

RESSALVA

Atendendo solicitação da
autora, o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 27/09/2021.

**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.

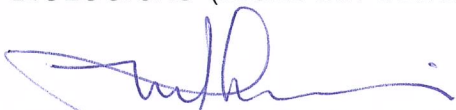
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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 (Igeo) 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 Cádmio (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.

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.