento dominante (nordeste) e da distribuição sazonal de precipitação. Os autores observaram maiores concentrações de As nos pontos próximos à borda sudeste da área de mineração do Morro do Ouro, localizado no município de Paracatu, afirmação esta que corroboram os resultados de análises químicas realizadas no presente estudo. Os autores ainda afirmam que, na área da barragem (região localizada contra o vento da mina de ouro), as concentrações de As foram as menores encontradas, evidenciando então que essas maiores concentrações encontradas estão atribuídas à emissão de poeiras das atividades operacionais da mina de ouro e aos ventos predominantes, que favorecem a remobilização e a dispersão da poeira da área de mineração para a área a sudeste da mina. Além deste, outros estudos realizados em Paracatu (SANTANA FILHO, 2005; CHAPADEIRO *et al.*, 2006; RESENDE, 2009; FERREIRA, 2014) também concluíram que o enriquecimento de As nos solos e sedimentos provavelmente está relacionado aos processos de ciclagem biogeoquímica natural deste elemento, assim como aos processos de deposição de sedimentos por erosão hídrica e da dispersão atmosférica de material particulado contendo As, proveniente da área de mineração, que vão influenciar diferentemente cada ponto, dependendo da sua localização, corroborando com os resultados do presente estudo.

3.2.2.3. Avaliação de risco (*Risk Assessment Code* – RAC)

O código de avaliação de risco (RAC) foi estabelecido por Perin *et al.* (1985) e é utilizado para avaliar os riscos associados a metais pesados presentes em sedimentos. Segundo Wang *et al.* (2010), o RAC é aplicado principalmente à soma das frações trocáveis e ligadas aos carbonatos, a fim de avaliar a disponibilidade de metais presentes no sedimento, já que essas fases podem ser facilmente remobilizadas para o meio aquático, por meio de reações bioquímicas e, conseqüentemente, absorvidas pela biota.

Os resultados obtidos para o RAC estão dispostos na Tabela 6. Essa avaliação seguiu critérios estabelecidos por Perin *et al.* (1985), onde $RAC < 1$ é indicativa de ausência de risco (classe I); RAC entre 1 e 10, de baixo risco (classe II); RAC entre 11 e 30, de médio risco (classe III); RAC entre 31 e 50, de alto risco (classe IV); e $RAC > 50$, de risco muito alto (classe V).

Tabela 6. Classificação para os valores de RAC (*Risk Assessment Code*) obtidos das amostras de sedimento de rios, nos seus diferentes pontos de coleta.

	Pontos de Coleta						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Alumínio	II	II	II	II	II	II	II
Arsênio	II	I	I	II	III	II	III
Cadmio	II	II	II	II	II	II	II
Chumbo	II	II	II	II	II	III	II
Cobre	II	II	II	II	II	III	II
Ferro	III	II	II	II	II	III	III
Manganês	III	V	IV	IV	IV	IV	IV

I: sem risco ($RCA < 1$); II: baixo risco (RCA entre 1 e 10); III: médio risco (RCA entre 11 e 30); IV: alto risco (RCA entre 31 e 50); V: risco muito alto ($RCA > 50$).

De acordo com os resultados obtidos, a maior parte dos elementos (Al, As, Cd, Pb, Cu e Fe) apresenta baixo risco para os pontos avaliados. O Al, assim como o Cd apresentam baixo risco em todos os pontos analisados e o Pb e o Cu apresentaram médio risco no ponto P6 (ribeirão São Pedro). Apesar dos valores serem correspondentes a um risco médio, é importante destacar, principalmente os valores de Pb, por esse elemento pertencer ao grupo 2A da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), classificado como, provavelmente, carcinogênico para humanos (WHO, 2019).

O As, ainda que tenha apresentado baixo risco na maioria dos pontos deste estudo, possui risco médio para os pontos P5 (ribeirão Santa Rita) e P7 (ribeirão Santa Isabel), sendo esse último o rio de captação de água para abastecimento público do município de Paracatu. Com esse resultado é possível concluir que existe uma quantidade relevante de As disponível no ambiente, que pode contaminar a biota, assim como afetar a saúde humana. Além disso, o As também é classificado como carcinogênico para humanos de acordo com a IARC (WHO, 2019), o que agrava ainda mais o problema registrado.

O Fe apresentou médio risco nos pontos P1 (córrego Rico), P6 (ribeirão São Pedro) e P7 (ribeirão Santa Isabel), mostrando que esses pontos possuem maior disponibilidade deste

elemento para o meio ambiente. O Fe é um elemento essencial, porém em quantidades elevadas, pode causar danos à saúde (TOYOKUNI, 2011).

O único elemento que apresentou alto risco (P3, P4, P5, P6 e P7) e risco muito alto (P2) foi o Mn, mostrando que este elemento está disponível em grandes quantidades. O Mn assim como o Fe também é um elemento essencial, porém necessário em pequenas quantidades (ATSDR, 2012). Quando encontrado em níveis mais elevados, ele pode ser prejudicial à saúde. É importante ressaltar que os sedimentos do ponto P7, apresentaram médio risco para As e Fe e alto risco para Mn, mostrando que esses elementos estão facilmente disponíveis neste meio aquático, o que demanda maiores estudos sobre a qualidade dos sedimentos desse local de coleta, pois essas águas são captadas para serem utilizadas no abastecimento público do município de Paracatu.

3.2.3. Ensaio de germinação e de desenvolvimento das sementes

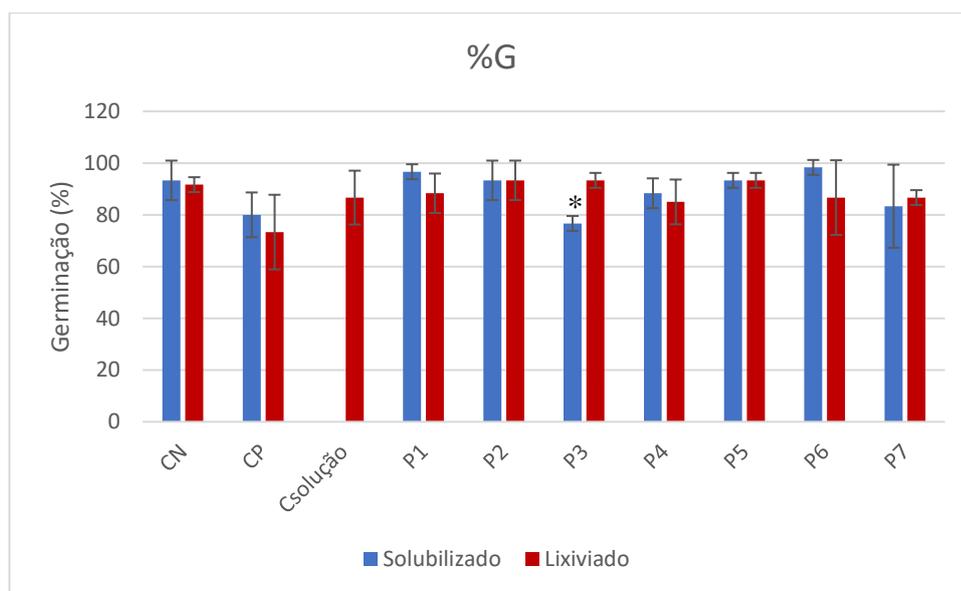
Os ensaios de germinação com *L. sativa* foram realizados com extratos lixiviados (diluídos na proporção de 1:11 - extrato: água ultrapura – v/v, respectivamente) e solubilizados de amostras de sedimentos de rios sob influência de uma mineradora de ouro da cidade de Paracatu-MG. Para as análises estatísticas foi adotado como controle negativo, o controle realizado com a solução de extração para obtenção do lixiviado, a fim de eliminar a influência dessa solução nos resultados.

Após a exposição às diferentes amostras de sedimento (solubilizado e lixiviado), as sementes germinadas de *L. sativa* foram quantificadas, para a obtenção da porcentagem de germinação (% G) (Figura 3).

Pelos resultados dos ensaios de germinação, foi observado que apenas os resultados do sedimento do ponto P3 (solubilizado) se mostraram estatisticamente significativos, com valores abaixo do registrado para o CN. Esse resultado observado para o P3, quando correlacionado com os valores das análises químicas de F1 (Tabela 3), que mostra os teores de As (0,56 mg/kg), Fe (3,74 mg/kg) e Mn (18,39 mg/kg) para este ponto de coleta, indica que esses elementos podem estar interferindo na germinação dessas sementes. O Fe e o Mn são micronutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas, por estarem envolvidos em reações redox (TAIZ *et al.*, 2017). O As, diferentemente do Fe e Mn, já possui efeito fitotóxico comprovado (ALLOWAY, 1990), capaz assim de alterar a germinação de sementes. Apesar do sedimento do P6 também estar contaminado com As (0,79 mg/kg - Tabela 3), os resultados de germinação não foram estatisticamente diferentes dos do CN. Neste caso, é possível justificar a não fitotoxicidade para este ponto, aos valores mais elevados registrados para os elementos Fe e

Mn, que, de acordo com (STOLLENWERK, 2003; TANI *et al.*, 2004), reagem com o As, por oxidação e adsorção, inibindo assim a sua ação fitotóxica.

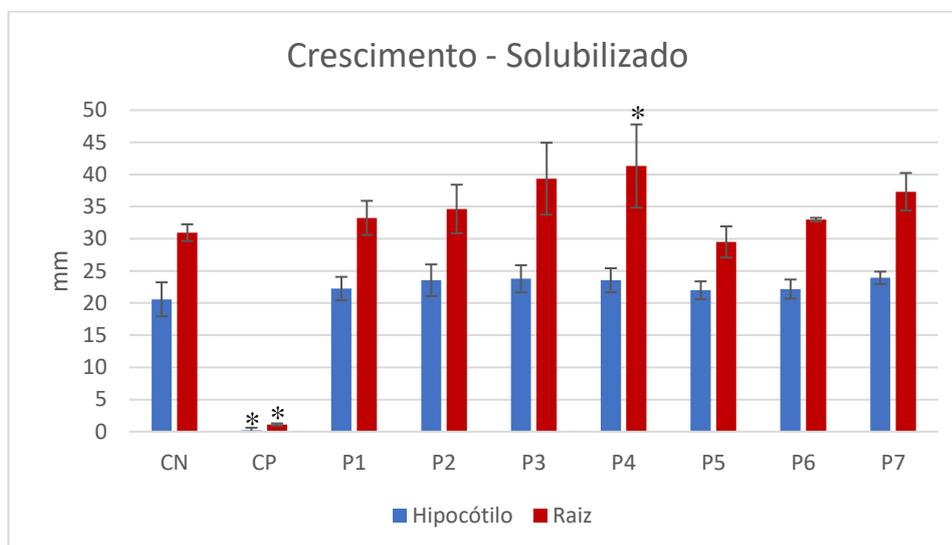
Figura 3. Porcentagem de germinação (% G) de *Lactuca sativa*, para as diferentes amostras (solubilizado e lixiviado) de sedimento coletadas em sob influência da mineradora de ouro de Paracatu-MG.



CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (sulfato de zinco 0,05 M); C_{solução} = controle da solução de extração (solução de extração utilizada para obtenção do lixiviado). *Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$), em relação ao CN (solubilizado), de acordo com Kruskal Wallis/Dunn.

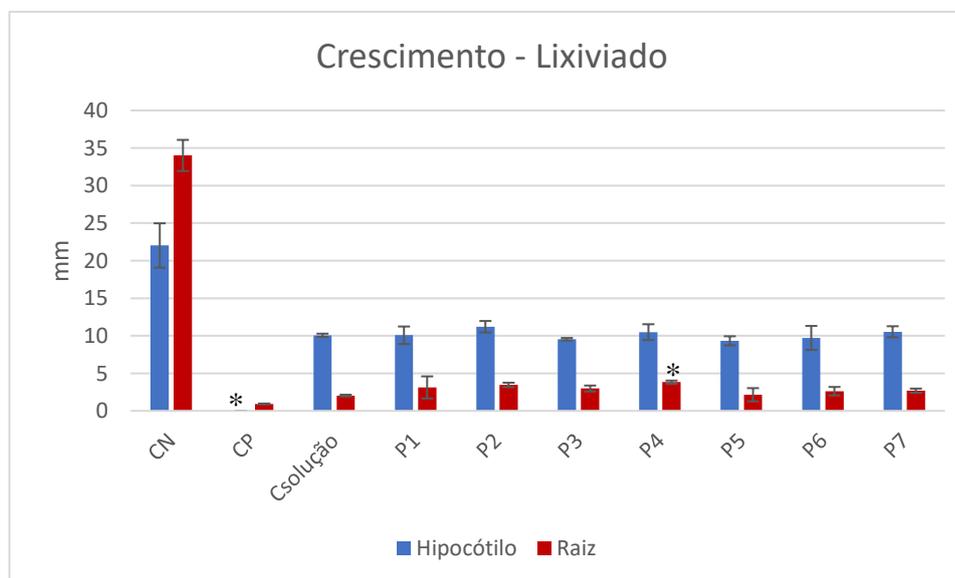
Foram realizadas também mensurações das raízes e dos hipocótilos de *L. sativa*, para avaliação do crescimento das plantas. Os resultados estão dispostos nas Figuras 4 (solubilizado do sedimento) e 5 (lixiviado do sedimento). As fotos representativas das raízes após exposição a esses tratamentos estão apresentadas nas Figuras 6 (solubilizado) e 7 (lixiviado).

Figura 4. Médias de crescimento de hipocótilo e raiz de *Lactuca sativa* para as diferentes amostras de sedimento (solubilizado), coletados em rios sob influência de mineradora de ouro da cidade de Paracatu-MG.



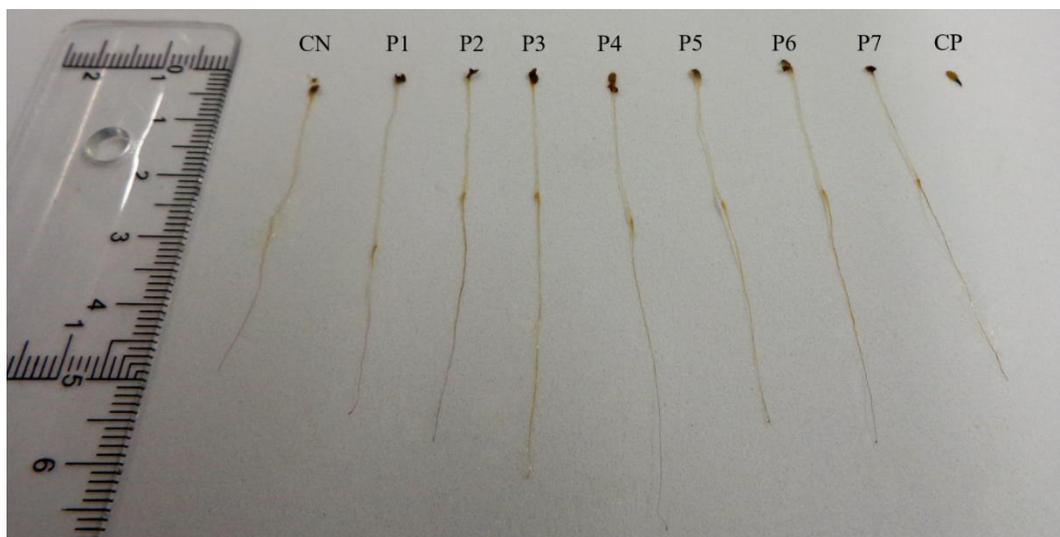
CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (sulfato de zinco 0,05 M). *Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao CN, de acordo com ANOVA/Dunnet.

Figura 5. Médias de crescimento de hipocótilo e raiz de *Lactuca sativa* para as diferentes amostras de sedimento (lixiviado), coletados em rios sob influência de mineradora de ouro da cidade de Paracatu-MG.



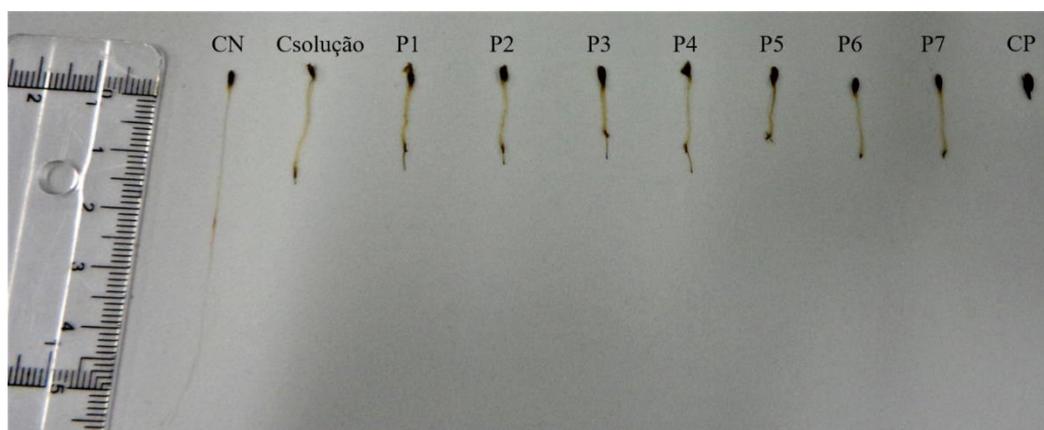
CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (sulfato de zinco 0,05 M); C_{solução} = controle da solução de extração (solução de extração utilizada para obtenção do lixiviado). *Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao C_{solução}, de acordo com ANOVA/Dunnet.

Figura 6. Raízes de *Lactuca sativa* após exposição às diferentes amostras de sedimento (solubilizado).



CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (sulfato de zinco 0,05 M). Fonte: Próprio autor.

Figura 7. Raízes de *Lactuca sativa* após exposição às diferentes amostras de sedimento (lixiviado).



CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (sulfato de zinco 0,05 M); Csolução = controle da solução de extração (solução de extração utilizada para obtenção do lixiviado). Fonte: Próprio autor.

Os resultados para crescimento de hipocótilo mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o CN, tanto para o solubilizado quanto para o lixiviado. Entretanto, para o crescimento de raiz, foi possível observar, para ponto P4, resultados estatisticamente diferentes do CN, nos dois extratos analisados.

Os ensaios realizados com extrato solubilizado dos sedimentos de rios sob a influência de uma mineradora de ouro da região de Paracatu-MG estão comparados com os dados obtidos nos ensaios de fase 1 da extração sequencial de metais de solo e sedimentos, proposta por

Mortatti *et al.* (2013). Essa comparação tem como embasamento o fato da fração obtida na fase 1 estar relacionada com os elementos metálicos que primeiramente se solubilizam nesses ambientes (fração solúvel).

Para o solubilizado, foram registradas as presenças de Fe e Mn em todos os pontos analisados, mas, somente o P4 exibiu resultados estatisticamente diferentes do CN. Esta resposta pode ser devido a uma ausência ou baixa concentração de elementos fitotóxicos (Tabela 3 – F1 – elementos abaixo do limite de quantificação), como o As e Al, que pode ter permitido um maior desenvolvimento das raízes.

Nos demais pontos, as amostras não se mostraram fitotóxicas (parâmetro crescimento de raiz), apesar da presença de Al e As nos pontos P3, P6 e P7. Nesses pontos (P3, P6 e P7), foi observada uma quantidade maior de Fe nas amostras (Tabela 3), o que pode ter levado a uma maior adsorção do As pelo Fe, conforme citado por Stollenwerk (2003), inativando o potencial fitotóxico desses elementos, mantendo, assim, o desenvolvimento radicular equiparável ao do CN. Para os demais pontos (P1, P2 e P5), que apresentaram, como o P4, níveis de Al e As abaixo do limite de quantificação, também apresentaram teores mais baixos de Fe do que os registrados para o P4, sendo então insuficiente para induzir um maior desenvolvimento radicular.

Os resultados dos ensaios obtidos com os extratos lixiviado foram comparados com os obtidos nas fases 2 e 3 da extração sequencial de metais de solo e sedimentos, também proposta por Mortatti *et al.* (2013). Essa equivalência foi realizada devido ao fato dessas fases estarem envolvidas com biodisponibilizações posteriores às de fase 1, portanto de mais difícil remoção das amostras ambientais. Reforçando ainda essa relação entre essas fases com o extrato lixiviado está a necessidade de tratamentos acidificantes específicos, como o uso de ácido acético, também usado no processo de extração por lixiviação. Pelas análises químicas, realizadas com os sedimentos dos rios em estudo, foram encontrados os elementos Al, As, Cd, Pb, Cu, Sc, Fe e Mn. Por essas análises, foi possível encontrar a mesma relação de fitotoxicidade desse extrato com o extrato solubilizado, onde o P4 apresentou o mesmo comportamento de ausência de fitotoxicidade (aumento do crescimento da raiz) e as mesmas relações entre os elementos químicos presentes nas amostras e o potencial adsorvente do Fe.

3.3. Viabilidade celular – teste de exclusão do corante Azul de Tripán

Para avaliar a citotoxicidade dos sedimentos estudados, foi utilizado o teste de exclusão do corante Azul de Tripán em linhagem celular de hepatoma humano HepG2/C3A. Este teste

consiste na avaliação da integridade da membrana, onde as células não viáveis aparecem com coloração azulada, quando observadas ao microscópio, enquanto células viáveis permanecem sem coloração. Após a contagem das células em câmara de Neubauer, os valores obtidos de células viáveis foram transformados em porcentagem, como disposto na Tabela 7.

Pelos resultados obtidos, foi possível observar que somente o extrato solubilizado do sedimento do ponto P6 foi estatisticamente diferente o CN, porém com resultados de viabilidade superior a 80%. Essa diferença pode estar relacionada com a presença de As na amostra (0,79 mg/kg – Tabela 3 – F1), que foi a maior concentração observada entre as amostras de solubilizado. Para os ensaios com o lixiviado, embora os valores de As tenham sido mais elevados que os do solubilizado (Tabela 3 – F2 e F3), esses não se mostraram tóxicos para as células HepG2/C3A. Esses resultados mostram que o extrato solubilizado se mostrou mais sensível para avaliar a citotoxicidade de sedimentos de rios contaminados com metais. Dados descritos por Alarifi *et al.* (2013) mostraram que o As promoveu diminuição da viabilidade celular em células HepG2, de acordo com o aumento da sua concentração e tempo de exposição (quanto maior o tempo, maior a citotoxicidade registrada). Desta forma, podemos inferir que o tempo de exposição de 3 horas, utilizado neste estudo, pode não ter sido suficiente para estimar os reais efeitos citotóxicos dos contaminantes presentes nos sedimentos, como o As.

Tabela 7. Porcentagem de viabilidade celular da linhagem HepG2/C3A, obtida pelo teste de exclusão do corante Azul de Tripán, após exposição das células às amostras de sedimento (solubilizado e lixiviado), coletados em rios sob influência de mineradora de ouro da cidade de Paracatu-MG.

	Solubilizado		Lixiviado	
	[1]	[2]	[1]	[2]
CN	96,76 ± 0,80	96,76 ± 0,80	97,16 ± 0,45	97,16 ± 0,45
CP	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C_{solução}	-	-	96,90 ± 0,28	96,79 ± 0,23
P1	96,23 ± 0,32	97,04 ± 1,66	96,55 ± 0,36	95,43 ± 0,53
P2	95,52 ± 3,53	98,92 ± 1,53	96,47 ± 0,09	97,16 ± 1,32
P3	96,60 ± 0,30	95,06 ± 5,61	96,71 ± 0,97	92,23 ± 0,28
P4	94,01 ± 3,42	96,31 ± 0,43	96,67 ± 2,90	95,31 ± 3,89
P5	96,08 ± 1,82	92,08 ± 1,01	97,23 ± ,037	96,61 ± 0,58
P6	84,63 ± 1,53*	90,00 ± 3,54	96,69 ± 1,75	96,09 ± 0,93
P7	96,89 ± 1,37	96,20 ± 0,38	96,45 ± 0,78	95,91 ± 3,58

Valores expressos em Média ± Desvio Padrão. CN = controle negativo (meio de cultura sem soro); CP = controle positivo (Triton X-100, 1%); C_{solução} = controle da solução de extração (meio de cultura sem soro + solução de extração utilizada para obtenção do lixiviado). [1] = 200 µL/mL; [2] = 400 µL/mL. *Valor estatisticamente significativo (p<0,05), em relação ao CN, de acordo com teste ANOVA/Dunnet.

4. Conclusão

As análises químicas, assim como a extração sequencial, se mostraram eficientes ferramentas para avaliação da presença de metais nas amostras dos sedimentos avaliados e da biodisponibilidade de metais presentes nestes sedimentos. Os valores de RAC obtidos neste estudo mostraram que a maior parte dos metais estudados apresenta baixo risco para o meio ambiente. No entanto, o Pb e Cu apresentaram médio risco para o ribeirão São Pedro e o As médio risco para o ribeirão Santa Isabel. Os sedimentos do ribeirão Santa Isabel ainda apresentaram médio risco com relação ao Fe e alto risco com relação ao Mn, o que requer estudos mais detalhados, uma vez que esse ribeirão é utilizado para captação de água para abastecimento público do município de Paracatu-MG.

As áreas de mineração da região de Paracatu-MG já possuem um solo e sedimento enriquecidos por metais decorrentes da sua própria composição natural, porém esses valores podem ser ainda aumentados pelas atividades de extração de ouro desenvolvidas no local. Desta forma, os cálculos de EF e Igeo foram importantes para elucidar os impactos ambientais causados pela mineração no Morro do Ouro. Desta maneira, pode-se concluir que os metais presentes nos 3 pontos avaliados do córrego Rico, que ficam à jusante da mineração, são impactados tanto por fontes naturais quanto de origens antrópicas, enquanto que os pontos próximos à barragem de rejeitos sofrem, principalmente influência das atividades da mineradora.

Os resultados dos ensaios com *L. sativa* indicaram potencial fitotóxico no ponto P3 (solubilizado), provavelmente devido aos teores de As, Fe e Mn presentes nessa amostra, que podem estar interferindo na germinação dessas sementes. Também foi observado que tanto o lixiviado como o solubilizado de sedimentos do P4 induziram aumento do crescimento das raízes, que pode estar relacionado com os baixos índices de metais fitotóxicos nas amostras, possibilitando maior desenvolvimento das raízes. Já os ensaios de viabilidade celular mostraram que ambos os extratos (solubilizado e lixiviado) não foram tóxicos às células HepG2/C3A, quando expostos por 3 horas.

5. Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

6. Referências

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR1006: Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004a.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR1005: Procedimento para obtenção de lixiviado de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004b.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological profile for manganese**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, 2012. Disponível em: < <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp151-c1-b.pdf> > Acesso em: agosto/2019.
- AGUIAR, L.G.S. **Avaliação da contaminação potencial por metais em solos e sedimentos na região da Mina Morro do Ouro, Paracatu – MG**. Dissertação (Mestrado em Geociências) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2018 (132f.).
- ALARIFI, S. *et al.* Arsenic trioxide-mediated oxidative stress and genotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. **OncoTargets and Therapy**, v. 6, p.75-84, 2013.
- ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. John Wiley and Sons, Inc. New York, 1990, 338 p.
- ARAÚJO, R. P. A. *et al.* Avaliação da Qualidade de Sedimentos In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 1 ed. São Carlos: Editora Rima, 2006, Cap. 13, p. 293-320.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622p.
- BOWEN, H. J. M. **Environmental chemistry of the elements**. New York: Academic Press, 1979. 333p.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA nº 454, de 01/11/2012**. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional. Brasília: Diário Oficial da União, 08 nov 2012.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia - MME. **Boletim Informativo do Setor Mineral 2019**. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/documents/10584/2674215/Boletim+Informativo+do+Setor+Mineral+2019/606fef71-b399-47b7-8cac-b0652e7ffe89?version=1.0>. Acesso em: ago.2019
- CCME, Canadian Council of Ministers of the Environment. **Protocol for the derivation of Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life**. CCME, Ottawa, 1995.
- CCME, Canadian Council of Ministers of the Environment. **Sediment Quality Index 1.0**. CCME, Ottawa, 2002.

CHAPADEIRO, E. *et al.* Estudos hidrogeológicos na mina Morro do Ouro, Paracatu –MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS, 14., 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ABAS, 2006.

CHARLES, J. *et al.* Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.2057-2064, 2011.

CHEN, G.; WHITE, P.A. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. **Mutation Research**, v.567, p.151–225, 2004.

COTTA, J. A. O.; REZENDE, M. O. O.; PIOVANI, M. R. Avaliação do teor de metais em sedimento do rio Betari no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira - PETAR, São Paulo, Brasil. **Química Nova**, v. 29, p.40-45, 2006.

FARIAS, C. E. G. Mineração e Meio Ambiente no Brasil - PNUD Contrato 2002/001604. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos Ciência, Tecnologia e Inovação**. São Paulo, 2002.

FERNANDES, A.M. *et al.* Combined analysis of trace elements and isotopic composition of particulate organic matter in suspended sediment to assess their origin and flux in a tropical disturbed watershed. **Environmental Pollution**, v.218, p.844-854, 2016.

FERRAND, J.L.; HAMELIN, B., MONACO, A. Isotopic tracing of anthropogenic Pb inventories and sedimentary fluxes in the Gulf of Lion (NW Mediterranean Sea). **Cont. Shelf Res.**, v.19, p.23-47, 1999.

FERREIRA, M.M. **Estudo da mobilidade e da biodisponibilidade do arsênio em solos e sedimentos de Paracatu-MG**. Niterói, 2014. 127 f. Tese (Doutorado em Geociências – Geoquímica Ambiental) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2014.

FÖRSTNER, O.; WITTMANN, G. T. H. **Metal pollution in the aquatic environment**. Springer-Verlag, 1983.

FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, 5ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., p.360-361, 2005.

GAGNÉ, F. *et al.* Toxicity evaluation of organic sediment extracts resolved by size exclusion chromatography using rainbow trout hepatocytes. **Chemosphere**, v. 39, n. 9, p. 1545–1570, 1999.

HARIKUMAR, P.S.; JISHA, T.S. Distribution pattern of trace metal pollutants in the sediments of an urban wetland in the southwest coast of India. **International Journal of Engineering, Science and Technology**, v.2(2), p.840-850, 2010.

HOLLERT, H. *et al.* A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Journal of Soils and Sediments**, v. 3, n. 3, p. 197–207, 2003.

IBRAM. **Relatório Anual de Atividades** - Julho de 2017 a junho de 2018. p. 40, 2018. Disponível em: <http://portaldamineracao.com.br/ibram/wp-content/uploads/2018/07/Diagramação_RelatórioAnual_versãoweb.pdf>. Acesso em: agosto/2019.

KAFRUNI, S. Proximidade entre mineradora e população põe moradores de Paracatu em risco. **Correio Braziliense**, Brasília, 20 mar. 2015. Disponível em: <http://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/cidades/2015/03/14/interna_cidadesdf,475445/proximidade-mineradora-populacao-poe-moradores-de-paracatu-em-risco.shtml>. Acesso em: jan.2016.

LIANG, X. *et al.* Source identification and risk assessment based on fractionation of heavy metals in surface sediments of Jiaozhou Bay, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 128, p. 548-556, 2018.

LOPES, P.R.M. **Biorremediação de um solo contaminado com óleo lubrificante pela aplicação de diferentes soluções de surfactante químico e biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeroguminosa* LBI**. Tese DSc. Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2014.

LOSKA, K. *et al.* Use of enrichment, and contamination factors together with geoaccumulation indexes to evaluate the content of Cd, Cu, and Ni in the Rybnik water reservoir in Poland. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.93, p.347-365, 1997.

LOUIS, K. S.; SIEGEL, A. C. Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. **Mammalian Cell Viability**, p.7–12, 2011.

MAÑAS, P.; DE LAS HERAS, J. Phytotoxicity test applied to sewage sludge using *Lactuca sativa* L. and *Lepidium sativum* L. seeds. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v.15(2), p.273–280, 2017.

MELLO, W. Z. *et al.* Arsenic in atmospheric particulate matter, MG, Brazil. Proceedings of One Century of the Discovery of Arsenicosis in Latin America (1914-2014): As 2014. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ARSENIC IN THE ENVIRONMENT, 5., 2014, Buenos Aires. **Proceedings...** Buenos Aires: CRC Press, 2014.

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

MISHELL, B. B.; SHIIGI, S. M. **Selected Methods in Cellular Immunology**. San Francisco: Freeman and Company, 1980. 486 p.

MIŠÍK, M. *et al.* Acute toxic and genotoxic activities of widely used cytostatic drugs in higher plants: Possible impact on the environment. **Environmental Research**, v.135, p.196-203, 2014.

MILLER, C.V. *et al.* Water Quality in the Upper Anacostia River, Maryland: Continuous and discrete Monitoring with Simulations to Estimate Concentrations and Yields, 2003-05. **U.S. Geological Survey Investigations Report**, 2007-5142, p. 43, 2007.

- MÖLLER, J. C.; BATELOCHI, M.; AKITI, Y.; SHARRATT, M.; BORGES, A. L. Geologia e caracterização dos recursos minerais de Morro do Ouro, Paracatu, Minas Gerais. **Bacia do São Francisco: Geologia e Recursos Naturais**, SBG, Belo Horizonte, p. 199-234, p. 199-234, 2001.
- MORTATTI, J., *et al.* Composição química dos sedimentos fluviais em suspensão na bacia do rio Piracicaba: extração seletiva de elementos traço. **Geochimica Brasiliensis**, v.16, p.123-141, 2002.
- MORTATTI, J., MORAES, G.M., PROBST, J.L. Heavy metals distribution in recente sediments along the Tietê River basin (São Paulo, Brazil). **Geochemical Journal**, v.46, p.13-19, 2012.
- MORTATTI, J. *et al.* Distribution of heavy metals in the geochemical phases of sediments from the Tietê River, Brazil. **Chemical Speciation & Bioavailability**, v.25, p.194-200, 2013.
- MOZETO, A. A. **Manejo da qualidade da água e da dinâmica do sedimento e do particulado da represa do Guarapiranga e do Rio Grande**, RMSP, UFSCAR: São Carlos, 1996. (Projeto RHAE, processo nº 610419/95-1).
- MÜLLER, G. **Schwermetalle in sedimenten des Rheins - Verfinderungen seit 1971**. Umschau. v. 79, p. 778-783. 1979.
- MURRAY, K.S. *et al.* Particle size and chemical control of heavy metals in bed sediment from the Rouge River, Southeast Michigan. **Environmental Science & Technology**, v.33, p.987-992, 1999.
- PALMIERI, M. J. *et al.* Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research**, v.763, p.30-35, 2014.
- PERIN, G. *et al.* Heavy metal speciation in the sediments of Northern Adriatic Sea. A new approach for environmental toxicity determination. **Heavy Metals in the Environment**, v.2, p.454-456, 1985.
- PLUMLEE, G.S. The environmental geology of mineral deposits. In: PLUMLEE, G.S.; LOGSDON, M.J. The environmental geochemistry of mineral deposits, Part A: Processes, techniques, and health issues. **Society of Economic Geologists, Reviews in Economic Geology**, v.6A, p.71-116, 1999.
- RABELLO-GAY, M. N. Testes com organismos superiores. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e critérios de avaliação**, Ribeirão Preto – SP. Sociedade Brasileira de Genética, 1991, p. 59-75.
- RESENDE, P. S. **Avaliação da distribuição e mobilidade de elementos traço em sedimentos da bacia hidrográfica do Rio São Francisco**. Belo Horizonte, 2009. 128 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química Analítica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- RODRIGUES, A.S.; NALINI JUNIOR, H.A. Valores de fundo geoquímico e suas implicações em estudos ambientais. **Revista Escola de Minas**, v.62, p.155-165, 2009.

RUGOLO FILHO, R. A. **Mineralização Aurífera da Mina Morro do Ouro, Paracatu-MG.** Universidade Federal do Rio de Janeiro (Trabalho de Conclusão de Curso em Geologia). 57 pp, 2004.

SANTANA FILHO, S. D. S. **Distribuição de arsênio e oxidação de materiais sulfetados de áreas de mineração de ouro no Estado de Minas Gerais.** Viçosa, 2005. 177 f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade de Viçosa, Viçosa, 2005.

SCHWARTZ, R. *et al.* Assessment of highly polluted fluvisol in the spittelwasser floodplain based on national guideline values and MNA-Criteria. **Journal of Soils and Sediments**, v. 6, n. 3, p. 145–155, 2006.

SERVARAJ, V.; YEAGER-ARMSTEAD, M.; MURRAY, E. Protective and antioxidant role of selenium on arsenic trioxide-induced oxidative stress and genotoxicity in the fish hepatoma cell line PLHC-1. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, p.2861-2869, 2012.

SILVEIRA, G. L. *et al.* Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v.178, p.359-367, 2017.

SOBRERO, M.C.; RONCO, A.E. Capítulo 4.4: Protocolos de Prueba. Bioensayo de Toxicidad Aguda con Semillas de Lechuga (*Lactuca sativa*). In: Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. **Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones.** Gabriela Castillo editora. Edición conjunta IDRC, SEMARNAT, IMTA, México.188 pp, 2004.

STERCKEMAN, T. *et al.* Trace element distributions in soils developed in loess deposits from northern France. **European Journal of Soil Science**, v.57, p.392–410, 2006.

STOLLENWERK, K.G. Geochemical processes controlling transport of arsenic in groundwater: a review of adsorption. In: Alan H, Stollenwerk WKG (eds) **Arsenic in ground water—geochemistry and occurrence** ed. Kluwer Academic Publishers New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, pp 67–100, 2003.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, v.21, p.A.3B.1-A.3B.2, 1997.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal.** 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TANI, Y. *et al.* Interaction of Inorganic Arsenic with Biogenic Manganese Oxide Produced by a Mn-Oxidizing Fungus, Strain KR21-2. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 24, p. 6618–6624, 2004.

TESSIER, A.; CAMPBELL, P.G.C.; BISSON, M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. **Analytical Chemistry**, v.51, p.844–851, 1979.

TOYOKUNI, S. Iron as a target of chemoprevention for longevity in humans. **Free Radical Research**, v. 45(8), p.906-917, 2011.

WANG *et al.* Fractionation of heavy metals in shallow marine sediments from Jinzhou Bay, China. **Journal of Environmental Science**, v.22(1), p.23–31, 2010.

WHO World Health Organization – IARC – **International Agency for Research on Cancer**. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications>>. Acesso em: agosto/2019.

ZHANG, J.; LIU, C.L. Riverine composition and estuarine geochemistry of particulate metals in China e weathering features, anthropogenic impact and chemical fluxes. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v.54, p.1051-1070, 2002.

Artigo 2. Análise ecotoxicológica de água e sedimentos de rios de uma região de mineração de ouro rica em arsenopirita

Nádia Aline Corroqué; Kemellyn Cristina Panchera; Giovana Segati Canizela; Willian Barbosa Simioni; Maria Tereza Pamplona-Silva; Maria Aparecida Marin-Morales.

Resumo

As atividades de mineração da região de Paracatu-MG, apesar de serem favoráveis para o cenário socioeconômico do país, são preocupantes, quanto aos possíveis impactos que geram no ambiente. Este estudo teve o objetivo de avaliar a toxicidade de amostras de água e de sedimento de rios desta região, por meio de bioensaios com *Allium cepa* e *Lactuca sativa*. As águas e os sedimentos foram coletadas em 3 regiões distintas no entorno da área de mineração: 1- área a jusante da mina Morro do Ouro, onde está localizado o município de Paracatu (P1, P2 e P3); 2- área a jusante da barragem de rejeitos da mina Morro do Ouro (P4, P5 e P6); e 3- área em que ocorre a captação de água para abastecimento público de Paracatu (P7 e P8). De acordo com os resultados obtidos para *A. cepa*, todas as amostras de água se mostraram citotóxicas e genotóxicas, enquanto que as amostras de sedimento se mostraram genotóxicas. Foi observado ainda potencial mutagênico para as amostras de água dos pontos P2, P3 e P8 e de sedimento dos pontos P2, P5 e P7. Já para *L. sativa*, não foram observados resultados significativos para taxa germinação, porém foi observada diminuição no crescimento das raízes por ação das águas dos pontos P1, P6 e P8, o que enfatiza o potencial citotóxico desses pontos. Os resultados observados neste estudo mostram riscos potenciais à saúde humana, assim como à biota exposta nestes corpos d'água.

Palavras-chave: *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, contaminação por arsênio.

1. Introdução

O município de Paracatu, situado no estado de Minas Gerais, vem sendo alvo de atividades mineradoras desde o início do período de mineração brasileira, que se deu no século XVIII. Após os anos 80, a mineração do ouro passou a ser legalizada na região, dando início às operações no Morro do Ouro, que é uma das maiores lavras a céu aberto do mundo (AGUIAR, 2018; PARACATU, 2019).

A mineração, apesar de ser uma atividade importante no cenário socioeconômico do país, também traz impactos negativos para o meio físico e para a biota relacionada ao local impactado. Essas atividades contaminam as diversas malhas ambientais, como água e sedimentos dos recursos hídricos, ar e solo, bem como promovem poluição sonora e subsidência do terreno (FARIAS, 2002).

A extração de ouro no Morro do Ouro é uma atividade especialmente preocupante, pois o ouro da região está associado a sulfetos, como o mineral arsenopirita (FeAsS) que, quando passa por processo de extração, libera arsênio (As) para o ambiente (NORDSTROM; SOUTHAM, 1997). De acordo com Aguiar (2018), o Morro do Ouro possui baixos teores de ouro, o que requer maior movimentação e disposição de materiais para extração, gerando maior volume de rejeitos e efluentes, que podem levar à contaminação de águas, sedimentos e solos.

Os metais pesados, de forma geral, quando em altas concentrações podem causar sérios riscos ao ambiente e à saúde humana (BAIRD, 2002). Por esta razão, atividades antrópicas que disponibilizam esses elementos para o ambiente devem ser amplamente investigadas, quanto aos seus riscos potenciais. Para uma avaliação consistente dos impactos ambientais, devem ser realizados, além de análises químicas convencionais, que informam os tipos e quantidades de contaminantes presentes no local investigado, ensaios biológicos que estimem as possíveis ações dos contaminantes sobre a biota eventualmente exposta.

A avaliação dos efeitos adversos de contaminantes ambientais sobre a biota pode ser realizada por organismos de diversas categorias taxonômicas (microrganismos, plantas e animais), denominados de bioindicadores. Os bioindicadores funcionam como “biosensores” da presença de compostos químicos, constituindo ferramentas eficientes para compreensão dos impactos ambientais (ESPÍNDOLA; BRIGANTE; DORNFELD, 2003). De acordo com Palmieri *et al.* (2016), os bioindicadores vegetais são validados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), por serem considerados eficientes para detecção da genotoxicidade ambiental. Dentre esses bioindicadores, destacam-se as espécies *Allium cepa* (cebola) (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SOUZA; GUEDES; FONTANETTI, 2016; HARA; MARIN-MORALES, 2017; PAMPLONA-SILVA; GONÇALVES; MARIN-MORALES, 2018; SOMMAGGIO *et*

al., 2018, CARITÁ; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2019), e *Lactuca sativa* (alface) (SOBRERO; RONCO, 2004; BAGUR-GONZALEZ *et al.*, 2011; CHARLES *et al.*, 2011; PRIAC; BADOT; CRINI, 2017).

As alterações biológicas que expressam a exposição e/ou o efeito tóxico de compostos químicos são denominadas de biomarcadores. Um biomarcador de qualidade ambiental seria uma modificação biológica específica, que aparece em decorrência de exposição e/ou de efeito tóxico causado por poluentes presentes no ambiente. Os biomarcadores podem, então, solucionar boa parte das incertezas das avaliações de riscos ecológicos, fornecer indicativos do potencial de danos à biota, destacar estressores não estimados na área de estudo ou ainda revelar danos causados por metabólitos de poluentes, que não foram detectados pelas análises químicas. Portanto, esta abordagem é particularmente útil para avaliar contaminantes desconhecidos, misturas complexas ou resíduos perigosos (GERAS'KIN; EVSEEVA; OUDALOVA, 2011).

A germinação de sementes é um bom biomarcador de toxicidade ambiental, pois envolve muitos processos fisiológicos, conferindo assim grande sensibilidade para a detecção de efeitos causados por fatores externos e substâncias tóxicas. Os processos de desenvolvimento da radícula e do hipocótilo também envolvem vários processos altamente vulneráveis à ação de compostos tóxicos. Assim, os parâmetros de desenvolvimento radicular e do hipocótilo são eficientes para avaliar efeitos tóxicos de compostos solúveis, mesmo quando esses estão em concentrações muito baixas, insuficientes para inibir a germinação (SOBRERO; RONCO, 2004). A mensuração do crescimento radicular tem sido considerada eficiente para avaliação de toxicidade aguda de diferentes contaminantes, além de ser um método simples, de grande sensibilidade (KAPANEN; ITAVAARA, 2001; MISIK *et al.*, 2014; PALMIERI *et al.*, 2014) e de baixo custo. Bioensaios de germinação e de desenvolvimento de raízes, desenvolvidos com o bioindicador *Lactuca sativa*, vem sendo indicados pela *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) (USEPA, 1996), assim como por outros órgãos reguladores (ISO, 2004; OECD, 2003), para avaliar toxicidade de diferentes substâncias.

A espécie *Allium cepa* vem sendo muito utilizada como bioindicador de qualidade ambiental, por essa espécie apresentar características vantajosas de análise, como células meristemáticas homogêneas, cromossomos grandes e em pequena quantidade ($2n = 16$), o que facilita a coloração e ainda permite uma melhor análise dos danos cromossômicos e das alterações no ciclo celular (KURAS *et al.*, 2006; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Vários estudos utilizando *A. cepa* têm mostrado eficiência para avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de amostras ambientais (BIANCHI; ESPINDOLA; MARIN-MORALES, 2011; NUNES *et al.*, 2011; HERRERO *et al.*, 2012; MAZZEO *et al.*, 2015;

SOMMAGGIO *et al.*, 2018). Esse teste ainda apresenta uma alta correlação com os ensaios desenvolvidos com mamíferos (CHAUHAN; SAXENA; GUPTA, 1999; RANK; NIELSEN, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Considerando o potencial poluidor de atividades de mineração, especialmente as do Morro do Ouro, e a eficiência de bioindicadores vegetais para avaliar impactos ambientais, este estudo teve como objetivo investigar a toxicidade das amostras de água e de sedimento de rios de uma área sob influência de uma mineradora de ouro, localizada no município de Paracatu-MG, por meio dos bioindicadores vegetais *A. cepa* e *L. sativa*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material biológico

Foram utilizadas neste estudo sementes isentas de defensivos, das espécies *A. cepa* (variedade Baía Periforme) e de *L. sativa* (variedade crespa Grand Rapids), obtidas junto à empresa “Isla Sementes Ltda[®]”.

2.2. Amostras ambientais

Para a realização dos ensaios de avaliação dos impactos da mineração de ouro da cidade de Paracatu, foram coletadas, no inverno de 2016, amostras de água e de sedimentos em diferentes pontos: pontos P1, P2 e P3, localizados no Córrego Rico; pontos P4, P5 e P6, localizados na região da barragem de rejeitos Santo Antônio, no córrego Santo Antônio, ribeirão Santa Rita e ribeirão São Pedro, respectivamente; ponto P7, localizado no ribeirão Santa Isabel, próximo ao ponto de captação de água para abastecimento público do município de Paracatu; e o ponto P8, água de abastecimento público do município de Paracatu, coletada no cavalete do consumidor. Os pontos de coleta seguem esquematizados na Figura 1 e descritos na Tabela 1.

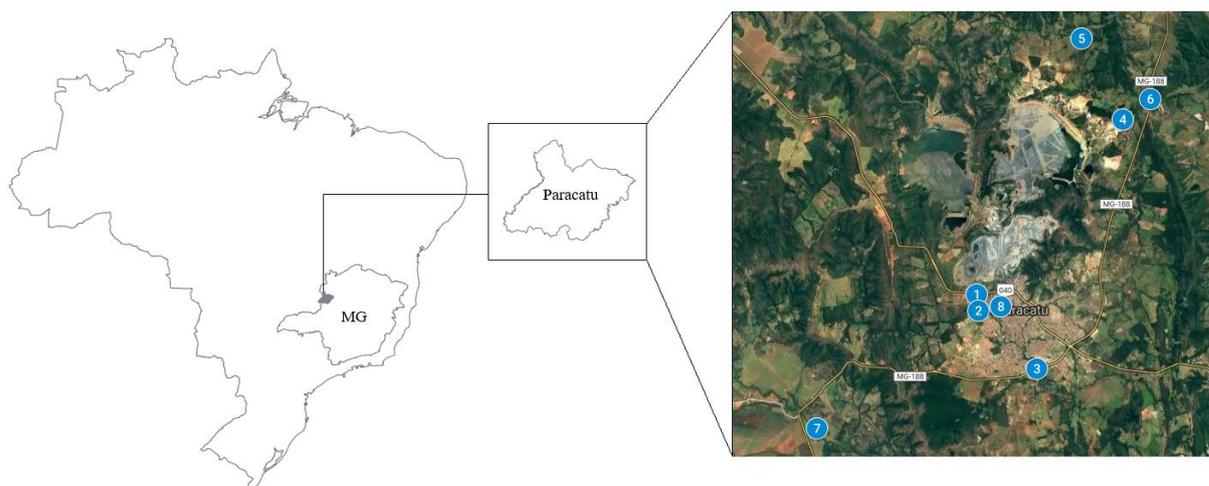
A água e o sedimento dos rios foram coletados por meio de amostragem composta. As amostras de água superficial foram coletadas com o auxílio de um balde e as amostras de sedimento, com o auxílio de um pegador de Ekman-Birge. Após a coleta, as amostras de água foram fixadas com ácido acético (2%), para inibição das atividades microbiológicas, nos frascos de análise biológica e com ácido nítrico (2%) nos frascos de análise química. Para acondicionamento destas amostras, foram utilizados frascos e embalagens de polietileno de alta densidade (Figura 3), que são atóxicos e inertes, uma vez que vidros e metais não são indicados para amostras contendo metais (ANA; CETESB, 2011). Tanto as amostras de água quanto as de sedimento foram mantidas refrigeradas durante o transporte até o Laboratório de Mutagênese

Tabela1. Descrição dos pontos de coleta das amostras de sedimento, distribuídos em uma área sob influência de uma mineradora de ouro (Paracatu-MG).

Pontos	Águas superficiais	Localização	Coordenadas (UTM)			Tipo
			Fuso	X	Y	
P1	Córrego Rico	A jusante da mineradora e a montante da confluência com o Córrego Espalha	23 K	298912	8096066	Arenoso
P2	Córrego Rico	A jusante da confluência com o Córrego Espalha e a montante do perímetro urbano (Paracatu)	23 K	298976	8095370	Arenoso
P3	Córrego Rico	Ao final do perímetro urbano (Paracatu)	23 K	301513	8092911	Arenoso
P4	Córrego Santo Antônio	A jusante da barragem de rejeitos	23 K	305055	8103539	Argiloso
P5	Ribeirão Santa Rita	Antes da confluência com o Córrego São Domingos	23 K	303276	8106996	Argiloso
P6	Ribeirão São Pedro	Após receber contribuições do ribeirão Santa Rita e do Córrego Santo Antônio	23 K	306214	8104425	Argiloso
P7	Ribeirão Santa Isabel	Antes da captação da ETA (COPASA)	23 K	292183	8090285	Argiloso
P8	-	Água de abastecimento público - cavalete do consumidor	23K	299936	8095537	-

Ambiental do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências da Unesp, Rio Claro, onde foram armazenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da realização das análises.

Figura 1. Localização do município de Paracatu-MG (latitude $17^{\circ}13'20''$ S, longitude $46^{\circ}52'29''$ W). Pontos de coleta das amostras de água e sedimento: 1- (P1), 2- (P2) e 3- (P3) - Córrego Rico; 4- (P4) - Córrego Santo Antônio; 5- (P5) - Ribeirão Santa Rita; 6- (P6) - Ribeirão São Pedro; 7- (P7) - Ribeirão Santa Isabel; 8- (P8) - Água de abastecimento público.



Fonte: Adaptado de Google My Maps

2.3. Análises químicas e físico-químicas

2.3.1. Análises químicas

O procedimento de digestão total, para quantificação do teor total dos elementos traço, foi realizado para as amostras de sedimento e para o material de referência, certificado SRM 1944, conforme o método USEPA 3051A modificado, utilizando 0,150 g de amostra seca com a adição de 3 mL de HNO_3 e 1 mL de HCl glacial, onde a digestão ocorreu, com aquecimento por radiação micro-ondas (Berghof SpeedWave 4). O aquecimento utilizado para a digestão foi realizado em uma rampa de aquecimento com 2 etapas. Etapa 1 (aquecimento): pressão 50 bar, potência 80%, temperatura $175\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 10 min. Etapa 2 (resfriamento): pressão 0 bar, temperatura $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 20 min.

Para as determinações dos metais alumínio (Al), arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), escândio (Sc), ferro (Fe), manganês (Mn) e mercúrio (Hg) nas amostras de água e sedimento, foi utilizado a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES – iCAP 6000 Series ICP Spectrometer, Thermo Scientific), equipado com um nebulizador V-groove (Glass Expansion, AUS) e câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, AUS). O sistema ICP-OES foi operado de acordo com as seguintes condições:

potência aplicada 1150 W; vazão do gás do plasma 10 L min⁻¹; vazão do gás auxiliar 0,5 L min⁻¹; vazão do gás de nebulização 0,75 L min⁻¹; vazão de introdução da amostra 3,0 mL min⁻¹. Foram empregadas as linhas espectrais: Determinações de Al, As, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb e Sc (Al 396,1 nm; As 189,0 nm; Cd 226,5 nm; Cu 324,7 nm; Fe 259,9 nm; Hg 184,9 nm; Mn 257,6 nm; Pb 220,3 nm e Sc 361,3 nm). Todas as análises químicas foram realizadas no Centro de Estudos Ambientais (CEA/UNESP).

2.3.2. Análises físico-químicas

Foram realizadas medições das amostras de água *in situ*, no momento da coleta, por meio da sonda multiparâmetro Horiba (Multi Water Quality Chequer U-50 Series). Os parâmetros avaliados pela sonda foram: temperatura, pH, potencial de oxirredução (ORP), condutividade, turbidez, oxigênio dissolvido (OD), sólidos totais dissolvidos (TDS) e salinidade.

2.4. Bioensaios com sementes de *Allium cepa*

2.4.1. Exposição às amostras de água

Sementes de *A. cepa* foram dispostas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, forradas com papel de filtro, contendo 5 mL das diferentes amostras de água coletadas (P1 a P8). As amostras de água para essa exposição foram diluídas (água do ponto em água ultrapura 1:2 - v/v). Os tratamentos controles foram realizados em água ultrapura, para o controle negativo (CN), e em 10 mg/L de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3), para o controle positivo (CP).

2.4.2. Exposição às amostras de sedimento

Sementes de *A. cepa*, foram dispostas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 50 g de sedimento das diferentes amostras coletadas (P1 até P7) e água (ultrapura) suficiente para atingir a capacidade de retenção de água nos sedimentos. Este ajuste foi feito incorporando água ao sedimento, até que este apresentasse um excedente de água, perceptível como um fino filme sobre o sedimento. Os tratamentos controles foram realizados com areia e água ultrapura, para o CN, e em 10 mg/L de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3), para o CP. A areia utilizada nos controles foi previamente lavada em 3 banhos de água ultrapura, seguida de autoclavagem e secada em estufa (60 °C).

Os dois bioensaios com amostras de água e de sedimentos foram realizados em triplicata, com 100 sementes em cada placa. As placas foram mantidas em incubadora BOD (22

°C ± 1 °C), com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro. As radículas, com aproximadamente 2,0 cm de comprimento, foram coletadas e, em seguida, fixadas em solução de Carnoy (Álcool - Ácido Acético 3:1 - v/v) por 6 a 18 h em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, o fixador foi substituído por um novo fixador, recém-preparado. As raízes fixadas foram armazenadas em geladeira, a 4 °C, até a sua utilização na confecção das lâminas, para os ensaios de alterações cromossômicas e nucleares (ACN) e de micronúcleo (MN).

2.4.3. Ensaio de ACN e Teste do MN em células meristemáticas

O teste de ACN e MN em células meristemáticas de radículas de *A. cepa* foi realizado de acordo com o protocolo de Grant (1982), com algumas modificações. As radículas fixadas foram submetidas à hidrólise e coloração em reativo de Schiff, por 2 horas. Para confecção das lâminas, os meristemas foram colocados em lâminas contendo uma gota de carmim acético (2%), recobertos com lamínulas, e suave esmagamento. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas foram montadas com resina sintética, para posterior análise.

Para a análise dos efeitos citotóxicos, foram avaliados os Índices Mitóticos (IM) e Índices de Morte Celular (IMC). Para o *endpoint* de morte celular, foram consideradas as células com núcleos deslocados para a periferia celular, células com citoplasma vacuolizado e células com núcleos irregulares (reduzido ou aumentado) (Figura 4).

O IM e o IMC foram calculados pelas equações:

$$IM = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células em divisão celular}}{\text{Total de células observadas}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

$$IMC = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células em processo de morte celular}}{\text{Total de células observadas}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Para a análise da genotoxicidade, foram considerados diversos tipos de alterações cromossômicas (AC) e anormalidades nucleares (AN), de acordo com Leme e Marin-Morales (2009), nas diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Já para o *endpoint* de mutagenicidade, foram consideradas as quebras cromossômicas e a presença de MN.

O Índice de Genotoxicidade (IGen) e o de Mutagenicidade (IMut) foram calculados pelas equações:

$$IGen = \frac{N^{\circ} \text{ total de células com AC e AN}}{\text{Total de células observadas}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

$$IMut = \frac{N^{\circ} \text{ total de células com MN e quebras}}{\text{Total de células observadas}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

A análise dos parâmetros acima citados (IM, IMC, IGen e IMut) foi realizada pela contagem de cerca de 6.000 células para cada tratamento, sendo 500 células por lâmina, em um total de 12 lâminas analisadas (4 lâminas por triplicata). Para as análises estatísticas, os dados foram submetidos aos Testes de Shapiro-Wilk, para normalidade e de Levene, para homogeneidade. Em seguida, foi selecionado o teste mais apropriado para cada análise.

2.5. Bioensaios com sementes de *Lactuca sativa*

2.5.1. Exposição com as amostras de água

Sementes de *L. sativa* foram dispostas em placas de Petri de 7 cm de diâmetro, forradas com papel de filtro, contendo 3 mL das diferentes amostras de água coletadas (P1 até P8). As amostras de água usadas nessa exposição foram diluídas em água ultrapura na proporção de 1:6 (v/v). Os tratamentos controles foram realizados em água ultrapura, para o CN, e com sulfato de zinco heptahidratado (0,05 M) (LOPES, 2014) para o CP.

2.5.2. Exposição com as amostras de sedimento

Sementes de *L. sativa*, foram dispostas em placas de Petri de 7 cm de diâmetro, contendo 30 g de sedimento das diferentes amostras coletadas (P1 até P7) e água (ultrapura) suficiente para atingir a capacidade de retenção de água nos sedimentos. Os tratamentos controles foram realizados com areia e água ultrapura, para o CN, e com areia e sulfato de zinco heptahidratado (0,05 M) (LOPES, 2014) para o CP.

Os dois bioensaios foram realizados em triplicata, contendo 20 sementes em cada placa. As placas foram mantidas em incubadora BOD (22 °C ± 1 °C), sem fotoperíodo, por um período de exposição de 120 horas. Após esse período, as sementes e raízes foram utilizadas para as análises.

2.5.3. Ensaio de germinação e do desenvolvimento das sementes

Após o período de exposição, foram quantificadas as sementes que germinaram em cada placa, cujos resultados foram utilizados no cálculo da porcentagem de germinação (% G), conforme a equação:

$$\%G = \frac{\text{Total de sementes germinadas}}{\text{Total de sementes na placa}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Após a germinação, as raízes e os hipocótilos foram mensurados com o auxílio de um paquímetro digital. Os resultados destas mensurações foram usados para o cálculo das médias de seus comprimentos (para cada triplicata), que foram comparadas estatisticamente aos resultados obtidos no CN.

Para as análises estatísticas, os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk, para normalidade, e de Levene, para homogeneidade. Em seguida, foi selecionado o teste mais apropriado para cada análise.

3. Resultados e Discussão

3.1. Análises químicas e físico-químicas

Os dados das análises químicas, realizadas para avaliar as concentrações de metais presentes nas amostras de água e sedimentos superficiais, estão dispostos nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Também foram realizadas medições das amostras de água *in situ*, no momento da coleta, por meio da sonda multiparâmetro Horiba (Multi Water Quality Chequer U-50 Series), cujos resultados estão apresentados na Tabela 2.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Resolução nº 357/2005, classifica os corpos de água doce (águas com salinidade igual ou inferior a 0,5‰) em diferentes categorias, de acordo com seu uso preponderante, e dispõe sobre os padrões de qualidade de água para cada classe (BRASIL, 2005). Já a Resolução nº 454/2012 deste mesmo órgão ambiental (CONAMA), estabelece as diretrizes de qualidade de sedimentos utilizados no Brasil, determinando os limites máximos de concentração para proteção da biota, considerando o Nível 1, como limiar abaixo do qual há menor probabilidade de efeitos adversos à biota e Nível 2, o limiar acima do qual há maior probabilidade de efeitos adversos à biota (BRASIL, 2012). Esses valores de referência foram utilizados para fins de comparação das amostras de água e sedimento coletadas neste estudo.

Neste estudo, foram analisados fatores físico-químicos como turbidez, temperatura, Oxigênio Dissolvido (OD) e pH (Tabela 2). A turbidez, expressa a quantidade de sólidos que estão em suspensão na água que, por sua vez, pode levar à diminuição da fotossíntese, causar redução na produtividade dos peixes, aumento do CO₂ na água, derivado de respiração e, conseqüentemente, elevação do pH da água (ANA; CETESB, 2011). Pelos dados de turbidez,

observados na Tabela 2, todos os pontos analisados estão abaixo do limite estabelecido pela CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005).

A temperatura tem grande importância nos processos de solubilidade de elementos na água. O oxigênio, por exemplo, tem menor solubilidade em temperaturas elevadas (FIORUCCI; BENEDETTI, 2005). Assim, a avaliação da temperatura de águas de recursos hídrico é muito importante para estimar os índices de O₂ de um dado corpo d'água. O valor limite para OD estabelecido pela Resolução CONAMA 357/05 é $\geq 4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (BRASIL, 2005). De acordo com essa Resolução, todos os pontos analisados neste estudo, para temperatura e OD, estão dentro dos limites pré-estabelecidos por este conselho. Essa mesma Resolução estabelece também valores de referência para pH de corpos hídricos entre 6,0 e 9,0. O pH pode se apresentar mais ácido, em decorrência de maior quantidade de matéria orgânica presente no meio ou devido à presença de contaminantes de fontes difusas (VON SPERLING, 1996). Para este parâmetro, somente os pontos P1 e P7 se mostraram fora dos limites estabelecidos (P1 = 4,01 e P7 = 5,86). O pH do ponto P1 se mostrou muito abaixo do limite inferior pré-estabelecido e o do P7 um pouco abaixo deste limite. Neste estudo, esses valores observados podem estar relacionados a uma maior quantidade de matéria orgânica nos locais avaliados, mas também a contaminantes derivados das próprias atividades da mineração.

De acordo com os resultados de análise química observados na Tabela 3, as águas dos pontos P1, P2 e P3, situados no córrego Rico, mostraram valores elevados de As e Fe, quando comparados aos valores limites das águas de Classe 1 e Classe 2 (BRASIL, 2005). Além disso, os sedimentos (Tabela 4) destes mesmos pontos também mostraram teores elevados destes mesmos elementos, além da presença de altos teores de Cd (P1, P2 e P3), Pb (P2 e P3), Cu (P1) e Al (P1, P2 e P3). Esses dados expressam comprometimento dessas águas e alertam para atenção e maiores cuidados quanto à utilização dessas águas pela população, pois como o córrego Rico atravessa o município de Paracatu e, embora suas águas não sejam utilizadas para abastecimento público, elas são usadas em várias outras atividades pelos munícipes.

Já os corpos hídricos na região da barragem, mostraram valores elevados de Fe e Al nas águas do ponto P4 (córrego Santo Antônio), Fe no ponto P5 (ribeirão Santa Rita) e As e Fe no ponto P6 (ribeirão São Pedro), quando comparados aos valores limites estabelecidos para as águas de Classe 1 e 2 (BRASIL, 2005). Os sedimentos destes pontos, também mostraram valores elevados a esses elementos, além da presença de Al (P4, P5 e P6), As (P4, P5 e P6), Cd (P4, P5 e P6), Pb (P4 e P6) e Cu (P6). A presença de Al, As, Cd, Fe e Pb nos sedimentos do ponto P6 indicam a ocorrência de contaminações provenientes dos pontos anteriores: Al (P4 e P5), As (P4 e P5), Cd (P4 e P5), Fe (P4 e P5) e Pb (P4). Além disso, a presença de As e Fe nas

Tabela 2. Dados obtidos pela sonda multiparâmetro Horiba (Multi Water Quality Chequer U-50 Series), após medições realizadas *in situ* nas amostras de água dos diferentes pontos de coleta de rios do entorno das atividades de uma mineradora de ouro de Paracatu-MG.

Parâmetros (Unidade)	Pontos de Coleta								Referência*			
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Classe1	Classe 2	Classe3	Classe 4
Temperatura (°C)	24,08	20,33	21,43	17,35	19,47	20,03	19,54	26,99				
pH	4,01	6,81	6,71	7,44	7,67	7,18	5,86	6,17	6,0-9,0	6,0-9,0	6,0-9,0	6,0-9,0
O.R.P. (mV)	372	183	232	274	2,78	234	262	311				
Condutividade (mS/cm)	449	0,116	0,205	0,379	0,46	0,398	0,019	0,141				
Turbidez (NTU)	20	3,9	0,6	19,7	1,7	4,6	12,7	2,8	<40	<100	<100	-
O.D. (mg/L)	9,36	12,49	12,71	12,23	10,39	10,18	10,1	4,91	> 6	> 5	> 4	> 2
O.D. (%)	114,7	142,1	147,6	131,5	116,4	115,2	113,3	62,4				
T.D.S. (g/L)	2,88	0,079	0,133	0,246	0,299	0,259	0,012	0,092				
Salinidade (ppt)	1,7	0	0	0,1	0,1	0,1	0	0				

*Legislação CONAMA Nº 357/2005.

Tabela 3. Resultados das análises químicas para as concentrações de metais, realizadas com amostras de água dos diferentes pontos de coleta em rios do entorno das atividades de uma mineradora de ouro de Paracatu-MG.

	Pontos de Coleta								Referência*	
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Classe 1 e 2	Classe 3
Alumínio (Al)	<LQ	49 ± 11	53 ± 3	299 ± 5	58 ± 2	<LQ	79 ± 1	<LQ	100 (diss)	200 (diss)
Arsênio (As)	13 ± 1	16,0 ± 0,4	17 ± 1	8 ± 1	<LQ	18 ± 1	<LQ	<LQ	10	33
Cadmio (Cd)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1	10
Chumbo (Pb)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	10,1 ± 0,4	10	33
Cobre (Cu)	1,7 ± 0,1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	46,7 ± 0,3	9 (diss)	13 (diss)
Escândio (Sc)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	-	
Ferro (Fe)	312 ± 2	1192 ± 9	79 ± 12	588 ± 5	226 ± 1	420 ± 1	1101 ± 3	436 ± 3	300 (diss)	5000 (diss)
Manganês (Mn)	16,5 ± 0,1	53,4 ± 0,5	8,0 ± 0,2	30,1 ± 0,1	10,1 ± 0,1	65,0 ± 0,4	31,4 ± 0,1	172 ± 1	100	500
Mercúrio (Hg)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,2	2

Os valores estão expressos em µg/L (média±desvio padrão). LQ = Limite de Quantificação (Al = 36,158; As = 5,143; Cd = 0,442; Cu = 1,710; Fe = 8,954; Hg = 2,801; Mn = 0,287; Pb = 4,508; Sc = 1,163). *Legislação CONAMA N° 357/2005.

Tabela 4. Resultados da análise química para os metais realizada com sedimentos superficiais dos diferentes pontos de coleta de que rios do entorno das atividades de uma mineradora de ouro de Paracatu-MG.

	Pontos de Coleta							Referência*	
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	Nível 1	Nível 2
Alumínio (Al)	16771 ± 3382	5326 ± 504	4320 ± 201	8110 ± 1275	4318 ± 776	13899 ± 805	8864 ± 1228	-	-
Arsênio (As)	77 ± 9	1940 ± 337	1725 ± 224	150 ± 21	31 ± 1	478,1 ± 0,3	12,0 ± 0,3	5,9	17
Cadmio (Cd)	9 ± 1	12 ± 1	11 ± 2	8 ± 1	4,9 ± 0,2	6,4 ± 0,1	5,5 ± 0,1	0,6	3,5
Chumbo (Pb)	28 ± 2	43 ± 4	50 ± 4	35 ± 5	16,2 ± 0,4	38 ± 1	25 ± 1	35	91,3
Cobre (Cu)	40 ± 3	34 ± 6	29 ± 3	28 ± 3	29 ± 4	47 ± 1	30,29 ± 0,02	35,7	197
Escândio (Sc)	8,2 ± 0,2	6 ± 1	4 ± 1	5 ± 1	2,7 ± 0,1	6,1 ± 0,3	4,4 ± 0,4	-	-
Ferro (Fe)	21871 ± 4866	23114 ± 4123	28595 ± 2472	19699 ± 5736	8401 ± 1923	15985 ± 895	14883 ± 639	-	-
Manganês (Mn)	201 ± 41	184 ± 39	173 ± 43	177 ± 18	213 ± 7	493 ± 13	322 ± 20	-	-
Mercúrio (Hg)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,17	0,486

Os valores estão expressos em mg/kg (média±desvio padrão). LQ = Limite de Quantificação (Al = 28,926; As = 4,115; Cd = 0,354; Cu = 1,368; Fe = 7,163; Hg = 2,241; Mn = 0,230; Pb = 3,606; Sc = 0,930). *Legislação CONAMA N° 454/2012 (sedimentos de água doce).

águas do P6, indicam que as contaminações provenientes dos pontos anteriores (P4 e P5) estão sendo carregadas pelos corpos hídricos, o que pode causar danos também aos organismos expostos, no decorrer deste trajeto.

As águas dos pontos P7 (ribeirão Santa Isabel), onde ocorre a captação da ETA, e no P8 (água de abastecimento público – coletada no cavalete do consumidor), mostraram em comum os teores elevados de Fe. Adicionalmente, a amostra de água do ponto P8 apresentou, além do Fe, a presença de Pb, Cu e Mn. Os sedimentos analisados do ponto P7 também mostraram, além da presença de Fe, valores elevados de Al e Cd. A presença de Al e Cd nos sedimentos do ponto P7 confirma um fator de risco à população, por esse ribeirão ser utilizado para captação de água da ETA do município de Paracatu. Dessa forma, esse recurso hídrico precisa ser melhor monitorado, para que se mantenha dentro do nível de segurança e não ofereça risco à população. Além disso, a presença de valores acima dos permitidos para as Classes 1 e 2 de Fe, Pb, Cu e Mn na água de abastecimento também é um fator preocupante para a população.

3.2. Ensaio de ACN e Teste do MN em células meristemáticas de *Allium cepa*

Os bioensaios com *A. cepa*, realizados com as amostras de água, foram processados com as amostras diluídas (água do ponto – água ultrapura 1:2 - v/v), devido à baixa taxa de germinação e crescimento nas amostras brutas. Para análise dos efeitos citotóxicos das amostras de água e sedimentos, foram avaliados os *endpoints* de citotoxicidade (Índice Mitótico - IM e Índice de Morte Celular - IMC), cujos resultados estão apresentados nas Figuras 2 e 3.

De acordo com os valores de IM (Figura 2), as amostras de água se mostraram mais citotóxicas que as de sedimento. Pelos resultados obtidos nesta análise, podemos observar uma diminuição significativa do IM, induzido pelas águas coletadas nos pontos P1, P2, P5 e P6, e pelos sedimentos dos P6 e P7.

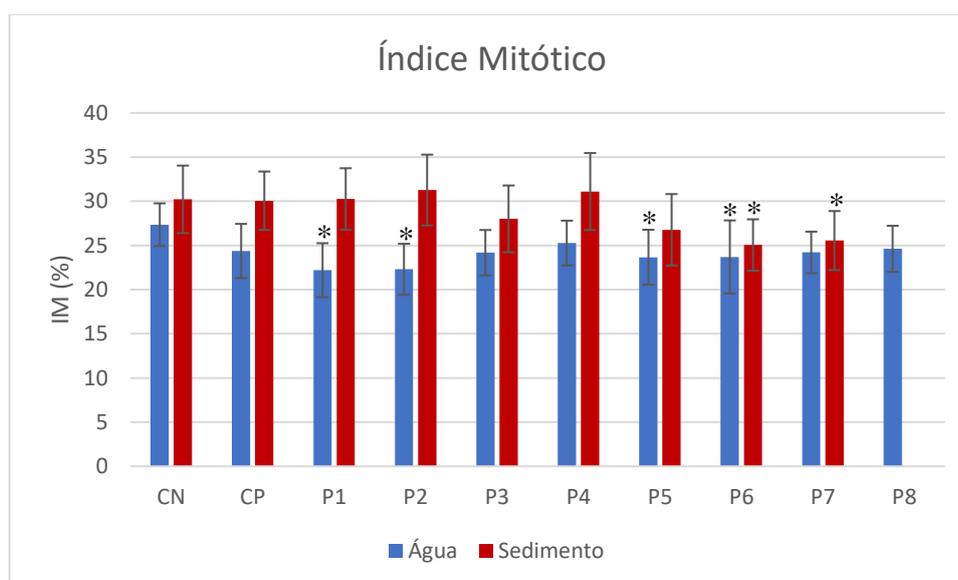
O As pode reduzir as taxas respiratórias das células durante os processos metabólicos de geração de energia devido a substituição do fosfato pelo arsenato, processo este que pode levar a uma redução no crescimento radicular (SHARPLES *et al.*, 2000; KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). Além disso, o arsenito, que é a forma mais tóxica do As, reage com o grupo sulfidril (-SH) de enzimas e proteínas, levando à inibição das funções celulares e a morte da célula (DELNOMDEDIEU *et al.*, 1994; BARBOSA, 2013).

O Al também possui efeitos deletérios para as plantas, já comprovados há muito tempo (MCLEAN; GILBERT, 1927; LEVAN, 1945; CLARKSON, 1965; LIU; JIANG, 1991). Alguns estudos comprovaram a inibição do ciclo mitótico de células meristemáticas de raízes, em decorrência da ação de Al (CLARKSON, 1965; MORIMURA; TAKAHASHI;

MATSUMOTO, 1978), fato este que pode levar a uma diminuição do crescimento radicular. Degenhardt *et al.* (1998) afirmam que a inibição do crescimento da raiz é o primeiro sintoma visualizado no vegetal, devido à toxicidade do Al. Essa toxicidade pode causar deficiência de absorção mineral e estresse hídrico celular.

Dados semelhantes de inibição do crescimento radicular e de germinação das sementes também foram descritos para os metais Cd, Pb, Ni, Al, Cu e Zn, por Dovgaliuk, Kaliniak e Blium (2001) e Geremias *et al.* (2012). De acordo com esses dados de literatura, pode-se inferir que a mistura de metais detectada nas amostras do presente estudo, onde alguns deles são reconhecidamente fitotóxicos (Al, As), podem estar induzindo a diminuição do IM das células meristemáticas.

Figura 2. Índice Mitótico (IM), observado em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição das sementes às diferentes amostras de água e sedimento, coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.

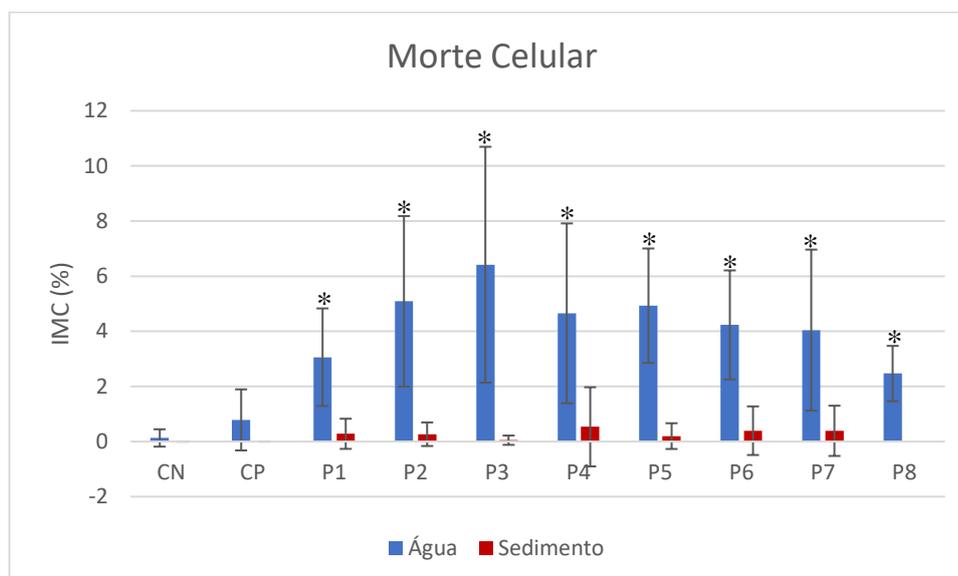


Valores expressos em Média \pm Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 10 mg/L); P (1 a 8) = pontos de coleta; *Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao CN, de acordo com ANOVA/Dunnet.

Os dados de IMC (Figura 3) mostraram valores estatisticamente significativos para todas as amostras de água dos pontos analisados. Assim, a indução de morte celular, somado à diminuição do IM já descrito anteriormente, caracterizam essas amostras como de alto potencial citotóxico. Os principais indícios de morte celular, observados nos ensaios com *A. cepa*, foram citoplasma vacuolizado, núcleo deslocado para a periferia da célula e células com núcleos reduzidos (Figura 4). Esses efeitos observados podem ser caracterizados como necrose, uma

vez que esse tipo de morte tem maior ocorrência como um fenômeno multicelular e não de células únicas e ocorre em resposta a qualquer injúria grave desencadeada por agentes físicos, químicos ou biológicos (ZAKERI; LOCKSHIN, 2002). A presença de citoplasma vacuolizado é um indicativo de necrose, visto que durante esse processo de morte celular as enzimas lisossomais digerem as organelas citoplasmáticas, dando ao citoplasma esse aspecto típico de vacuolização. Além disso, podem ocorrer também alterações nucleares como retrações nucleares, devido a heterocromatinização do material genético (ZAKERI; LOCKSHIN, 2002), fenômeno este observado neste estudo, pela presença de núcleos reduzidos e heteropicnóticos.

Figura 3. Índice de Morte Celular (IMC) observado em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição das sementes às diferentes amostras de água e sedimento, coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.

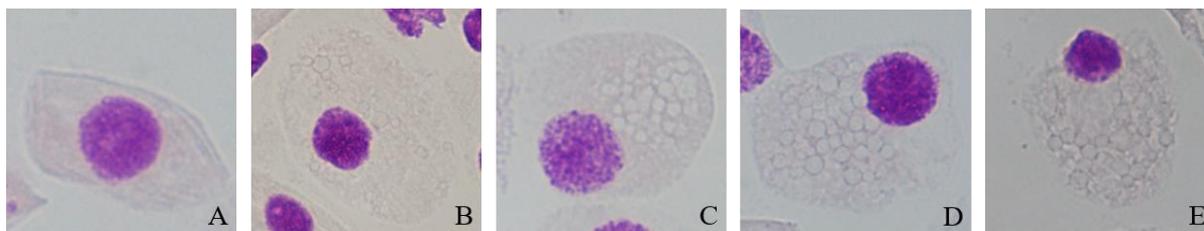


Valores expressos em Média \pm Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 10 mg/L); P (1 a 8) = pontos de coleta; *Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao CN, de acordo com Kruskal Wallis/Dunn.

Conforme pode ser visto nas figuras 2 e 3, apesar de todas as amostras de sedimento não apresentarem citotoxicidade pelo IMC, os pontos P6 e P7 apresentaram citotoxicidade pelo IM (diminuição significativa de divisão). Contudo, é importante salientar que os elementos químicos detectados nos sedimentos, mesmo não tendo efeitos imediatos nos bioindicadores, podem servir como fontes contínuas de contaminação da coluna d'água, devido a sua remobilização, tornando-se biodisponíveis nesses ambientes (HOLLERT *et al.*, 2003; SCHWARTZ *et al.*, 2006). Além disso, o sedimento e as amostras de água de P7, assim como as amostras de água do ponto P8, mostraram potencial citotóxico, que configura um cenário de

risco à população de Paracatu, visto que essas são as águas utilizadas para abastecimento público do município.

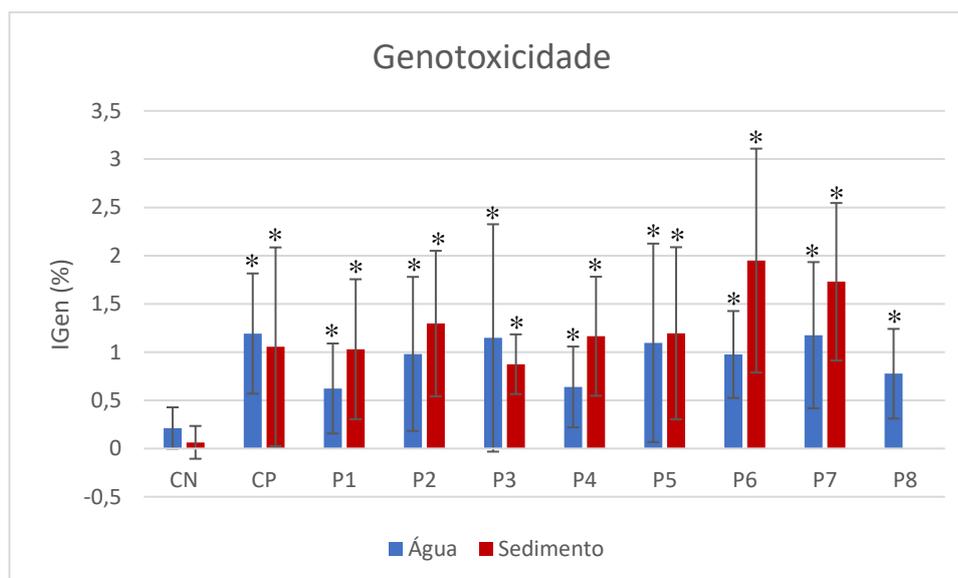
Figura 4. Progressão dos efeitos citotóxicos observados em células meristemáticas de *Allium cepa* (Morte celular), após exposição das sementes em amostras de água e sedimentos de rios do entorno das atividades de uma mineradora de ouro de Paracatu-MG.



A- Célula normal; B- Célula com citoplasma vacuolizado e núcleo se deslocando para a periferia da célula; C- Célula com citoplasma vacuolizado, núcleo periférico; D- Célula com citoplasma vacuolizado, núcleo periférico e heterocromatinizado; E- Célula com citoplasma vacuolizado, núcleo periférico e heterocromatinizado e alteração na membrana celular, indicando processo avançado de morte celular. Aumento: 1000 x. Fonte: Próprio autor.

Para análise da genotoxicidade, foi calculado o IGen, que agrupa todas as AC e AN observadas no estudo. Os valores de IGen estão apresentados na Figura 5.

Figura 5. Índice de genotoxicidade (IGen), observado em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição às diferentes amostras de água e sedimento coletados na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.



Valores expressos em Média \pm Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 10 mg/L); P (1 a 8) = pontos de coleta; *Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao CN, de acordo com Kruskal Wallis/Dunn.

Os dados de IGen (Figura 5) mostram que todas as amostras analisadas foram estatisticamente significativas, quando comparadas ao CN. Esse resultado demonstra que tanto a água quanto o sedimento dos pontos analisados são capazes de induzir danos ao material genético dos organismos. As AC e AN observadas com maior frequência estão apresentadas em fotos na Figura 6 e esquematizadas nas Figuras 7, para as amostras de água e Figura 8, para as amostras de sedimento.

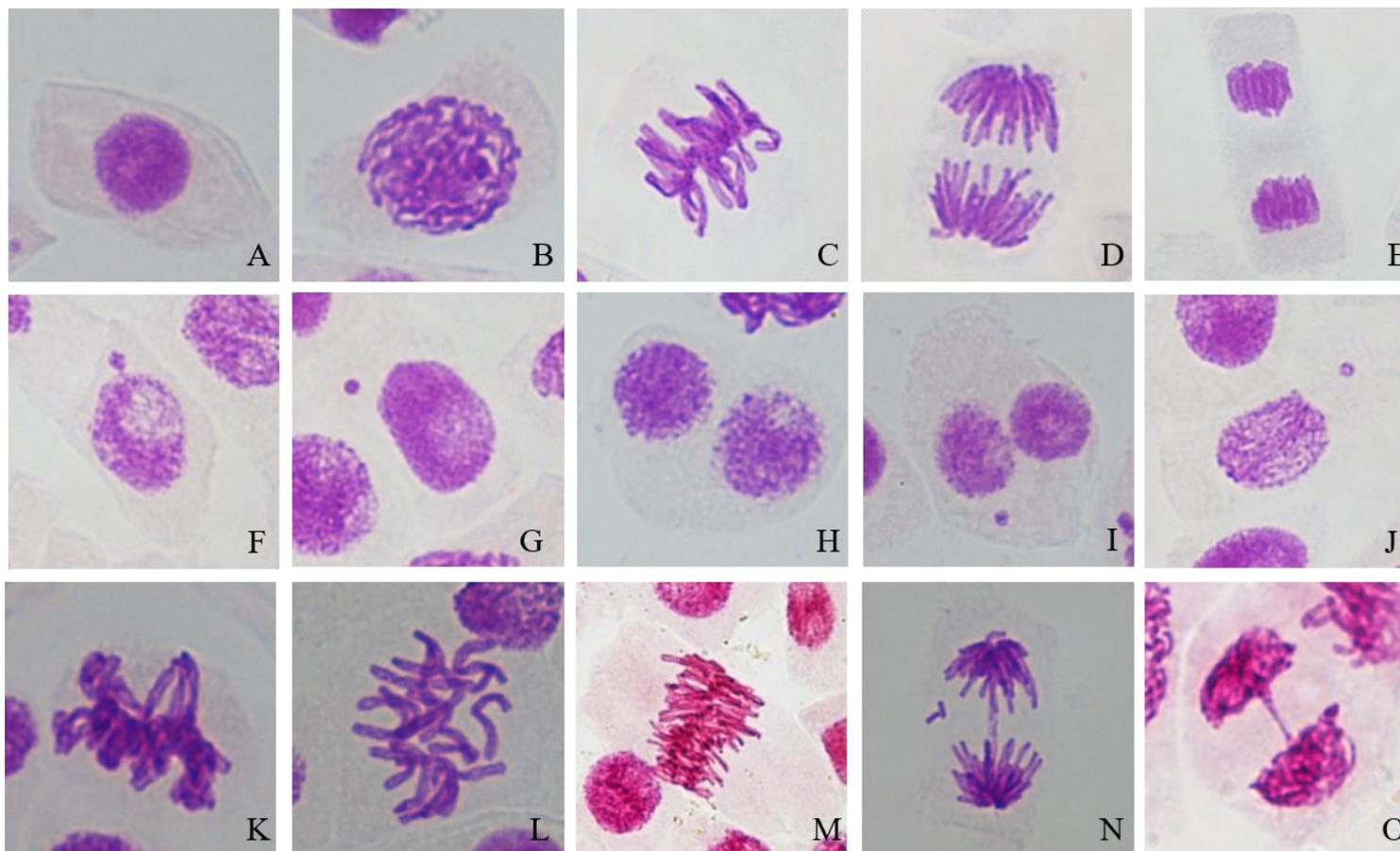
Em ambos os ensaios (água e sedimentos), foi possível observar a predominância de alterações como brotos nucleares, células binucleadas, aderências cromossômicas e pontes cromossômicas.

As ACs e ANs observadas em *A. cepa* podem indicar ação dos contaminantes estudados (VIDAKOVIC-CIFREK *et al.*, 2002). A ação aneugênica é caracterizada pela inativação de algum constituinte celular, como o fuso mitótico, enquanto que a ação clastogênica é dada pela capacidade do agente interagir diretamente com a molécula de DNA, podendo, neste último caso induzir quebras cromossômicas (FENECH, 2000). As alterações observadas com maior frequência neste estudo (brotos nucleares, células binucleadas, aderências cromossômicas e pontes cromossômicas) indicam que os elementos presentes nas amostras de água e sedimento possuem ação aneugênica. Os brotos nucleares são indicativos de material genético excedente, que são expulsos das células. Esse processo também pode estar associado com a formação de MN, conforme descrito por Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2007).

No processo de divisão celular de vegetais, para ocorrer a divisão do citoplasma, vesículas oriundas do complexo de Golgi se unem na porção mediana da célula e formam uma nova estrutura de membrana (fragmoplasto), que serve de ancoragem para a formação da nova parede celular. Chakraborty e colaboradores (2009) observaram que cinzas de carvão, derivadas de atividades de termelétricas, inibiram a formação de membrana celular de células meristemáticas de *A. cepa*, formando células binucleadas. Os autores associaram o aparecimento dessas alterações à presença dos metais Zn, Pb, Cu, Ni, Cd e As nas cinzas analisadas.

A presença de aderências cromossômicas está associada a eventos que alteram a matriz proteica do material cromatínico e não à molécula de DNA. Essa alteração pode impedir a migração dos cromossomos para os polos das células que, por ser um processo irreversível, frequentemente leva à morte celular (FISKEJÖ, 1988; FISKEJÖ, 1995; FERNANDES, 2005; VENTURA-CAMARGO; DE ANGELIS; MARIN-MORALES, 2016). Alguns autores ainda afirmam que as aderências podem resultar em alterações secundárias como, o aparecimento das pontes anafásicas (MARCANO *et al.*, 2004), quebras cromossômicas (MARCANO *et al.*, 1999

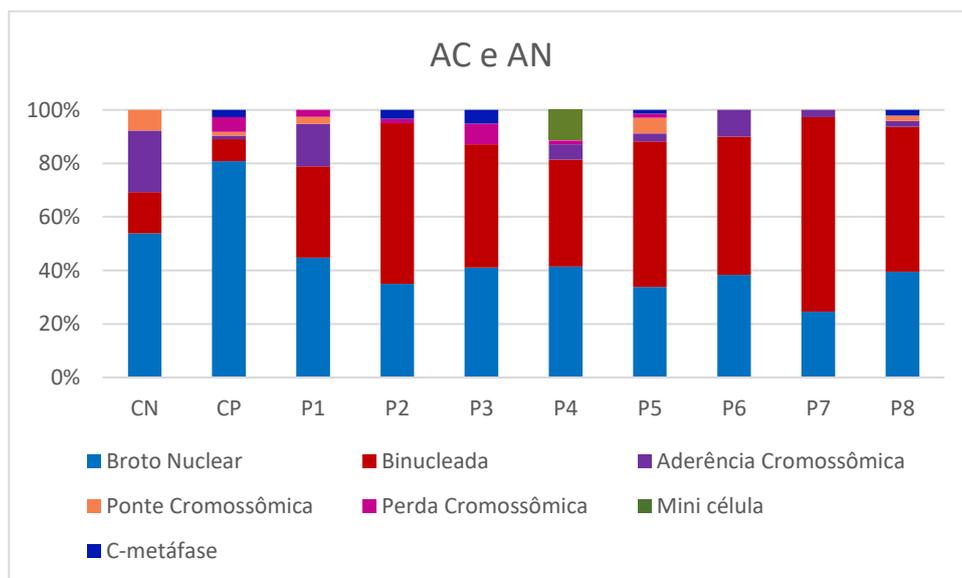
Figura 6. Efeitos genotóxicos observados em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição das sementes em amostras de água e sedimentos de rios do entorno das atividades de uma mineradora de ouro de Paracatu-MG.



A- Interfase; B- Prófase; C- Metáfase; D- Anáfase; E- Telófase; F- Interfase com broto; G- Interfase com MN; H- Célula binucleada; I- Célula binucleada e com MN; J- Prófase com MN; K- Metáfase com aderência cromossômica; L- C-metáfase; M- Metáfase poliploide; N- Anáfase com quebra cromossômica; O- Telófase com ponte cromossômica. Aumento: 1000 x. Fonte: Próprio autor.

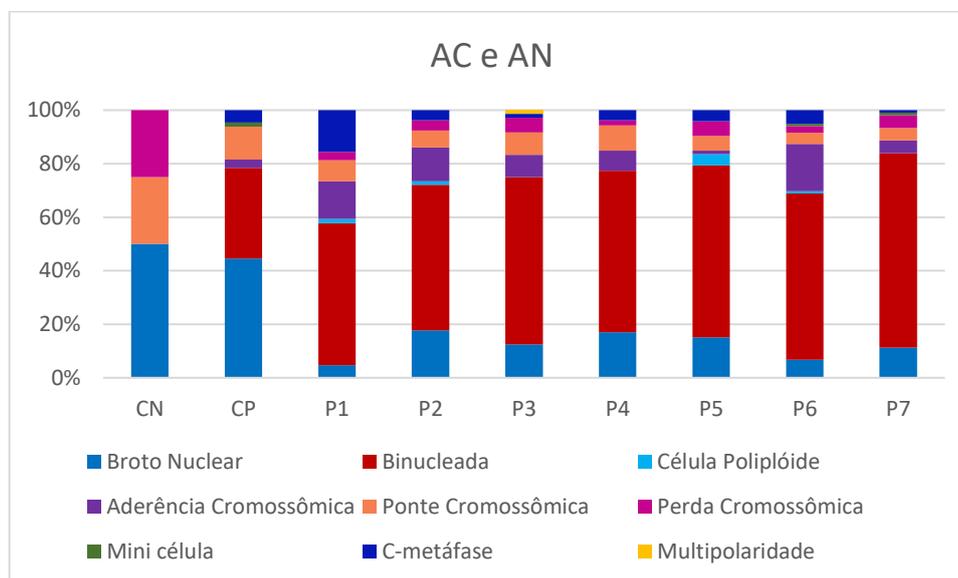
MARCANO *et al.*, 2004; LEME; DE ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008; MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011) e a perdas de cromossomos inteiros, envolvidas com as aneuploidias e poliploidias (FISKEJÖ, 1985; MATSUMOTO, 2004; FERNANDES, 2005). Levan (1945) observou a indução de aderências cromossômicas em raízes de *A. cepa* expostas aos metais Al, Cr, Fe, Co, Cu, As, Au e Hg, que progrediram para a formação de pontes cromossômicas na anáfase. De acordo com Giacomelli (1999), as pontes derivadas de aderências cromossômicas, podem ocorrer, concomitantemente, em vários cromossomos e serem persistentes até a telófase. As pontes podem ser ainda resultantes de rearranjos estruturais e, quando isso ocorre, podem levar a formação de fragmentos cromossômicos.

Figura 7. Aberrações cromossômicas (AC) e anormalidades nucleares (AN) observadas em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição às diferentes amostras de água coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.



P (1 a 8) = pontos de coleta.

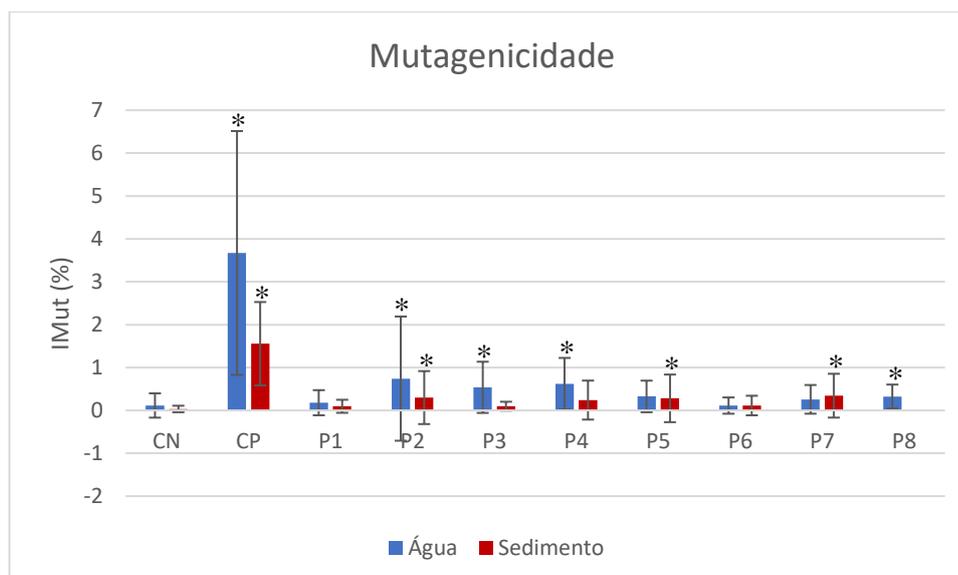
Figura 8. Aberrações cromossômicas (AC) e anormalidades nucleares (AN) observadas em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição às diferentes amostras de sedimento coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.



P (1 a 7) = pontos de coleta.

Os índices de mutagenicidade, calculados pelo IMut, estão apresentados na Figura 9.

Figura 9. Índice de Mutagenicidade (IMut) observado em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição das sementes às diferentes amostras de água e sedimento coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.



Valores expressos em Média \pm Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 10 mg/L); P (1 a 8) = pontos de coleta; *Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao CN, de acordo com Kruskal Wallis/Dunn.

Os dados de IMut mostraram valores estatisticamente significativos para as amostras de água e de sedimento do ponto P2, de água de P3, P4 e P8, e de sedimento dos pontos P5 e P7. Nos ensaios realizados com amostras de água e sedimento, foram observadas altas frequências de brotos nucleares (Figura 7 e 8) e de MN. Por esses resultados, é possível inferir que a frequência de MN observada pode estar relacionada à alta frequência de brotos encontrados para estas amostras, como sugerido por Fernandes *et al.* (2007).

Os dados obtidos no presente estudo alertam para o potencial de risco destas amostras, principalmente as dos P2 e P3, que atravessam o município de Paracatu, e do ponto P8, que corresponde a água de abastecimento público da cidade.

Tabela 5. Efeitos tóxicos gerais observados em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição às diferentes amostras de água e sedimento coletados na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.

	Água			Sedimento		
	Citotóxico	Genotóxico	Mutagênico	Citotóxico	Genotóxico	Mutagênico
P1	X	X			X	
P2	X	X	X		X	X
P3	X	X	X		X	
P4	X	X	X		X	
P5	X	X			X	X
P6	X	X		X	X	
P7	X	X		X	X	X
P8	X	X	X	-	-	-

Os resultados de P8 (sedimento) não estão apresentados, pois este ponto não apresenta amostras de sedimento, por ser ponto de coleta de água do cavalete do consumidor.

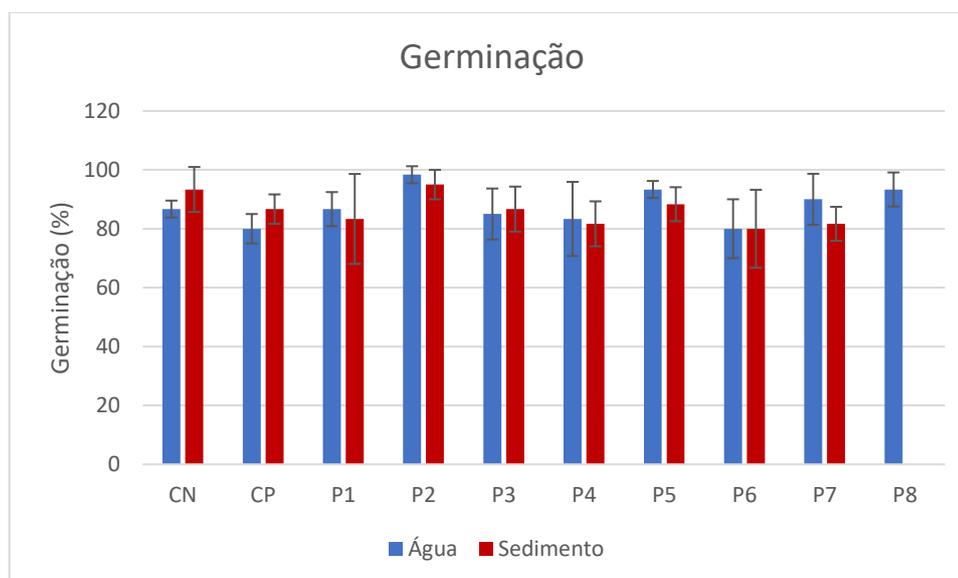
A Tabela 5 mostra, de forma resumida, os efeitos tóxicos gerais das amostras de água e sedimento avaliadas neste estudo. Todas as amostras de água foram potencialmente citotóxicas e genotóxicas para o organismo *A. cepa*, enquanto que as águas dos pontos P2 e P3, localizados nos limites do município (antes e após o perímetro urbano), assim como o ponto P8 que é a água de abastecimento público, mostraram também potencialidade mutagênica. Todas as amostras de sedimento se mostraram genotóxicas, somente as amostras P6 e P7 se mostraram citotóxicas (IM) e as de P2, P5 e P7 potencialmente mutagênicas. Esses dados mostram que esses pontos analisados oferecem riscos à biota local, assim como à saúde humana.

3.3. Ensaio de germinação de sementes - *Lactuca sativa*

Os testes de germinação com *L. sativa*, realizados com as amostras de água dos pontos P1 a P7 tiveram que ser processados com amostras diluídas (água do ponto + água ultrapura, na proporção de 1:6 - v/v, respectivamente), que foi a proporção em que se obteve germinação das sementes para todas as amostras analisadas.

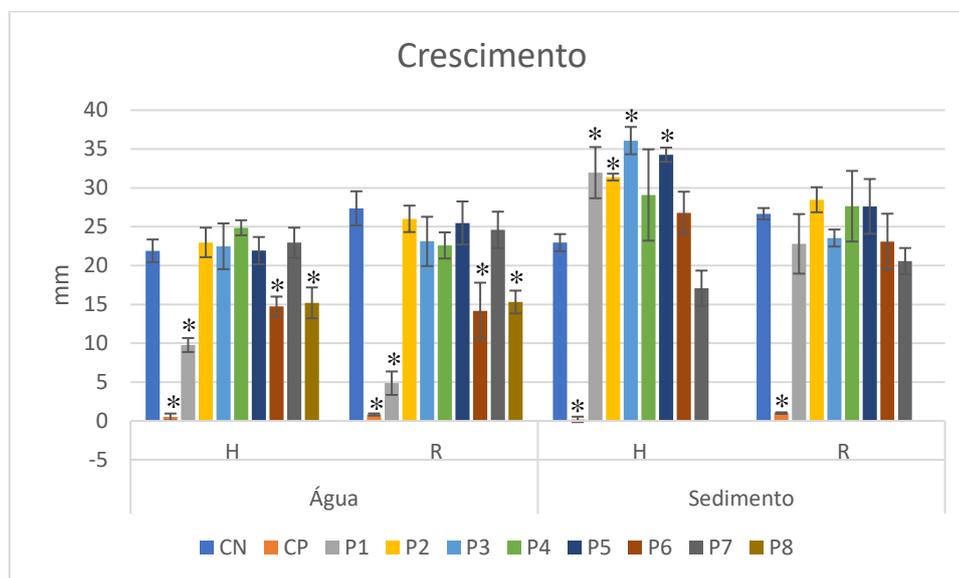
Para avaliação da toxicidade das amostras de água e de sedimento, foram utilizados os parâmetros de %G e de crescimento de hipocótilo e raiz com *L. sativa*. Os resultados obtidos para esses parâmetros estão representados na Figura 10 e Figura 11, respectivamente. As fotos representativas das raízes após exposição às amostras de água e de sedimento estão apresentadas nas Figuras 12 e 13.

Figura 10. Porcentagem de germinação (%G) observada em *Lactuca sativa*, após exposição às diferentes amostras de água e sedimento coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.



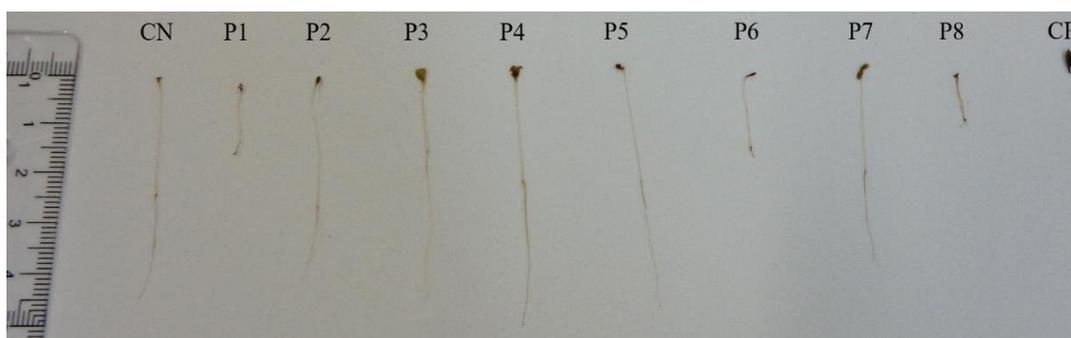
Valores expressos em Média \pm Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (sulfato de zinco 0,05 M); P (1 a 8) = pontos de coleta; *Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao CN, de acordo com Kruskal Wallis/Dunn (água) e ANOVA/Dunnet (sedimento).

Figura 11. Crescimento de hipocótilo e raiz de *Lactuca sativa*, para as diferentes amostras de água e sedimento coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.



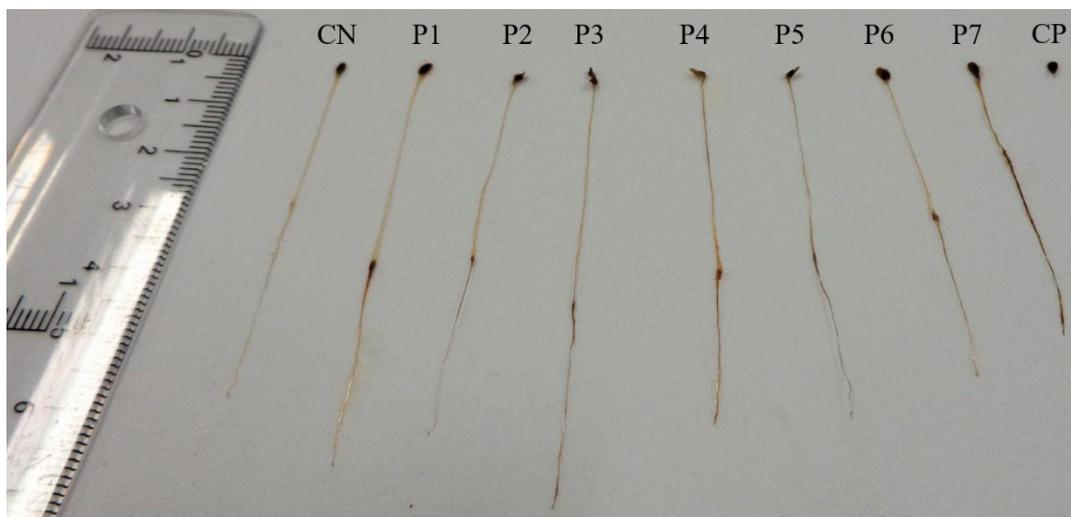
Valores expressos em Média \pm Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (sulfato de zinco 0,05 M); H = hipocótilo; R = raiz; P (1 a 8) = pontos de coleta; *Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao CN, de acordo com ANOVA/Dunnet.

Figura 12. Raízes de *Lactuca sativa*, após exposição às diferentes amostras de água coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.



CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (sulfato de zinco 0,05 M); P (1-8) – pontos de coleta. Fonte: Próprio autor.

Figura 13. Raízes de *Lactuca sativa*, após exposição às diferentes amostras de sedimento coletadas na região de influência da mina Morro do Ouro, município de Paracatu-MG.



CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (sulfato de zinco 0,05 M); P (1-7) – pontos de coleta. Fonte: Próprio autor.

De acordo com os resultados observados para %G (Figura 10), nenhuma das amostras avaliadas foi capaz de induzir alteração na taxa de germinação das sementes de *L. sativa*. Porém, esses resultados foram obtidos para as amostras de água diluídas. Nos ensaios realizados como pré-teste, para as amostras de água, as diluições de 1:1 até 1:3 inibiram totalmente a germinação das sementes de *L. sativa*, para todos os pontos avaliados; a diluição de 1:4, apenas as sementes expostas as amostras dos pontos P3 e P5 germinaram; e na diluição 1:5, as águas dos pontos P2 e P8 não germinaram. Apenas na diluição de 1:6 todos os pontos germinaram.

Na avaliação de crescimento de hipocótilo e da raiz (Figura 11), foi possível observar resultados estatisticamente significativos, em relação aos resultados do CN, para as amostras de água dos pontos P1, P6 e P8 (hipocótilo e raiz) e pontos P1, P2, P3 e P5 (hipocótilo) para as amostras de sedimento. Não houve crescimento de raiz de forma significativa para as amostras de sedimento. Para as amostras de água, os crescimentos das raízes e hipocótilos se mostraram menores que o CN, evidenciando um potencial tóxico para as águas desses pontos de coleta. Esses resultados corroboram com os resultados de IM obtidos para *A. cepa*, uma vez que os pontos P1 e P6 também tiveram diminuição significativa no IM das células meristemáticas, enquanto o ponto P8, apesar de não ter uma diminuição significativa, teve valores de IM abaixo dos valores registrados para o CN. Para as amostras de sedimento, houve diminuição significativa no IM para *A. cepa* (P6 e P7), mas não para *L. sativa*, embora os seus valores de crescimento de raiz tenham sido menores que os observados no CN.

Em contrapartida, os resultados significativos observados para os sedimentos, foram superiores aos observados no CN, mostrando que os elementos presentes nessas amostras, estão aumentando a taxa de crescimento dos hipocótilos de *L. sativa*.

4. Conclusão

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com o organismo-teste *Allium cepa* mostraram que as amostras de água e de sedimento coletadas nos rios do entorno da mina Morro do Ouro apresentam riscos à saúde humana e à biota. As amostras de água avaliadas apresentaram citotoxicidade e genotoxicidade e as amostras de sedimento apresentaram apenas genotoxicidade. Para as amostras de água, foi possível observar potencial mutagênico para os pontos P2, P3 (córrego Rico) e para o P8 (água de abastecimento público do município), resultados estes que servem de alerta sobre o provável risco de consumo da água fornecida à população de Paracatu. As amostras de sedimentos do P6 e P7 apresentaram citotoxicidade, pelos testes de IM e as do P2, P5 e P7, potencial mutagênico. Os resultados de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, observados para as águas e sedimentos do ponto P7 (ribeirão Santa Isabel), são preocupantes, por este rio estar envolvido com a captação da água de abastecimento público e ter contaminantes capazes de promover efeito danoso aos organismos.

A presença de contaminantes em sedimentos de rios pode agravar ainda mais a qualidade da água deste rio, pois estes podem ser disponibilizados para a coluna d'água, constituindo uma fonte constante de poluição aquática. Outro fator que pode agravar a qualidade da água de abastecimento (P8) é o tipo de tratamento utilizado pela própria ETA.

Os resultados obtidos com *Lactuca sativa*, para taxa de germinação, mostraram que nem as amostras de sedimento, nem as de água (diluídas) foram tóxicas. No entanto, foi observado uma diminuição do crescimento da raiz, nos ensaios realizados com amostras de águas dos pontos P1, P6 e P8, corroborando os dados obtidos para IM em *Allium cepa*, que também se mostraram reduzidos para estes mesmos pontos.

A espécie *A. cepa* se mostrou mais eficiente que *L. sativa* para avaliação da qualidade da água e dos sedimentos de rios, atuando como um bom organismo-teste para biomonitorar áreas contaminadas por mineração. No entanto, *L. sativa* se mostrou mais sensível que *A. cepa*, visto que as amostras de água tiveram que ser mais diluídas para obtenção dos resultados.

5. Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

6. Referências

AGUIAR, LUCAS GABRIEL SILVA. **Avaliação da contaminação potencial por metais em solos e sedimentos na região da Mina Morro do Ouro, Paracatu – MG.** Dissertação (Mestrado em Geociências) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2018 (132f.).

ANA; CETESB. Agência Nacional de Águas (ANA) & Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). **Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras - Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos**, 2a. ed., Brasília: Distrito Federal, 2011.

BAGUR-GONZÁLEZ, M. G. *et al.* Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. **Journal of Soils and Sediments**, v. 11, p. 281–289, 2011.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622p.

BARBOSA, A.P. **Alterações fisiológicas causadas pelo arsênio, genotoxicidade e importância do mecanismo *mismatch repair* no reparo do DNA em *Arabidopsis thaliana*.** Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 826–833, 2011.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA nº 357/2005.** 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: Diário Oficial da União, 17 mar 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA nº 454, de 01/11/2012.** Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional. Brasília: Diário Oficial da União, 08 nov 2012.

CARITÁ, R.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Comparison of the toxicogenetic potential of sewage sludges from different treatment processes focusing agricultural use. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 21475-21483, 2019.

CHAKRABORTY, R.; MUKHERJEE, A.K.; MUKHERJEE, A. Evaluation of genotoxicity of coal fly ash in *Allium cepa* root cells by combining comet assay with the *Allium* test. **Environmental Monitoring Assessment**, v.153, p.351–357, 2009.

CHARLES, J., *et al.* Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.2057-2064, 2011.

CHAUHAN, L.; SAXENA, P.; GUPTA, S. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 42, p. 181–189, 1999.

CLARKSON, D.T. The effect of aluminium and some other trivalent metal cations on cell division in the root apices of *Allium cepa*. **Annals of Botany**, v.29, p.309-315, 1965.

DELNOMDEDIEU, M. *et al.* Reduction and binding of arsenate and dimethylarsinate by glutathione – a magnetic resonance study. **Chemico-Biological Interactions**, v.90, p.139–155, 1994.

DEGENHARDT, J. *et al.* Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant alr-104 is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.117, p.19-27, 1998.

DOVGALIUK, A.L.; KALINIAK, T.B.; BLIUM, I.A.B. Cytogenetic effects of toxic metal salts on apical meristem cells os *Allium cepa* L. seed roods. **TSitologii i Genetika**, v.35, p.3–10, 2001.

ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J.; DORNFELD, C. B. **Estudos ecotoxicológicos no rio Mogi-Guaçu**. ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J. (Org.). Limnologia fluvial. São Carlos: Rima, 2003. p.129–148.

FARIAS, C. E. G. Mineração e Meio Ambiente no Brasil - PNUD Contrato 2002/001604. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos Ciência, Tecnologia e Inovação**. São Paulo, 2002.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81–95, 2000.

FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes**. 2005. 212 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2005.

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. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 88, p. 252–259, 2007.

FIORUCCI, A.R.; BENEDETTI, E. **A importância do Oxigênio Dissolvido em Ecossistemas Aquáticos**. Química Nova na Escola, v.22, p.10-16, 2005.

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

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

FISKEJÖ, G. *Allium* test. **Methods in Molecular Biology**, v. 43, p. 119-127, 1995.

GERAS'KIN, S., EVSEEVA, T., OUDALOVA, A. Plants as a tool for the environmental health assessment. in: Nriagu, J.O. (Ed.) **Encyclopedia of Environmental Health**. San Diego, CA, USA: Elsevier Science, p.571-579, 2011.

GEREMIAS, R. *et al.* Efficacy assessment of acid mine drainage treatment with coal mining waste using *Allium cepa* L. as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.79, p.116–121, 2012.

GIACOMELLI, F.R.B. **Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para a região sul**. 1999. 131f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1999.

GRANT, W. F.; Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. environmental protection agency. Gene-Tox program. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.

HARA, R. V.; MARIN-MORALES, M. A. *In vitro* and *in vivo* investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State – Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p.321-330, 2017.

HERRERO, O. *et al.* Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research**, v. 743, p. 20–24, 2012.

HOLLERT, H. *et al.* A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Journal of Soils and Sediments**, v. 3, n. 3, p. 197–207, 2003.

ISO- International Organization for Standardization. 2004. **Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth**. No. 11269–1, 2004.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3a ed. Boca Raton: CRC Press. 413p, 2001.

KAPANEN, A.; ITAVAARA, M. Ecotoxicity tests for compost applications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 1-16, 2001.

KURAS, M. *et al.* 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, p. 211–221, 2006.

LEME, D.M.; DE 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, p.214-219, 2008.

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

LEVAN, A. Cytological reaction induced by inorganic salt solutions. **Nature**, v.156, p. 751, 1945.

LIU, D.; JIANG, W. Effects of Al³⁺ on the nucleolus in root tip cells of *Allium cepa*. **Hereditas**, v.115, p.213-219, 1991.

LOPES, P.R.M. **Biorremediação de um solo contaminado com óleo lubrificante pela aplicação de diferentes soluções de surfactante químico e biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeroguminosa* LBI**. Tese DSc. Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2014.

MARCANO, L. *et al.* Cytotoxicity and mode of action of malei hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, p. 221–226, 2004.

MARCANO, L. *et al.* Inhibición de la actividad biosintética nucleolar inducidas por el plomo en meristemas radiculares de cebolla (*Allium cepa*). **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia**, v. 16, p. 476-487, 1999.

MATSUMOTO, S.T. **Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP**. 2004. 216 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto/SP, 2004.

MAZZEO, D.E.C; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M.A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v.85, p.13-18, 2011.

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

MCLEAN, F.T.; GILBERT, B. E. The relative aluminium tolerance of crop plants. **Soil Science**, v.24, p.163- 175, 1927.

MIŠÍK, M. *et al.* Acute toxic and genotoxic activities of widely used cytostatic drugs in higher plants: Possible impact on the environment. **Environmental Research**, v.135, p.196-203, 2014.

MORIMURA, S.; TAKAHASHI, E.; MATSUMOTO, H. Association of aluminium with nuclei and inhibition of cell division in onion (*Allium cepa*) roots. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v.88, p.395-401, 1978.

NORDSTROM, D.K.; SOUTHAM, G. Geomicrobiology of sulphide mineral oxidation. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v.35, p.361-390, 1997.

NUNES, E. A. *et al.* Genotoxic assessment on river water using different biological systems. **Chemosphere**, v. 84, p. 47–53, 2011.

OECD- Organization for Economic Cooperation and Development. **Guideline 208. Terrestrial plant test: 208; Seedling emergence and seedling growth test**, 2003.

PALMIERI, M. J. *et al.* Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research**, v.763, p.30-35, 2014.

- PALMIERI, M.J. *et al.* Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air & Soil Pollution**, v.227, p.1-10, 2016.
- PAMPLONA-SILVA, M. T.; GONÇALVES, L. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genetic toxicity of water contaminated by microcystins collected during a cyanobacteria bloom. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 223–230, 30 dez. 2018.
- PARACATU. **Prefeitura de Paracatu – A cidade: História**. Disponível em: <<http://paracatu.mg.gov.br/cidade>>. Acesso em: julho de 2019.
- PRIAC, A.; BADOT, P. M.; CRINI, G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, p. 188–194, 2017.
- RANK, J.; NIELSEN, M. Evaluation of the *Allium* anaphase–telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, v. 312, p. 17–24, 1994.
- SCHWARTZ, R. *et al.* Assessment of highly polluted fluvisol in the spittelwasser floodplain based on national guideline values and MNA-Criteria. **Journal of Soils and Sediments**, v. 6, n. 3, p. 145–155, 2006.
- SHARPLES, J.M. *et al.* Mechanisms of arsenate resistance in the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenosyphus ericae*. **Plant Physiology** 124: 1327-1334, 2000.
- SOBRERO, M.C.; RONCO, A.E. Capítulo 4.4: Protocolos de Prueba. Bioensayo de Toxicidad Aguda con Semillas de Lechuga (*Lactuca sativa*). In: **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones**. Gabriela Castillo editora. Edición conjunta IDRC, SEMARNAT, IMTA, México.188 pp, 2004.
- SOMMAGGIO, L.R.D. *et al.* Ecotoxicological and microbiological assessment of sewage sludge associated with sugarcane bagasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.147, p.550–557, 2018.
- SOUZA, C.P.; GUEDES, T.A.; FONTANETTI, C.S. Evaluation of herbicides action on plant bioindicators by genetic biomarkers: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.188, p.694, 2016.
- TEIXEIRA, R. O. *et al.* Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 551–555, 2003.
- USEPA- United States Environmental Protection Agency. **Ecological effects test guidelines (OPPTS 850.4200): Seed germination/root elongation toxicity test**, 1996.
- VENTURA-CAMARGO, B. de C.; DE ANGELIS D. de F.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in

Allium cepa cells before and after bacterial biodegradation treatment. **Chemosphere**, v. 161, p. 325-32, 2016.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z. *et al.* Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, p. 284–291, 2002.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**, 2a. ed. Belo Horizonte: Minas Gerais, 1996.

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R.A. Cell death during development. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, p. 3-20, 2002.

Artigo 3. Toxicidade de água e sedimento de uma área sob influência de mineração de ouro (Paracatu-MG), por meio de ensaios *in vitro*

Nádia Aline Corroqué; Maria Tereza Pamplona-Silva; Letícia Rocha Gonçalves; Willian Barbosa Simioni; Maria Aparecida Marin-Morales.

Resumo

As atividades de extração de minérios no Brasil acontecem desde o século XVII até os dias atuais. Essas atividades, embora sejam economicamente rentáveis para o país, geram grandes impactos ao meio ambiente e aos organismos presentes nessas áreas. Diante deste cenário, esse estudo tem o objetivo de avaliar a toxicidade das águas e dos sedimentos de uma área sob influência de mineração de ouro (Paracatu-MG) por meio de bioensaios com cultura celular humana HepG2/C3A. As amostras de água e sedimento foram coletadas em 3 regiões distintas no entorno da área de mineração: 1) área a jusante da mina Morro do Ouro, onde está localizado o município de Paracatu (P1, P2 e P3); 2) área a jusante da barragem de rejeitos da mina Morro do Ouro (P4, P5 e P6) e 3), área em que ocorre a captação de água para abastecimento público (P7); e água de abastecimento público de Paracatu (P8). As amostras de sedimento foram processadas para produção de um extrato solubilizado, que foi utilizado nos experimentos com cultura celular. Para o ensaio do cometa, não foram observados danos genotóxicos para a maioria das amostras, enquanto que para o ensaio do MN com bloqueio de citocinese, esses danos puderam ser observados pela presença de brotos nucleares, mostrando genotoxicidade para todas as amostras avaliadas. Esses danos podem estar relacionados à processos iniciais de apoptose e não somente às quebras do DNA. Esses resultados, juntamente com os resultados obtidos para índice de morte celular e índice de proliferação celular, mostraram que todas as amostras de sedimento avaliadas possuem um elevado potencial citotóxico. Foi ainda observado potencial mutagênico para as amostras de sedimento dos pontos P2 e P3. De acordo com os resultados observados, as 3 regiões avaliadas neste estudo oferecem riscos à vida aquática e a saúde humana.

Palavras-chave: monitoramento ambiental, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, HepG2/C3A.

1. Introdução

O Brasil possui importantes depósitos de minerais metálicos, não-metálicos e energéticos em seu subsolo (BARRETO, 2001). Dentre os minerais metálicos, a mineração de ouro é uma das atividades do setor que mais se destaca em importância econômica, pois, de acordo com o IBRAM (2019), esse metal é o segundo mineral mais exportado pelo Brasil. O estado de Minas Gerais tem grande destaque na mineração de ouro, devido as importantes reservas naturais que possui deste metal. O município de Paracatu, localizado na região noroeste desse estado, possui a maior mina de ouro em operação do Brasil (mina Morro do Ouro), sendo esta também uma das maiores lavras de ouro a céu aberto do mundo (PARACATU, 2019). A mina, que está localizada há alguns metros de distância do perímetro urbano da cidade de Paracatu, é considerada uma lavra de baixo teor de ouro (0,4 g/t). Para a otimização da extração do metal, é necessário, então, uma alta demanda de movimentação e disposição de materiais usados no processo de extração, o que e também gera grandes volumes de rejeitos e efluentes, que podem contaminar os solos e os corpos d'água circundantes (AGUIAR, 2018), principalmente devido a presença de metais pesados (LAYBAUER; BIDONE, 1998; BIDONE *et al.*, 2001), como o Arsênio (As), que se encontra naturalmente no solo do local, uma vez que o ouro da região está associado a sulfetos, no mineral arsenopirita (FeAsS) (NORDSTROM; SOUTHAM, 1997).

Os metais se dispersam no ambiente aquático, formando soluções, coloides e suspensões. Quando os metais se depositam nos sedimentos dos rios, eles podem se remobilizar para a coluna d'água e vice-versa, fazendo com que as concentrações desses metais facilmente variem entre a água e os sedimentos. A porcentagem de contaminantes solúveis em água é muito baixa, sendo a maior parte deles depositados e, conseqüentemente, armazenados nos sedimentos (SALOMONS; STIGLIANI, 1995; FILGUEIRAS; LAVILLA; BENDICHO, 2004). Fatores como temperatura, pluviosidade, teor de matéria orgânica, pH e potencial redox, podem influenciar no processo de remobilização dos metais nos sedimentos (FILGUEIRAS; LAVILLA; BENDICHO, 2004).

Os ensaios com cultura celular de mamíferos tem sido uma eficiente ferramenta para monitorar ambientes impactados, devido à facilidade de padronização das condições do ensaio, pela possibilidade de realizar tratamentos das células em várias fases do ciclo celular e pela organização do material genético assemelhar-se às células *in vivo* (RABELLO-GAY, 1991). Segundo Rogero *et al.* (2003), esses ensaios são vantajosos por serem reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis.

O ensaio do cometa permite a investigação de danos no DNA (quebras em fita simples, quebras na dupla fita e sítios álcali lábeis) em células individuais (SINGH *et al.*, 1988). Além disso, esse ensaio tem sido considerado um teste rápido, sensível e econômico (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; PAVLICA *et al.*, 2001; ANDRADE; FREITAS; SILVA, 2004; MATSUMOTO *et al.*, 2006). Essa técnica também é vantajosa por não requerer grandes quantidades de células e por ser aplicável em qualquer fase do ciclo celular (PAVLICA *et al.*, 2001).

O ensaio do micronúcleo (MN) com bloqueio de citocinese vem sendo muito utilizado para avaliar a potencialidade de compostos químicos ou de amostras ambientais induzirem a formação de MNs em culturas celulares, sejam em culturas de células humanas e/ou de outros mamíferos. Essa técnica permite a contabilização e classificação das células que passaram por um ciclo de divisão celular, após a exposição ao tratamento a ser avaliado. Além da presença de MN, o método também permite a contagem de outras alterações celulares, como de pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares (FENECH, 2006), que auxiliam para uma melhor avaliação do material investigado.

De acordo com Van Goethem, Lison e Kirsch-Volders (1997), a combinação dos ensaios do cometa com o ensaio do MN, é recomendada para estabelecer uma melhor correlação entre o composto químico estudado e seu possível efeito no DNA das células.

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico e mutagênico de amostras de água e de sedimento coletadas em uma área sob influência de uma mineradora de ouro (Morro do Ouro - Paracatu-MG), por meio de ensaios *in vitro* utilizando a linhagem celular HepG2/C3A.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material biológico

Foram obtidas, junto ao *Banco de Células do Rio de Janeiro* (BCRJ), células de hepatoma humano HepG2/C3A (BCRJ: 0291), um clone derivado das células HepG2 (BCRJ: 0103) HB 8065, que vem sendo mantidas em cultura no Laboratório de Mutagênese Ambiental do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro, para utilização em bioensaios de toxicidade ambiental.

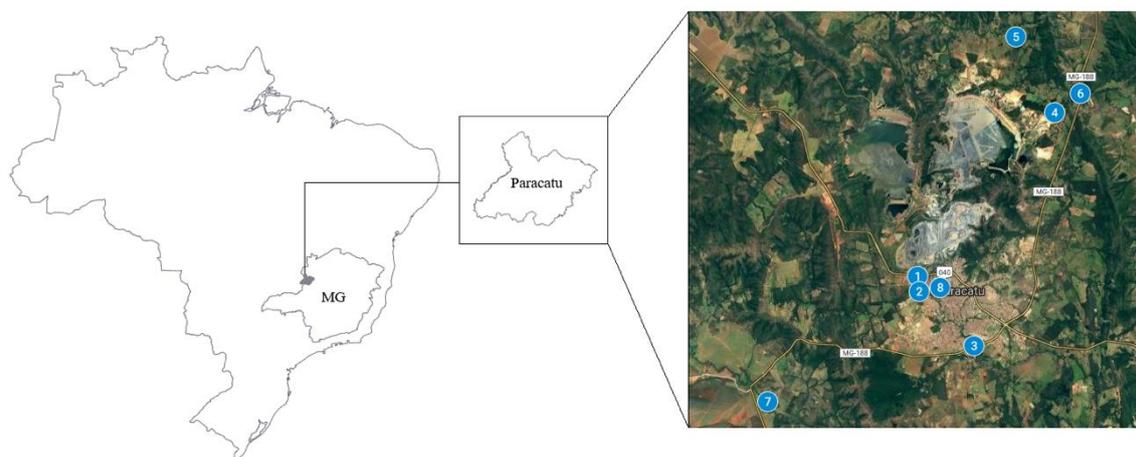
2.2. Amostras ambientais

Para a realização dos bioensaios, foram coletadas, no inverno de 2016, amostras de água e sedimentos de rios em diferentes pontos de uma área que recebe influência de uma mineradora

de ouro, localizada no município de Paracatu-MG. As amostras dos pontos P1, P2 e P3 foram coletadas no córrego Rico, a jusante da mineradora; os pontos P4, P5 e P6 foram coletados na região em que se encontra a barragem de rejeitos Santo Antônio, no córrego Santo Antônio (P4), no ribeirão Santa Rita (P5) e no ribeirão São Pedro (P6); e o ponto P7 no ribeirão Santa Isabel, que é o rio utilizado para a de captação de água para abastecimento público do município de Paracatu. No ponto P8 foi coletada apenas amostra de água, pois trata-se de um ponto de coleta da água de abastecimento do município (coletado no cavalete do consumidor). Os pontos seguem esquematizados na Figura 1 e descritos na Tabela 1.

A água e o sedimento dos rios foram coletados por meio de amostragem composta. As amostras de água superficial foram coletadas com o auxílio de um balde e as amostras de sedimento, com o auxílio de um pegador de Ekman-Birge. Após a coleta, as amostras de água foram fixadas com ácido acético (2%), para inibição das atividades microbiológicas, nos frascos de análise biológica e com ácido nítrico (2%) nos frascos de análise química. Para acondicionamento destas amostras, foram utilizados frascos e embalagens de polietileno de alta densidade (Figura 3), que são atóxicos e inertes, uma vez que vidros e metais não são indicados para amostras contendo metais (ANA; CETESB, 2011). Tanto as amostras de água quanto as de sedimento foram mantidas refrigeradas durante todo o seu transporte para o Laboratório de Mutagênese Ambiental/Unesp-Rio Claro, onde foram armazenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, até serem utilizadas nas análises químicas e nos bioensaios.

Figura 1. Localização do município de Paracatu-MG (latitude $17^{\circ}13'20''$ S, longitude $46^{\circ}52'29''$ W). Pontos de coleta das amostras de água e sedimento: 1- (P1), 2- (P2) e 3- (P3) - Córrego Rico; 4- (P4) - Córrego Santo Antônio; 5- (P5) - Ribeirão Santa Rita; 6- (P6) - Ribeirão São Pedro; 7- (P7) - Ribeirão Santa Isabel; 8- (P8) - Água de abastecimento público.



Fonte: Adaptado de Google My Maps

Tabela1. Descrição dos pontos de coleta das amostras de sedimento, distribuídos em uma área sob influência de uma mineradora de ouro.

Pontos	Córrego	Localização	Coordenadas (UTM)			Tipo
			Fuso	X	Y	
P1	Córrego Rico	A jusante da mineradora e a montante da confluência com o Córrego Espalha	23 K	298912	8096066	Arenoso
P2	Córrego Rico	A jusante da confluência com o Córrego Espalha e a montante do perímetro urbano (Paracatu)	23 K	298976	8095370	Arenoso
P3	Córrego Rico	Ao final do perímetro urbano (Paracatu)	23 K	301513	8092911	Arenoso
P4	Córrego Santo Antônio	A jusante da barragem de rejeitos	23 K	305055	8103539	Argiloso
P5	Ribeirão Santa Rita	Antes da confluência com o Córrego São Domingos	23 K	303276	8106996	Argiloso
P6	Ribeirão São Pedro	Após receber contribuições do ribeirão Santa Rita e do Córrego Santo Antônio	23 K	306214	8104425	Argiloso
P7	Ribeirão Santa Isabel	Antes da captação da ETA (COPASA)	23 K	292183	8090285	Argiloso
P8	-	Água de abastecimento público - cavalete do consumidor	23K	299936	8095537	-

2.3. Preparo do extrato solubilizado

O extrato solubilizado de cada amostra de sedimento foi obtido por meio dos procedimentos indicados na norma NBR 10006 da ABNT (ABNT, 2004). Foram dissolvidos 62,5 g da amostra (peso seco) em 250 mL de água ultrapura, seguido de agitação em baixa velocidade, por 5 minutos. Na sequência, os béqueres contendo as amostras foram recobertos com filme PVC e colocados em repouso, por 7 dias, em incubadora BOD ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), para decantação. Decorrido os 7 dias, a fase líquida de cada uma das amostras foi coletada e filtrada em membrana de $0,45\text{ }\mu\text{m}$. Os extratos obtidos foram então armazenados em geladeira ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), até seu uso nos bioensaios.

2.4. Bioensaios com células HepG2/C3A

Células de hepatocarcinoma humano (HepG2/C3A) foram descongeladas e cultivadas, para a realização dos experimentos. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, 3 g de glicose, 1,2 g de bicarbonato de sódio e 1 mL de antibiótico (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 0,1 mg/mL).

Os frascos contendo as células foram mantidos, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, em estufa de CO_2 , por pelo período de, pelo menos, 2 repiques, para fins de estabilização celular. Os repiques para confecção dos frascos foram realizados lavando-se os frascos duas vezes com PBS, tripsinizados com Tripisina-EDTA (0,5%), por 5 minutos, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posterior inativação com 1,5 mL de meio DMEM suplementado. Em seguida, as células foram passadas em seringa estéril de 1 mL para a dissociação das células. Após as células terem atingido a confluência nos frascos repicados, foram realizados novos repiques, transferindo as células dos frascos para novos frascos (pré-frascos), onde cada um recebeu a quantidade de células necessária para a realização do experimento. Para o ensaio do cometa, foram utilizadas, aproximadamente, 5×10^5 células por pré-frasco e para o ensaio do MN, 1×10^6 células por pré-frasco. Estas células foram mantidas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa de CO_2 , por 24h, para estabilização das condições do ensaio. Esse período corresponde a 1 ciclo de divisão celular, que é também o tempo necessário para que as células possam se aderir ao frasco. Em seguida, as células foram expostas aos tratamentos.

2.4.1. Exposição aos tratamentos

Após o período de estabilização de 24h, o meio dos frascos foi descartado e substituído por um novo meio de cultura suplementado, contendo os tratamentos. Foram realizadas duas exposições, uma com as amostras de água e outra com as amostras de sedimento (solubilizado), ambas na concentração de $200\text{ }\mu\text{L/mL}$. As amostras foram previamente filtradas em membrana

estéril de 0,22 μm . Para ambos os ensaios, foram realizados testes controle negativo (CN), com meio DMEM suplementado e PBS (200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e controle positivo (CP), com meio DMEM suplementado e MMS ($4 \times 10^{-2}\text{M}$). Os ensaios foram realizados em triplicata e, após o período de exposição de 3 horas, foram submetidos ao ensaio do cometa e ao ensaio do MN com bloqueio de citocinese.

2.4.2. Ensaio do Cometa

Para realização do ensaio do cometa, a suspensão celular, obtida após o tempo de exposição aos tratamentos, foi coletada e transferida para tubos Falcon®, para centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm. Em seguida, foi retirado o sobrenadante e a suspensão foi homogeneizada. Após a homogeneização, a suspensão celular foi transferida, com o auxílio de uma seringa de 1mL, para outros tubos, para a obtenção de células isoladas. Com esse material, foi realizado um ensaio de viabilidade celular (azul de tripan), onde foram consideradas, para a continuidade do teste, viabilidade celular superior a 80%.

Para o ensaio do cometa, as lâminas foram montadas com 20 μL da suspensão celular e 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão, a 37 °C. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, aproximadamente 8 g de NaOH sólido para 1 L), pH 10, e mantidas no escuro, a 6 °C (em refrigerador), por 1 hora. Em seguida, as lâminas foram dispostas em uma cuba de eletroforese, contendo solução tampão (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM, com pH>13), por 20 minutos, para a deselcoídização do DNA. A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 39 V e 300 mA (~ 0,8 V/cm). Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas, por 15 minutos, em tampão de neutralização (pH 7,2). Em seguida, as lâminas foram dispostas para secagem e posterior fixação com etanol absoluto, por 10 minutos. As lâminas foram coradas com 50 μL de solução de GelRed® (15 μL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1 M, e 45 mL de água destilada), no momento da realização das análises microscópicas.

Foram analisados 50 nucleóides por lâmina (WIKLUND; AGURELL, 2003; LOVEL; OMORI, 2008; REISINGER *et al.*, 2018), totalizando 300 nucleóides por tratamento em microscópio de epifluorescência (Leica, modelo 4000B). Os nucleóides foram avaliados por meio do *software Comet Assay IV*, sendo considerado o parâmetro de momento da cauda de Olive, de acordo com a OECD - 489 (OECD, 2014a).

Para as análises estatísticas, foram consideradas as médias dos valores de momento da cauda de Olive de cada lâmina, em comparação às médias do CN. Os resultados obtidos nas

análises foram submetidos aos Testes de Shapiro-Wilk, para normalidade e de Levene, para homogeneidade. Em seguida, foi selecionado o teste mais apropriado para a análise.

2.4.3. Ensaio do MN com bloqueio de citocinese

Após o período de exposição, o meio de cultura foi substituído por outro meio novo, contendo 3 µg/mL de citocalasina B. Para a obtenção de células binucleadas, esses frascos foram incubados, por 30 horas, a 37 °C, em estufa de CO₂. Decorrido este tempo, as células foram coletadas, tratadas com solução hipotônica fria de KCl (5,6 g/L) e centrifugadas (1500 rpm por 5 minutos). Após descarte do sobrenadante, foram adicionados ao pellet a solução fixadora de Carnoy (metanol-ácido acético 3:1, v/v) e 2 gotas de formaldeído. Os tubos foram mantidos em geladeira (-6 °C), até o momento da confecção das lâminas.

Para confecção das lâminas, elas foram previamente lavadas com Extran, abundantemente enxaguadas e mantidas em água ultrapura a 4°C. A suspensão celular obtida dos tratamentos foi gotejada sobre as lâminas contendo um filme de água e, em seguida, foram dispostas para secagem em temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com reagente de Schiff, por 2 horas, seguida de coloração com Giemsa 5%, por 5 minutos.

Foram analisadas, em microscopia de luz (aumento de 1000x), 1.000 células binucleadas por lâmina, sendo 2 lâminas por frasco, totalizando 6.000 células por tratamento. Foram contabilizadas a presença de pontes nucleoplasmáticas, brotos e MNs (FENECH, 2007). Também foi quantificado o Índice de proliferação com bloqueio de citocinese (CBPI), de acordo com a OECD (OECD, 2014b). Para o cálculo do CBPI, foram analisadas 500 células por lâmina e, em seguida, utilizada a equação:

$$CBPI = \frac{N1 + (2xN2) + (3xN3) + (4xN4)}{\text{Total de células}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: N1 é o número de células com 1 núcleo; N2 é o número de células com 2 núcleos; N3 é o número de células com 3 núcleos e N4 é o número de células com 4 núcleos ou mais.

Para avaliação de morte celular, foi realizado o cálculo de Índice de morte celular, como segue:

$$\text{Índice de Morte Celular} = \frac{\text{Nº total de células em processo de morte celular}}{\text{Nº total de células observadas}} \quad (\text{Equação 2})$$

Para as análises estatísticas, os resultados foram submetidos aos Testes de Shapiro-Wilk, para normalidade e de Levene, para homogeneidade. Em seguida, foi selecionado o teste mais apropriado para a análise.

3. Resultados e Discussão

3.1. Análises químicas das amostras de água e sedimentos (solubilizados)

Os resultados das análises das quantificações de metais presentes nas águas e sedimento dos rios do entorno das atividades de mineração do Morro do Ouro (Paracatu-MG) estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

3.2. Ensaio do cometa

Para análise da genotoxicidade das amostras de água e sedimento (solubilizado), foi realizado o ensaio do cometa com células HepG2/C3A. Antes do desenvolvimento deste ensaio, foi realizado o teste prévio de viabilidade celular com azul de tripan, cujos resultados mostraram que todas as amostras tiveram viabilidade celular superior a 80%, condição esta indicada para o prosseguimento do ensaio.

Os resultados obtidos para o ensaio do cometa, referente ao parâmetro momento da cauda de Olive, estão apresentados na Figura 2.

Pelos resultados de momento da cauda de Olive (Figura 2), todos os pontos de coleta de água e a maioria dos solubilizados dos sedimentos coletados (exceto o ponto P6) não apresentaram efeito genotóxico. O resultado estatisticamente significativo para genotoxicidade do ponto 6 pode estar relacionado à presença de As (0,79 mg/kg) e a alta presença de Mn (104,82 mg/kg) na fração solúvel deste sedimento, conforme pode ser visto na Tabela 3.

A toxicidade do arsênio depende de sua forma química, do seu estado de oxidação, da natureza química dos substituintes no composto e das taxas de absorção e eliminação celular. O arsenito (As (III)) e arsenato (As (V)) são as espécies mais tóxicas do As, sendo o trivalente cerca de 60 vezes mais tóxico que o penta valente (CHATTERJEE *et al.*, 1995). A capacidade de adsorção do As depende da solubilidade dos meios onde ele se encontra (SOUZA, 2011). O óxido de manganês, em suas diversas formas (birnessita, criptomelano, pirolusita e manganita), promove a oxidação do As, tornando a molécula mais facilmente removida e, subsequentemente, adsorvida pela birnessita (As-Mn) (TANI *et al.*, 2004). Experimentos realizados pelos mesmos autores (TANI *et al.*, 2004) com linhagem do *hyphomycete* (KR21-2), capazes de oxidar enzimaticamente Mn (II) em óxido de manganês, mostraram que o Mn promove oxidação e adsorção de As (III). Os autores observaram que, após 24 horas da adição

Tabela 2. Resultados da análise química dos metais presentes nas águas de rios sob a influência de atividade de mineração de ouro da região de Paracatu-MG, nos seus diferentes pontos de coleta.

	Pontos de Coleta								Referência*	
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Classe 1 e 2	Classe 3
Alumínio (Al)	<LQ	49,0 ± 11,0	53,0 ± 3,0	299,0 ± 5,0	58,0 ± 2,0	<LQ	79,0 ± 1,0	<LQ	100 (diss)	200 (diss)
Arsênio (As)	13,0 ± 1,0	16,0 ± 0,4	17,0 ± 1,0	8,0 ± 1,0	<LQ	18,0 ± 1,0	<LQ	<LQ	10	33
Cadmio (Cd)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1	10
Chumbo (Pb)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	10,1 ± 0,4	10	33
Cobre (Cu)	1,7 ± 0,1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	46,7 ± 0,3	9 (diss)	13 (diss)
Escândio (Sc)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	-	
Ferro (Fe)	312,0 ± 2,0	1192,0 ± 9,0	79,0 ± 12,0	588,0 ± 5,0	226,0 ± 1,0	420,0 ± 1,0	1101,0 ± 3,0	436,0 ± 3,0	300 (diss)	5000 (diss)
Manganês (Mn)	16,5 ± 0,1	53,4 ± 0,5	8,0 ± 0,2	30,1 ± 0,1	10,1 ± 0,1	65,0 ± 0,4	31,4 ± 0,1	172,0 ± 1,0	100	500
Mercúrio (Hg)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,2	2

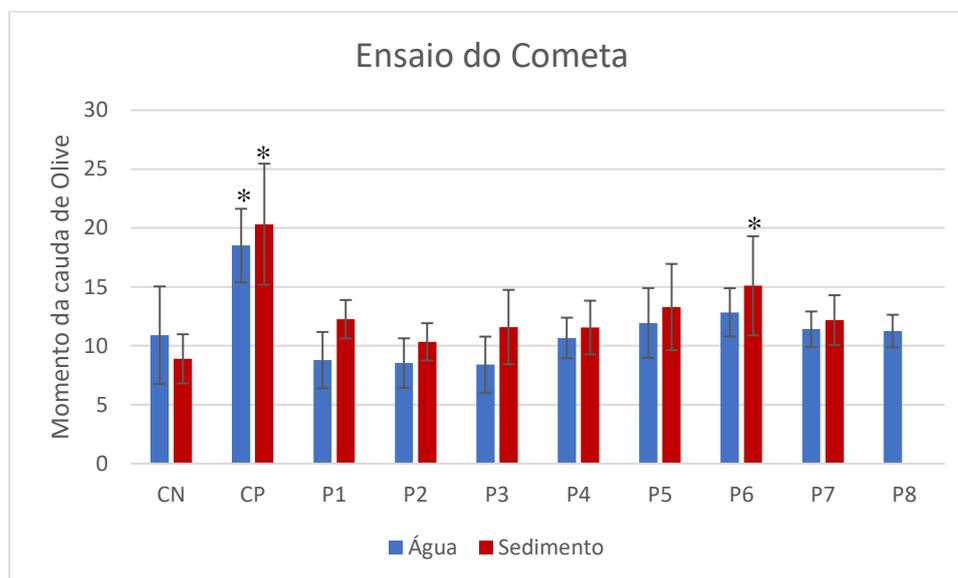
Os valores estão expressos em µg/L (média±desvio padrão). LQ = Limite de Quantificação (Al = 36,158; As = 5,143; Cd = 0,442; Cu = 1,710; Fe = 8,954; Hg = 2,801; Mn = 0,287; Pb = 4,508; Sc = 1,163). *Legislação CONAMA N° 357/2005.

Tabela 3. Quantificação estimada por extração sequencial dos metais presentes nos sedimentos (solubilizados) de rios sob a influência de atividade de mineração de ouro da região de Paracatu-MG, nos seus diferentes pontos de coleta.

Fase de extração	Pontos de coleta	Alumínio	Arsênio	Cadmio	Chumbo	Cobre	Escândio	Ferro	Mercúrio	Manganês
F1 (solúvel e trocável)	P1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3,66	<LQ	11,45
	P2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,15	<LQ	14,26
	P3	<LQ	0,56	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3,74	<LQ	18,39
	P4	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	7,32	<LQ	15,05
	P5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,67	<LQ	51,74
	P6	<LQ	0,79	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	16,05	<LQ	104,82
	P7	24,40	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	68,41	<LQ	93,90

Os valores estão expressos em mg/kg. LQ = Limite de Quantificação. F1 = Fase 1 (Fração solúvel e trocável).

Figura 2. Momento da cauda de Olive em células HepG2/C3A, após exposição da linhagem celular HepG2 às diferentes amostras de água e sedimento (solubilizado) coletadas em rios da região da mina Morro do Ouro (Paracatu-MG).



Valores expressos em Média \pm Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 4×10^{-2} M). P1-8 = pontos de coleta*Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao CN, de acordo com ANOVA/Dunnet.

da As (III) a uma solução de Mn, o As adsorvido foi encontrado, principalmente, sob a forma de As (V), diminuindo a presença de As (III) da amostra. Os autores concluíram que essa diminuição da fase aquosa de As (III) resultou de sua conversão em As (V), que foi então adsorvido, ao invés de haver a adsorção direta de As (III). Esta interação entre esses compostos (Mn e As) pode ser a responsável pela baixa genotoxicidade registrada para os sedimentos, embora não tenha sido suficiente para inativar a ação genotóxica da amostra do sedimento do P6. Estudos realizados por Petres, Baron e Hagedorn (1977) citam que o As pode desencadear efeitos crônicos nos organismos, pela indução de anomalias cromossômicas não letais, que podem se expressar muitos anos após ao evento de exposição, estudo este que serve de alerta para o potencial genotóxico registrado no presente estudo, para o sedimento do P6.

Esta ação genotóxica do As pode também ser devido a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que induzem estresse genotóxico, como atrasos no ciclo celular, danos no DNA e apoptose (ROY *et al.*, 2018).

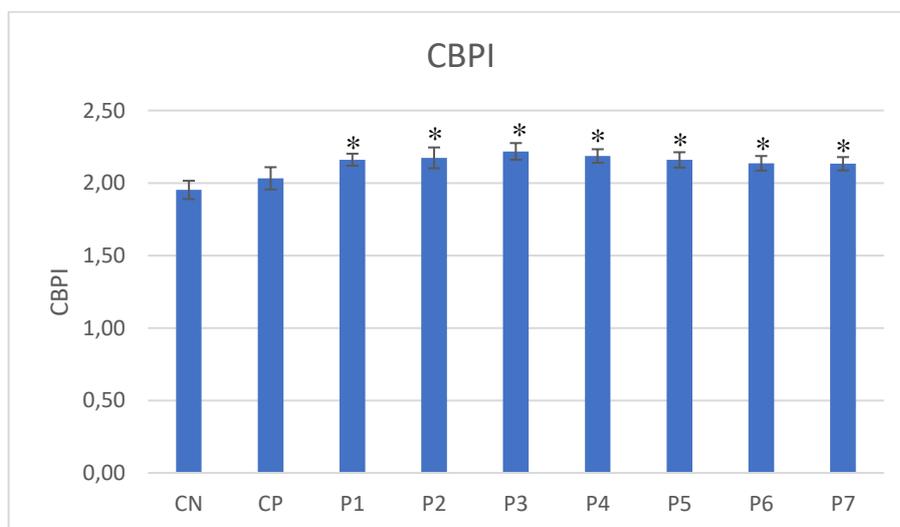
Os resultados do teste do cometa, para células expostas as amostras das águas coletadas nos mesmos pontos dos sedimentos, não se mostraram genotóxicas para nenhum ponto amostrado (Figura 2). A ausência de genotoxicidade dessas águas pode estar relacionada aos teores mais elevados de As (Tabela 2), que os dos sedimentos (Tabela 3). que podem ter

induzido maior citotoxicidade para essas amostras. Essa sugestão pode ser justificada pelos resultados de experimentos realizados com as mesmas amostras, por Corroqué (2019 - Artigo 2 deste documento, dados não publicados) com o organismo teste *A. cepa*, onde foi encontrado indícios de morte celular por necrose em células meristemáticas, após exposição das sementes nas mesmas amostras.

3.3. Ensaio do MN com bloqueio de citocinese

O índice de proliferação por bloqueio de citocinese (CBPI) apresentou resultados estatisticamente significativos para todos os pontos de coleta de sedimento, como apresentado na Figura 3. Esses resultados mostraram a indução de proliferação celular pelas amostras testadas, que pode ser devido à presença do As, mesmo que em quantidades menores que o limite de quantificação do metal, ou de efeitos sinérgicos das substâncias presentes nas amostras. Os resultados aqui apresentados são discordantes das citações de Fashola, Ngole-Jeme e Babalola (2016), que afirmam que a contaminação por alguns metais derivados de atividades de mineração de ouro causam inibição do ciclo celular. Contudo, corroboram as afirmações de Simeonova *et al.* (2000), de que o As atua nas vias de sinalização que regulam a proliferação celular, e não na indução de danos diretos ao DNA. Esses autores ainda inferem que a indução de proliferação celular pode ser desencadeada até mesmo por baixas concentrações do metal.

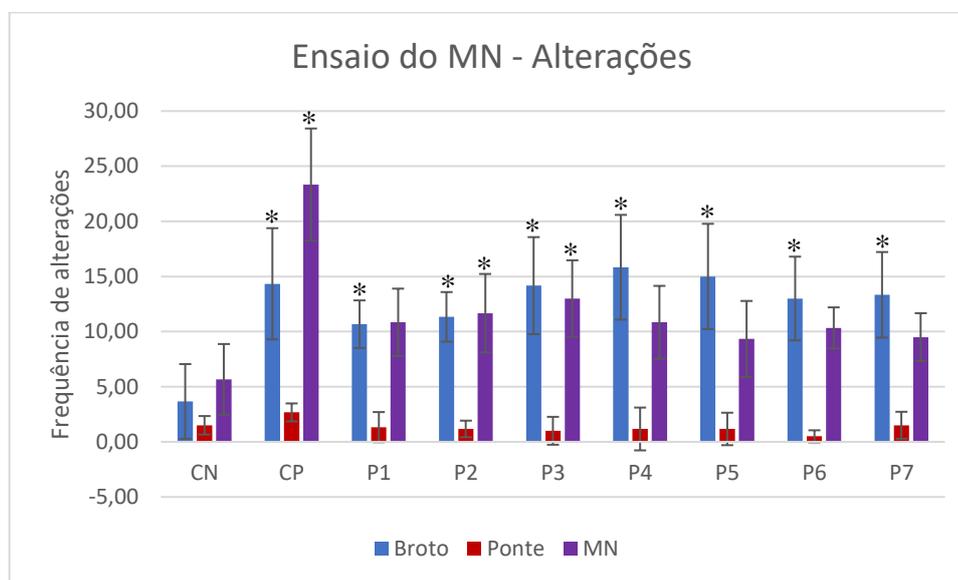
Figura 3. Resultados de CBPI em células HepG2/C3A, após exposição às diferentes amostras dos sedimentos (solubilizado) analisados.



Valores expressos em Média ± Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 4×10^{-2} M); P1 a 7 = pontos de coleta; *Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao CN, de acordo com ANOVA/Dunnet.

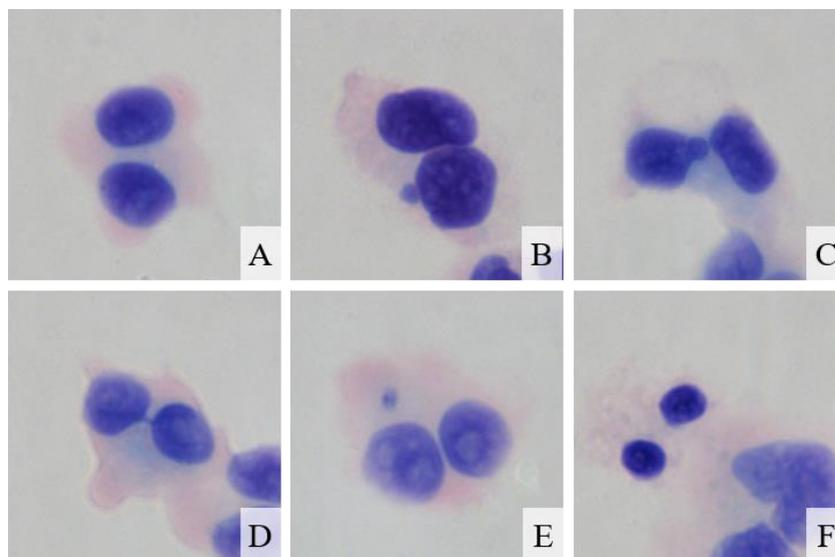
Os resultados das alterações observadas no ensaio do MN, realizado com as células HepG2/C3A expostas às amostras de sedimento (solubilizado), estão dispostos nas Figuras 4 e 5. Esses resultados indicaram potencial de genotoxicidade para todas as amostras de sedimentos analisados, por apresentarem índices significativos de indução de broto nuclear. Esse efeito registrado pode ser atribuído à presença de metais, mesmo em quantidades não detectáveis pela análise química, como já citado por Simeonova *et al.* (2000), nos seus ensaios de proliferação celular. Este resultado, apesar de contraditório com o resultado do teste do cometa, pode ser explicado pela possibilidade dos danos no DNA estarem ligados a estágios iniciais de apoptose, e não por quebras do DNA (DIAS *et al.*, 2014; PAMPLONA-SILVA, 2017). Salienta-se ainda que, por se tratar de *endpoints* diferentes, pode haver diferença de sensibilidade entre eles, o que possibilita, quando testados conjuntamente, uma melhor avaliação do potencial genotóxico de amostras ambientais.

Figura 4. Alterações observadas no ensaio do MN com bloqueio de citocinese em células HepG2/C3A, após exposição às diferentes amostras dos sedimentos (solubilizado) analisados.



Valores expressos em Média \pm Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 4×10^{-2} M); P1 a 7 = pontos de coleta. *Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao CN, de acordo com ANOVA/Dunnet.

Figura 5. Efeitos observados em células HepG2/C3A, após exposição em amostras de água e sedimentos de rios do entorno das atividades de uma mineradora de ouro de Paracatu-MG.



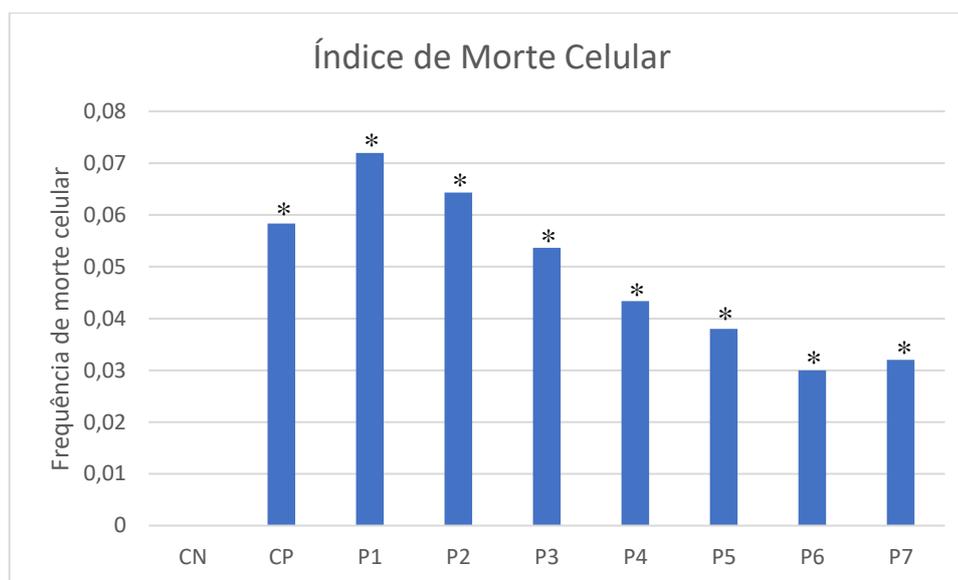
A- Célula binucleada; B e C Célula binucleada com broto; D- Célula binucleada com ponte nucleoplasmática; E- Célula binucleada com MN; F- Célula binucleada com núcleo reduzido. Aumento: 1000 x. Fonte: Próprio autor.

Os resultados para o parâmetro de mutagenicidade, obtidos por meio da contagem de MNs em células binucleadas, estão dispostos nas Figuras 4 e 5. Essa avaliação mostrou valores estatisticamente significativos para os pontos P2 e P3. Em P2, o efeito mutagênico foi observado, apesar da amostra não apresentar presença detectável de As na fração solúvel. Já na amostra P3, o As foi detectado, mas em baixas concentrações (0,59 $\mu\text{g/L}$). A ação mutagênica das amostras pode estar ligada à interação de seus poluentes, pois sabe-se que o As, mesmo que em baixíssimas concentrações, pode interagir com outros compostos mudando sua natureza, aumentando ou reduzido sua precipitação, adsorção (MASUE; LOEPPERD; TIM, 2007) e, conseqüentemente, a sua toxicidade. Estes resultados corroboram os dados de Wang *et al.* (2011), que comprovaram que a interação do As com óxidos metálicos, como o óxido de alumínio, pode aumentar a toxicidade do As.

Biggs *et al.* (1997) avaliaram, na mesma região em que o presente estudo foi desenvolvido, a relação entre a presença de As na urina de pessoas expostas ao metal com a presença de MN nas suas células de bexiga. Os autores também encontram resultados que sugerem morte celular, quando o As foi encontrado em alta concentração na urina. De acordo com Santos e Dani (2016), que também estudaram a mesma região de Paracatu-MG, as concentrações de As observadas em urina de pessoas expostas cronicamente a esse metal é um

bom parâmetro para medir o risco à saúde humana da exposição à ambientes contaminados com As.

Figura 6. Índice de morte celular observado no ensaio do MN com bloqueio de citocinese em células HepG2/C3A, após exposição às diferentes amostras dos sedimentos (solubilizado) analisados.



Valores expressos em Média ± Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 4×10^{-2} M). *Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao CN, de acordo com ANOVA/Dunnet.

Os resultados para o índice de morte celular (IMC) estão apresentados nas Figuras 5 e 6. Os IMC de todas as amostras avaliadas foram estatisticamente significativos, em relação ao teste controle, o que corrobora os resultados já apresentados para os outros biomarcadores testados. Os resultados deste estudo sugerem que o As, quando em misturas complexas, pode desencadear tanto morte celular por necrose como por apoptose, sugestão também apresentada por Cordero *et al.* (2018), em que os autores afirmaram que a apoptose e a necrose podem ocorrer simultaneamente, dependendo da intensidade e duração da exposição ao As.

4. Conclusão

Para o ensaio do cometa, não foram evidenciados danos genotóxicos em nenhuma das amostras de água coletadas, enquanto as amostras de sedimento mostraram resultados significativos para a amostra do ponto P6. Essa ausência de danos genotóxicos pode estar associada ao índice de morte celular, que por sua vez, pode ser promovida pela presença de agentes citotóxicos aos quais as células foram expostas.

Já para o ensaio do MN com bloqueio de citocinese, os danos genotóxicos foram evidenciados pela presença de brotos nucleares em todas amostras de sedimento (solubilizado). Essas alterações podem estar relacionadas à processos iniciais de apoptose e não somente à quebra do DNA. Resultado esse evidenciado no índice de morte celular, que mostrou que todas as amostras de sedimento analisadas foram também citotóxicas. Além disso, também foi observado aumento no índice de proliferação celular em todas as amostras de sedimento, reforçando os efeitos citotóxicos dessas amostras.

Os resultados mostraram mutagenicidade somente para as amostras dos pontos P2 e P3, indicando uma possível relação da mutagenicidade com a interação entre os compostos presentes na amostra, já que o As pode interagir com outros elementos, alterando fatores como precipitação, adsorção ou até mesmo a sua toxicidade.

Esses resultados mostram que mesmo presentes em concentrações muito baixas, esses elementos podem causar sérios danos à saúde humana, assim como aos organismos endêmicos de locais contaminados com esse metal.

Esse estudo reforça a necessidade de uma maior avaliação na região de Paracatu, que garanta a manutenção da qualidade ambiental de águas e sedimentos de recursos hídricos da região, e assegure a proteção da sua vida aquática e da saúde ambiental.

5. Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

6. Referências

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR1006: Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004.

AGUIAR, LUCAS GABRIEL SILVA. **Avaliação da contaminação potencial por metais em solos e sedimentos na região da Mina Morro do Ouro, Paracatu – MG**. Dissertação (Mestrado em Geociências) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2018 (132f.).

ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R. O.; SILVA, J., Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**, v.560, p.57–67, 2004.

BARRETO, M. L. **Mineração e desenvolvimento sustentável: desafios para o Brasil**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2001.

BIDONE, E. D. *et al.* Environmental risk increase due to heavy metal contamination caused by a copper mining activity in Southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 2, 2001.

BIGGS, M.L. *et al.* Relationship of urinary arsenic to intake estimates and a biomarker of effect, bladder cell micronuclei. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v.386, p.185–195, 1997.

CHATTERJEE, A. *et al.* Arsenic in groundwater in six districts of West Bengal, India: The biggest arsenic calamity in the world. Part 1-Arsenic species in drinking water and urine of the affected people. **Analyst**, v.120, p.643-650, 1995.

CORDERO, H. *et al.* Inorganic arsenic causes apoptosis cell death and immunotoxicity on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Marine Pollution Bulletin**, v.128, p.324–332, 2018.

DIAS, E. *et al.* Genotoxicity of microcystin-LR in *in vitro* and *in vivo* experimental models. **BioMed Research International**, v.2014, 2014.

FASHOLA, M. O.; NGOLE-JEME, V. M.; BABALOLA, O. O. Heavy metal pollution from gold mines: Environmental effects and bacterial strategies for resistance. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, 2016.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**, v.600, p.58- 66, 2006.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature**, v.2, p.1084-1104, 2007.

FILGUEIRAS, A. V.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Evaluation of distribution, mobility and binding behavior of heavy metals in surficial sediments of Louro River (Galicia, Spain) using chemometric analysis: a case study. **Science of the total Environment.**, v.330, p.115 – 129, 2004.

IBRAM. **Relatório Anual de Atividades** - Julho de 2017 a junho de 2018. p. 40, 2018. Disponível em: <http://portaldamineracao.com.br/ibram/wp-content/uploads/2018/07/Diagramação_RelatórioAnual_versãoweb.pdf>. Acesso em: agosto/2019.

LAYBAUER, L.; BIDONE, E. D. Partição de metais pesados em águas superficiais impactadas por atividade de mineração – minas do Camaquã. **Geoquímica Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 12, p. 55-62, 1998.

LOVEL, D.P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, v.23, p. 171-182, 2008.

MASUE, Y.; LOEPPERD, R. H.; TIM, K. Arsenate and Arsenite Adsorption and Desorption Behavior on Coprecipitated Aluminum : Iron Hydroxides. **Environmental Science and Technology**, v.41, p.837–842, 2007.

MATSUMOTO, S. T. *et al.* Assessment of the genotoxic and mutagenic effect of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in of *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.148–158, 2006.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potencial value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, Amsterdam, v.399, p.135-147, 1998.

NORDSTROM, D.K.; SOUTHAM, G. Geomicrobiology of sulphide mineral oxidation. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v.35, p.361-390, 1997.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - 489. **Guideline for the testing of chemicals, *in vivo* mammalian alkaline comet assay**, 2014a.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - 487. **Guideline for the testing of chemicals, *in vitro* mammalian cell micronucleus test**, 2014b.

PAMPLONA-SILVA, M. T. **Avaliação dos efeitos tóxicos e genéticos de microcistinas naturais e sintéticas, sob sistemas testes animais e vegetais**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2017.

PAMPLONA-SILVA, M. T.; GONÇALVES, L. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genetic toxicity of water contaminated by microcystins collected during a cyanobacteria bloom. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 223–230, 2018.

PARACATU. **Prefeitura de Paracatu – A cidade: História**. Disponível em: <<http://paracatu.mg.gov.br/cidade>>. Acesso em: julho de 2019.

PAVLICA, M. *et al.* Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. **Mutation Research**, v.490, p.209–214, 2001.

PETRES, J.; BARON, D.; HAGEDORN, M. Effects of Arsenic Cell Metabolism and Cell Proliferation : Cytogenetic and Biochemical Studies. **Environmental Health Perspectives**, v. 19, p. 223–227, 1977.

RABELLO-GAY, M. N. Testes com organismos superiores. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e critérios de avaliação**, Ribeirão Preto – SP. Sociedade Brasileira de Genética, 1991, p. 59-75.

REISINGER, K., *et al.* Validation of the 3D skin comet assay using full thickness skin models: transferability and reproducibility. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 827, p. 27-41, 2018.

ROGERO, S.O. *et al.* Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, São Carlos, v. 6, p. 317-320, 2003.

ROY, J. S. *et al.* Substantial evidences indicate that inorganic arsenic is a genotoxic carcinogen: A review. **Toxicological Research**, v.34, p.311–324, 2018.

SALOMONS, W.; STIGLIANI, W. **Biogeochemistry of pollutants in soils and sediments: risk assessment of delayed and non-linear responses**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. 352 p.

SANTOS, M. J.; DANI, S. U. Arsenic contamination of the environment and the human compartment by gold mining in Paracatu, MG, Brazil. In: Congresso da Sociedade de Análise de Risco Latino Americana, 3., 2016, São Paulo. **Anais [III Congresso da Sociedade de Análise de Risco Latino Americana]**. São Paulo, 2016.

SIMEONOVA, P. P. *et al.* Arsenic Mediates Cell Proliferation and Gene Expression in the Bladder Epithelium : Association with Activating Protein-1 Transactivation. **Cancer Research**, v.60, p. 3445–3453, 2000.

SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, San Diego, v.175, p.184-191, 1988.

SOMMAGGIO, L. R. D. *et al.* Evaluation of the potential agricultural use of biostimulated sewage sludge using mammalian cell culture assays. **Chemosphere**, v. 199, P.10-15, 2018.

SOUSA, R. **Mineração**. Disponível em:
<<https://brasilecola.uol.com.br/geografia/mineracao.htm>>. Acesso em: ago 2019.

SOUZA, M.G.O. **Avaliação da concentração de arsênio em partículas fracionadas por tamanho na atmosfera do recôncavo baiano**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2011.

STIVAL, M. M.; SILVA, S. D. E. O desastre da barragem de mineração em Mariana e os impactos no Direito Internacional Ambiental e no brasileiro. **Revista Direito Ambiental e sociedade**, v. 8, n. 2, p. 205–228, 2018.

TANI, Y. *et al.* Interaction of Inorganic Arsenic with Biogenic Manganese Oxide Produced by a Mn-Oxidizing Fungus , Strain KR21-2. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 24, p. 6618–6624, 2004.

VAN GOETHEM, F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic affects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. **Mutation Research**, v.392, p.31–43, 1997.

WANG, D. *et al.* Synergistic toxic effect of nano-Al₂O₃ and As (V) on *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Pollution**, v.159, p.3003–3008, 2011.

WIKLUND, S.J.; AGURELL, E. Aspects of design and statistical anlysis in the Comet assay. **Mutagenesis**, v.18, p. 167-176, 2003.

6 CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

➤ As análises de extração sequencial juntamente com as análises químicas, foram de grande importância para avaliação dos metais presentes nas amostras de sedimento coletadas, bem como para a compreensão do quanto esses componentes estão biodisponíveis nas amostras;

➤ As análises do fator de enriquecimento (EF) mostraram que as áreas a jusante da mineradora já possuem solos e sedimentos enriquecidos com os metais As, Cd, Pb e Fe, em decorrência da sua própria composição química natural. No entanto, a influência das atividades antrópicas, como a mineração, pode estar levando a um aumento nos teores desses metais, principalmente do As. Os pontos próximos à barragem de rejeitos mostraram enriquecimento por As, Pb e Fe, indicando que essa região está sendo enriquecida, principalmente, pelas atividades de mineração;

➤ O índice de geoacumulação (Igeo) indicou que não há níveis de poluição associados aos elementos Al, Cd, Pb, Cu, Fe e Mn, em nenhum dos pontos coletados, mostrando que a ocorrência desses elementos se dá por fontes naturais e não de origem antrópica. O As apresenta níveis de poluição nos sedimentos, tanto na região de influência da mineração, quanto na região da barragem, corroborando com os dados obtidos com o EF;

➤ Os valores obtidos pelo código de avaliação de risco (RAC) mostraram que a maioria dos metais avaliados nas amostras de sedimento apresentam baixo risco para o meio ambiente. Contudo, os elementos Pb e Cu apresentaram médio risco no ribeirão São Pedro (P6), o As médio risco no ribeirão Santa Rita (P5) e no ribeirão Santa Isabel (P7), o Fe apresentou médio risco no córrego Rico (P1), no ribeirão São Pedro (P6) e no ribeirão Santa Isabel (P7) e o Mn apresentou alto risco para a maioria dos pontos. Esses resultados indicam que esses elementos estão biodisponíveis nestes pontos, podendo afetar a biota desses corpos d'água, assim como a saúde humana. Esses resultados são ainda mais preocupantes devido ao fato de o ribeirão Santa Isabel (P7), que apresentou risco para o As, Fe e Mn, ser utilizado para captação da água de abastecimento público do município de Paracatu-MG, evidenciando a necessidade de estudos mais detalhados desse recurso hídrico;

➤ Os ensaios realizados com *Allium cepa* mostraram que as amostras de água analisadas apresentaram citotoxicidade e genotoxicidade, e as amostras de sedimento apresentaram genotoxicidade. Foi observado ainda potencial mutagênico nos pontos P2, P5 e P7 nos sedimentos e em P2, P3 e P8 nas amostras de água. Esses resultados mostraram que tanto as águas quanto os sedimentos dos corpos d'água avaliados oferecem riscos aos

organismos expostos, assim como à saúde da população desta região. Os resultados obtidos dos pontos P7 e P8 são ainda mais preocupantes, pois as águas destes pontos podem estar interferindo na saúde da população de Paracatu, uma vez que esses pontos se referem às águas de captação para abastecimento público e à própria água de abastecimento público, respectivamente;

➤ Os ensaios realizados com *Lactuca sativa* mostraram que as amostras de sedimento não interferiram na taxa de germinação, no entanto, as amostras de água tiveram que ser diluídas na proporção 1:6 (ponto: água ultrapura) para obtenção de germinação em todas as amostras e continuidade do ensaio. Entre os extratos do sedimento (solubilizado e lixiviado) foi possível observar diminuição na taxa de germinação induzida pelas amostras do ponto P3 (solubilizado). Apesar do extrato lixiviado não ter apresentado diferença significativa, as amostras analisadas tiveram que ser diluídas na proporção 1:11 (extrato: água ultrapura) para continuidade dos ensaios. Já para a avaliação de desenvolvimento das sementes, as amostras de água mostraram diminuição no crescimento de hipocótilo e da raiz nos pontos P1, P6 e P8, corroborando com os dados de IM obtidos com *Allium cepa*, cujos valores também se mostraram reduzidos para esses pontos. As amostras de sedimento mostraram diminuição do crescimento de hipocótilo nos pontos P1, P2, P3 e P5, mas não afetaram o crescimento das raízes. Para os extratos do sedimento (solubilizado e lixiviado), foi observado um aumento no crescimento de raiz induzido pelas águas do ponto P4, para os dois extratos, mas não houve alteração no crescimento do hipocótilo. A diminuição nas taxas de crescimento pode estar relacionada com a presença de elementos fitotóxicos, como Al e As, enquanto o aumento das taxas de crescimento pode ser decorrente da ausência ou baixa concentração desses mesmos elementos fitotóxicos;

➤ A espécie *Allium cepa* se mostrou mais eficiente que *Lactuca sativa* para avaliação da qualidade da água e dos sedimentos de rios, atuando como um bom bioindicador para biomonitoramento de áreas contaminadas por mineração. No entanto, *L. sativa* se mostrou mais sensível que *A. cepa*, necessitando de maiores diluições das amostras de água, para obtenção de sementes germinadas;

➤ Os ensaios de viabilidade celular com cultura de células humanas (HepG2/C3A), realizados com extratos do sedimento (solubilizado e lixiviado), mostraram que somente o ponto P6 (solubilizado) diminuiu significativamente a taxa de viabilidade celular, ainda assim, apresentando valores superiores a 80%. Embora o extrato lixiviado tenha apresentado valores de metais mais elevados do que o solubilizado, essa correspondência não foi verificada no ensaio de viabilidade celular, indicando maior sensibilidade para o extrato solubilizado na

avaliação de citotoxicidade desses sedimentos. Também foi possível concluir que o tempo de exposição de 3 horas pode não ter sido suficiente para avaliar os reais efeitos dos metais nestas amostras, como os do As;

➤ O ensaio do cometa, realizado com células HepG2/C3A, não evidenciou efeitos genotóxicos induzidos pelas amostras de água analisadas. Já as amostras de sedimento (solubilizado) promoveram danos genotóxicos para o ponto P6. Essa ausência de danos genotóxicos pode ser decorrente de uma atividade citotóxica dessas amostras, observada pelos índices de morte celular no ensaio do MN, realizado com esse mesmo bioindicador, bem como nos bioensaios com *Allium cepa*. Os danos genotóxicos observados no ponto P6 podem ser decorrentes de interações As-Mn, que diminuem a toxicidade do As, e consequentemente, altera, nessas amostras, de potencial de citotóxico para genotóxico;

➤ O ensaio do MN com bloqueio de citocinese mostrou que todas as amostras de sedimento (solubilizado) foram genotóxicas. Esses danos podem estar relacionados tanto à quebra do DNA quanto aos processos iniciais de apoptose. Neste ensaio também foi evidenciado um alto potencial citotóxico para essas amostras, pois todas apresentaram elevados índices para morte celular e de proliferação celular. As amostras de solubilizado dos pontos P2 e P3 também se mostraram mutagênicas;

➤ Diante de todos esses resultados, pode-se concluir que essa região possui naturalmente uma grande quantidade de metais, devido à composição das rochas do local. No entanto, as atividades antrópicas estão favorecendo o aumento da biodisponibilização desses elementos no ambiente. Além disso, pelos ensaios ecotoxicológicos realizados neste estudo, pode-se concluir que as águas e sedimentos dos rios estudados podem causar danos aos ecossistemas locais e a saúde humana. Esses resultados evidenciam também, a necessidade de mais estudos de biomonitoramento em áreas impactadas por atividades de mineração.

7 REFERÊNCIAS

ABERNATHY, C.O. *et al.* Arsenic: Health Effects, Mechanisms of Actions, and Research Issues. **Environmental Health Perspectives**, v.107, n.7, p.593-597, 1999.

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR1006: Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004a.

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR1005: Procedimento para obtenção de lixiviado de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004b.

ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. John Wiley and Sons, Inc. New York, 1990, 338 p.

ANA; CETESB. Agência Nacional de Águas (ANA) & Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). **Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras - Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos**, 2a. ed., Brasília: Distrito Federal, 2011.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for mercury**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, 1999. Disponível em:< <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp46-c1-b.pdf> > Acesso em: ago 2019.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for copper**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, 2004. Disponível em:< <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp132-c1-b.pdf> >. Acesso em: ago 2019.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for arsenic**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, 2007a. Disponível em:< <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf> >. Acesso em: ago 2019.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for lead**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, 2007b. Disponível em:< <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp13-c1-b.pdf> > Acesso em: ago 2019.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for aluminum**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, 2008. Disponível em:< <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp22.pdf> >. Acesso em: ago 2019.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for cadmium**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, 2012a. Disponível em:< <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp5-c1-b.pdf> >. Acesso em: ago 2019.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for manganese**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human

Services, 2012b. Disponível em: < <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp151-c1-b.pdf> >
Acesso em: ago 2019.

BAGUR-GONZÁLEZ, M. G. *et al.* Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. **Journal of Soils and Sediments**, v. 11, p. 281–289, 2011.

BARRA, C. M. *et al.* Arsenic speciation - A review. **Química Nova**, v.23, p.58-70, 2000.

BARRETO, M. L. **Mineração e desenvolvimento sustentável: desafios para o Brasil**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2001.

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 826–833, 2011.

BIANCHI, J.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARIN-MORALES, M.A. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.120, p.174-183, 2015.

BIANCHI *et al.* Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v.144, p.475-483, 2016.

BIDONE, E. *et al.* Hydrogeochemistry of arsenic pollution in watersheds influenced by gold mining activities in Paracatu (Minas Gerais State, Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 8546–8555, 2016.

BOETTCHER, M. *et al.* - Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.700, p.11-17, 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA nº 357/2005**. 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: Diário Oficial da União, 17 mar 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA nº 454, de 01/11/2012**. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional. Brasília: Diário Oficial da União, 08 nov 2012.

BRASIL. **Ministério de Minas e Energia - MME**. Boletim Informativo do Setor Mineral 2019. Disponível em:
<http://www.mme.gov.br/documents/10584/2674215/Boletim+Informativo+do+Setor+Mineral+2019/606fef71-b399-47b7-8cac-b0652e7ffe89?version=1.0>. Acesso em: ago 2019.

CARITÁ, R.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Comparison of the toxicogenetic potential of sewage sludges from different treatment processes focusing agricultural use. **Environmental Science and Pollution Research**, v.26, p.21475-21483, 2019.

CARVALHO, T. U.; Cultura de Células Animais. In: BENCHIMOL, M. (Org.). **Métodos de Estudo da Célula**. Rio de Janeiro: FENORTE/UENF., v.2, p.45-58, 1996.

CCME, Canadian Council of Ministers of the Environment. **Protocol for the derivation of Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life**. CCME, Ottawa, 1995.

CCME, Canadian Council of Ministers of the Environment. **Sediment Quality Index 1.0**. CCME, Ottawa, 2002.

CHARLES, J. *et al.* Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.2057-2064, 2011.

CHASIN, A. A. M.; PEDROSO, M. F. M. O estudo da toxicologia, In: CHASIN, A. A. M.; AZEVEDO, F. A. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 2003. São Paulo: Intertox, 2003. 340 p.

CHAUHAN, L.; SAXENA, P.; GUPTA, S. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 42, p. 181–189, 1999.

CHEN, G.; WHITE, P.A. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. **Mutation Research**, v.567, p.151–225, 2004.

DORNFELD, C.B. *et al.* Caracterização Ecotoxicológica do sedimento da Represa do Lobo (Itirapina-Brotas, SP) e seus Tributários. In: ESPÍNDOLA, E.L.G., ed. **Impactos ambientais em recursos hídricos: causas e conseqüências**. Rima editora. p. 245-259, 2001.

EATON; QIAN, 2002 - Molecular bases of cellular iron toxicity. **Free Radical Biology & Medicine**, v.32, p.833-840, 2002.

ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J.; DORNFELD, C. B. Estudos ecotoxicológicos no rio Mogi-Guaçu. ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J. (Org.). **Limnologia fluvial**. São Carlos: Rima, 2003. p.129–148.

FARIAS, C. E. G. Mineração e Meio Ambiente no Brasil - PNUD Contrato 2002/001604. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos Ciência, Tecnologia e Inovação**. São Paulo, 2002.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81–95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature**, v.2, p.1084-1104, 2007.

- FERNANDES, A.M. *et al.* Combined analysis of trace elements and isotopic composition of particulate organic matter in suspended sediment to assess their origin and flux in a tropical disturbed watershed. **Environmental Pollution**, v.218, p.844-854, 2016.
- FISKEJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v.102, p.99-112, 1985.
- FLEEGER, J.W.; CARMAN, K.R.; NISBET, R.M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **Science of the total environment**, v.317, p. 207– 233, 2003.
- GONÇALVES, R. J. **A história da fundação de Paracatu**. Publicado em 17 de junho de 2019. Disponível em: <<https://www.webartigos.com/artigos/a-historia-da-fundacao-de-paracatu/162593>>. Acesso em: ago 2019.
- GOPALAN, H.N.B. Ecosystem health and human wellbeing: the mission of the international programme plant bioassays. **Mutation Research**, v.426, p.99–102, 1999.
- GRANT, W. F.; Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. environmental protection agency. Gene-Tox program. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.
- HARA, R. V.; MARIN-MORALES, M. A. *In vitro* and *in vivo* investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State – Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p.321-330, 2017.
- HARIKUMAR, P.S.; JISHA, T.S. Distribution pattern of trace metal pollutants in the sediments of an urban wetland in the southwest coast of India. **International Journal of Engineering, Science and Technology**, v.2(2), p.840-850, 2010.
- HERRERO, O. *et al.* Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research**, v. 743, p. 20–24, 2012.
- HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review. **Mutation Research**, v.277, p.91-138, 1992.
- IBGE -INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Minas Gerais - Paracatu**, 2017. Disponível em: < <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/paracatu/panorama>>. Acesso em: ago 2019.
- IBRAM - INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. **Informações e análises da economia mineral brasileira**. 7ª ed., 2012. Disponível em: < <http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00002806.pdf>>. Acesso em: julho de 2015.
- IBRAM - INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. **Relatório Anual de Atividades - Julho de 2017 a junho de 2018**. p. 40, 2018. Disponível em: <http://portaldaminerao.com.br/ibram/wp-content/uploads/2018/07/Diagramação_RelatórioAnual_versãoweb.pdf>. Acesso em: agosto/2019.

ISO- International Organization for Standardization. 2004. **Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth**. No. 11269–1, 2004.

KAFRUNI, S. Proximidade entre mineradora e população põe moradores de Paracatu em risco. **Correio Braziliense**, Brasília, 20 mar. 2015. Disponível em: <http://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/cidades/2015/03/14/interna_cidadesdf,475445/proximidade-mineradora-populacao-poe-moradores-de-paracatu-em-risco.shtml>. Acesso em: jan.2016.

KAMER, I.; RINKEVICH, B. *In vitro* application of the comet assay for aquatic genotoxicity: considering a primary culture versus a cell line. **Toxicology in Vitro**, v.16, p. 177-184, 2002.

KOMISSAROVA, E.V.; SAHA, S.K.; ROSSMAN, T.G. Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 202, p.99-107, 2005.

KURAS, M. *et al.* 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, p. 211–221, 2006.

LAJMANOVICH, R.C. *et al.* Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.769, p.7-12, 2014.

LÁZARO, I. *et al.* Electrochemical oxidation of arsenopyrite in acidic media. **International Journal of Mineral Processing**, v.50, p.63-75, 1997.

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

LEME, D.M. *et al.* Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.2148-2155, 2011.

LOPES, P.R.M. **Biorremediação de um solo contaminado com óleo lubrificante pela aplicação de diferentes soluções de surfactante químico e biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI**. Tese DSc. Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2014.

LOVEL, D.P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, v.23, p. 171-182, 2008.

MAZZEO, D.E.C. *et al.* Application of micronucleus test and comet assay to evaluate BTEX biodegradation. **Chemosphere**, v.90, p.1030–1036, 2013.

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

MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M.A. Attesting the efficiency of monitored natural attenuation in the detoxification of sewage sludge by means of genotoxic and mutagenic Bioassays. **Chemosphere**, v.163, p.508-515, 2016.

MANZANO, B.C. *et al.* Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, p.1399–1407, 2015.

MILLER, C.V. *et al.* Water Quality in the Upper Anacostia River, Maryland: Continuous and discrete Monitoring with Simulations to Estimate Concentrations and Yields, 2003-05. **U.S. Geological Survey Investigations Report**, 2007-5142, p. 43, 2007.

MORTATTI, J. *et al.* Distribution of heavy metals in the geochemical phases of sediments from the Tietê River, Brazil. **Chemical Speciation & Bioavailability**, v.25, p.194-200, 2013.

MÜLLER, G. **Schwermetalle in den sedimenten des Rheins - Verfinderungen seit 1971**. Umschau. v. 79, p. 778-783. 1979.

NORDSTROM, D.K.; SOUTHAM, G. Geomicrobiology of sulphide mineral oxidation. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v.35, p.361-390, 1997.

NUNES, E. A. *et al.* Genotoxic assessment on river water using different biological systems. **Chemosphere**, v. 84, p. 47–53, 2011.

OECD- Organization for Economic Cooperation and Development. **Guideline 208. Terrestrial plant test: 208; Seedling emergence and seedling growth test**, 2003.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - 489. **Guideline for the testing of chemicals, *in vivo* mammalian alkaline comet assay**, 2014a.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - 487. **Guideline for the testing of chemicals, *in vitro* mammalian cell micronucleus test**, 2014b.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. 4ª edição. São Paulo: Atheneu Editora, 2014. 685p.

PALMIERI, M.J. *et al.* Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air & Soil Pollution**, v.227, p.1-10, 2016.

PAMPLONA-SILVA, M. T.; GONÇALVES, L. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genetic toxicity of water contaminated by microcystins collected during a cyanobacteria bloom. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 223–230, 2018.

PARACATU. **Prefeitura de Paracatu – A Cidade - História**. Disponível em: <<http://paracatu.mg.gov.br/cidade>>. Acesso em: agosto de 2019.

PASCALICCHIO, A. E. **Contaminação por metais pesados**. São Paulo: Ed. Annablume, 2002. 132 p.

PEREIRA, R. S. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. **Revista eletrônica de Recursos Hídricos**. IPH-UFRGS. v. 1, n. 1, p. 20- 36, 2004.

PERIN, G. *et al.* Heavy metal speciation in the sediments of Northern Adriatic Sea. A new approach for environmental toxicity determination. **Heavy Metals in the Environment**, v.2, p.454–456, 1985.

PLAZA, G. *et al.* The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. **Chemosphere**, v.59, p.289-296, 2005.

PLUMLEE, G.S. The environmental geology of mineral deposits. In: PLUMLEE, G.S.; LOGSDON, M.J. The environmental geochemistry of mineral deposits, Part A: Processes, techniques, and health issues. **Society of Economic Geologists, Reviews in Economic Geology**, v.6A, p.71-116, 1999.

PRIAC, A.; BADOT, P. M.; CRINI, G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, p. 188–194, 2017.

RABELLO-GAY, M. N. Testes com organismos superiores. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e critérios de avaliação**, Ribeirão Preto – SP. Sociedade Brasileira de Genética, 1991, p. 59-75.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington, Hemisphere Publishing, 1985.

RANK, J.; NIELSEN, M. Evaluation of the *Allium* anaphase–telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, v. 312, p. 17–24, 1994.

RANK, J.; JENSEN, K.; JESPERSEN, P.H. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled in costal sites from Denmark. **Mutation Research**, v. 585, p. 33–42, 2005.

REIFFERSCHIED, G., *et al.* Measurement of genotoxicity in wastewater samples with the in vitro micronucleus test results of a round-robin study in the context of standardisation according to ISO. **Mutation Research**, v.649, p.15-27, 2008.

REISINGER, K., *et al.* Validation of the 3D skin comet assay using full thickness skin models: transferability and reproducibility. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 827, p. 27-41, 2018.

ROGERO, S.O. *et al.* Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, São Carlos, v. 6, p. 317-320, 2003.

RUSSELL, J. B. **Química geral**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1994.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. **Genética Toxicológica**, Porto Alegre, p. 167–178, 2003.

SIMS, J., 2014. **Paracatu Project Brazil National Instrument NI-43-101 Technical Report prepared by Kinross Gold Corporation**. Disponível em <https://s2.q4cdn.com/496390694/files/doc_downloads/technical_reports/2014TR-Paracatu.pdf> Acesso em: jul 2019.

SINGH, N.P. *et al.* A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v.175, p. 184-191, 1988.

SMAKA-KINCL, V. *et al.* The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. **Mutation Research**, v.368, p.171-179. 1996.

SOBRERO, M.C.; RONCO, A.E. Capítulo 4.4: Protocolos de Prueba. Bioensayo de Toxicidad Aguda con Semillas de Lechuga (*Lactuca sativa*). In: **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones**. Gabriela Castillo editora. Edición conjunta IDRC, SEMARNAT, IMTA, México.188 pp, 2004.

SOMMAGGIO, L.R.D. *et al.* Ecotoxicological and microbiological assessment of sewage sludge associated with sugarcane bagasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.147, p.550–557, 2018a.

SOMMAGGIO, L. R. D. *et al.* Evaluation of the potential agricultural use of biostimulated sewage sludge using mammalian cell culture assays. **Chemosphere**, v. 199, P.10-15, 2018b.

SUARES-ROCHA, P. *et al.* Assessment of cytotoxicity and AhR-mediated toxicity in tropical fresh water sediments under the influence of an oil refinery. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, p.12566–12575, 2015.

TEIXEIRA, R. O. *et al.* Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 551–555, 2003.

TOYOKUNI, S., 2009. Role of iron in carcinogenesis: Cancer as a ferrotoxic disease. **Cancer Science**, v. 100, p.9-16, 2009.

TOYOKUNI, S. Iron as a target of chemoprevention for longevity in humans. **Free Radical Research**, v. 45, p.906-917, 2011.

TOYOKUNI, S. The origin and future of oxidative stress pathology: From the recognition of carcinogenesis as an iron addiction with ferroptosis-resistance to non-thermal plasma therapy. **Pathology International**, v.66, p.245-259, 2016.

USEPA- United States Environmental Protection Agency. **Ecological effects test guidelines (OPPTS 850.4200): Seed germination/root elongation toxicity test**, 1996.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Pollution Prevention and Toxics - ChemView**, 2019. Disponível em: <<https://chemview.epa.gov/chemview>>. Acesso em: ago 2019.

VRAL, A.; FENECH, M.; THIERENS, H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of *in vivo* ionising radiation exposure. **Mutagenesis**, v.26, p.11–17, 2011.

WALKER, C.H. *et al.* **Principles of Ecotoxicology**. Taylor; Francis, Bristol, PA, 1996.

WASHINGTON, H. G. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. **Water Research**, v.18, p.653-694, 1984.

WHO - World Health Organization. **IARC - International Agency for Research on Cancer**. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications>>. Acesso em: ago 2019.

WIKLUND, S.J.; AGURELL, E. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. **Mutagenesis**, v.18, p. 167-176, 2003.

ZHANG, J.; LIU, C.L. Riverine composition and estuarine geochemistry of particulate metals in China e weathering features, anthropogenic impact and chemical fluxes. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v.54, p.1051-1070, 2002.