

---

**Ciências Biológicas**

---

**KEMELLYN CRISTINA PANCHERA**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE SEDIMENTO DE  
UMA ÁREA DE MINERAÇÃO DE OURO  
(PARACATU - MG)**

KEMELLYN CRISTINA PANCHERA

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE SEDIMENTO DE UMA ÁREA DE  
MINERAÇÃO DE OURO (PARACATU - MG)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales

Coorientador: Dra. Nádia Aline Corroqué

Rio Claro - SP  
2022

P188a	<p>Panchera, Kemellyn Cristina</p> <p>Avaliação toxicológica de sedimento de uma área de mineração de ouro (Paracatu - MG) / Kemellyn Cristina Panchera. -- Rio Claro, 2022</p> <p>59 f. : tabs., fotos</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro</p> <p>Orientadora: Maria Aparecida Marin-Morales</p> <p>Coorientadora: Nádía Aline Corroqué</p> <p>1. Citotoxicidade. 2. Genotoxicidade. 3. Mutagenicidade. 4. Sedimentos fluviais. 5. Allium cepa. I. Título.</p>
-------	--

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.

KEMELLYN CRISTINA PANCHERA

## AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE SEDIMENTO DE UMA ÁREA DE MINERAÇÃO DE OURO (PARACATU - MG)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales (orientadora)

Dra. Laís Roberta Deroldo Sommaggio

Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

Aprovado em: 13 de Janeiro de 2022

*Kemellyn G. Panchera*

Assinatura da discente



Maria Aparecida Marin Morales  
Assinatura da orientadora



Assinatura da coorientadora

Dedico aos meus pais, que sempre me apoiaram ao longo de toda a minha jornada, e à minha avó, Neusa, que trabalhou por muitos anos na cantina da faculdade que anos depois viria a se tornar a UNESP que conhecemos hoje e que é uma das mulheres mais fortes que eu conheço.

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus e Nossa Senhora Aparecida por terem me abençoado ao longo dessa jornada, por terem colocado pessoas maravilhosas no meu caminho e por terem me abençoado ao longo de toda essa jornada.

Aos meus pais, Marli e Junior, por serem os meus maiores incentivadores e por nunca desistirem de mim. Eu não tenho palavras para agradecer tudo que vocês já fizeram e ainda fazem por mim. Muito obrigada, pelos abraços e chás de camomila nos momentos de tensão e por vibrarem com cada nova conquista. Vocês me inspiram a sempre buscar ser a minha melhor versão e são as minhas maiores inspirações. Muito obrigada por tudo!

Ao meu namorado, Hugo, por sempre me apoiar e me lembrar da minha capacidade e por aguentar os meus dias ruins sempre com muita paciência. Obrigada por ser o meu porto seguro em meio ao caos e por me acalmar nos momentos de desespero.

À minha melhor amiga/companheira/dupla/irmã de coração, Giovanna, por ter trilhado o árduo, porém feliz, caminho da faculdade comigo. Só nós sabemos o que passamos ao longo desses cinco anos, todos os momentos bons, os ruins, os choros e as risadas. Você foi um presente que a UNESP me trouxe e eu tenho certeza que aquelas duas meninas que não sabiam chegar na portaria da faculdade na primeira semana de aula serão amigas para sempre.

À minha orientadora, Marin, por ter acreditado em mim desde o início e por ter me apresentado com esse projeto que eu amei desenvolver. Obrigada por toda a sua paciência e por todos esses anos de orientação e amizade, você é uma inspiração para mim.

À minha co-orientadora, amiga e agora colega de trabalho, Nádia, por ter me ensinado tudo que eu sei sobre o funcionamento de um laboratório e por ter me ajudado a trilhar esse caminho. Eu não poderia ter escolhido uma co-orientadora melhor, você não imagina o quanto eu aprendi e aprendo com você. Muito obrigada por toda a sua paciência e dedicação.

À Daniela, Giovanna e Mariana, por, junto comigo, formarem o quarteto de amizade que eu sempre pedi à Deus. A vida fica mais leve quando estou com vocês e eu não tenho palavras para expressar o que vocês significam pra mim. Obrigada por aguentarem os meus dramas e por estarem sempre por perto nos momentos em que eu mais precisei. Eu tenho muito orgulho de quem nós nos tornamos.

À toda a turma do curso de Ciências Biológicas – integral de 2017, em especial, Gabriel, Lívia e Murilo. Muito obrigada por terem trilhado esse caminho comigo e por todos os momentos (bons e ruins) que passamos juntos. Eu jamais vou esquecer das nossas reuniões

para levantar dinheiro para ir pro pantanal, dos muitos cafés que fizemos, da inesquecível Festa dos Solteiros e, é claro, da nossa tão sonhada viagem ao Pantanal em 2018.

À todos do Laboratório de Mutagênese Ambiental da UNESP de Rio Claro, por todo o apoio e ajuda que vocês me deram ao longo do desenvolvimento desse projeto. Jamais esquecerei as nossas tardes jogando vôlei, elas foram muito especiais para mim. Agradeço em especial, Ana, Jaque, Lê Gigeck, Lê Rocha, Lê Rosa, Laís, Mari, Mariah e Paulinha. Um agradecimento especial à Adriana, que sempre me ajudou em tudo que eu precisei e sempre foi a pessoa para quem eu corria quando algo não saía quando o esperado.

À toda equipe da ASR, em especial ao pessoal do Laboratório de Ecotoxicologia, por sempre serem muito compreensivos comigo e por me permitirem fazer horários flexíveis por conta da faculdade. Agradeço especialmente ao Cleiton, Daniela, Gabriel e Natália.

À UNESP e todos os meus professores por fazerem com que eu me apaixonasse cada dia mais pela biologia. Em cada aula eu sentia que eu não escolhi a biologia, mas que ela já havia me escolhido muito tempo atrás.

À FAPESP, pelo apoio financeiro através do processo nº 2019/15072-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), o que permitiu a realização desse trabalho.

À todos, que de alguma forma estiveram comigo ao longo desses cinco anos, o meu, mais sincero, muito obrigada!

*“Para mim, é impossível existir sem sonho. A vida na sua totalidade me ensinou como grande lição que é impossível assumi-la sem risco.”*

*(Paulo Freire)*

## RESUMO

O estado de Minas Gerais é o que recebe maior investimento do setor extrativista mineral, sendo o ouro um mineral de destaque nesse estado. Porém, apesar da alta relevância econômica, a mineração pode proporcionar consequências desastrosas e silenciosas para as cidades que as abrigam. Paracatu-MG abriga a maior mina de ouro a céu aberto do país, a Mina Morro do Ouro. No presente estudo, foram analisados os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico de amostras de sedimento (extratos solubilizado e lixiviado) de 4 diferentes rios da cidade de Paracatu, totalizando 7 pontos de coleta/análise. Os pontos P1, P2 e P3 foram coletados do Córrego Rico, que nasce dentro da mineradora, sendo que P1 foi coletado próximo à mineradora; P2, pouco antes do perímetro urbano de Paracatu e P3, no final do perímetro urbano. O ponto P4 foi coletado no Córrego Santo Antônio, por este ponto estar localizado logo após a bacia de rejeitos da mineradora. Seguindo o córrego Santo Antônio, foi coletado o ponto P5 no córrego Santa Rita, logo após o encontro do Córrego Santo Antônio com o Córrego Santa Rita. Seguindo o córrego Santa Rita, foi coletada uma amostra no Córrego São Pedro (P6), após o encontro destes dois rios. O último ponto (P7) foi coletado próximo à ETA (Estação de Tratamento de Água) da cidade de Paracatu, no Ribeirão Santa Izabel, antes da captação de água de abastecimento do município. Para o extrato solubilizado, os testes de citotoxicidade, mostraram que os pontos P1, P2, P3, P5, P6 e P7 apresentaram valores significativos, quando comparados com o controle negativo (CN). Os testes de genotoxicidade realizados com amostras do extrato solubilizado indicaram que os pontos P5 e P6 apresentaram valores significativos para esse parâmetro, enquanto que para os testes de mutagenicidade com células F1, nenhum dos pontos apresentou resultados significativos. Pelos dados dos ensaios do MN, realizados em células meristemáticas e F1 das raízes de *A. cepa*, é possível inferir que os MNs observados nas células meristemáticas não podem ser considerados como *endpoint* de mutagenicidade mas sim de genotoxicidade, pois não houve transferência dos danos para as células filhas. Além disso, os pontos P5 e P6, que se mostraram genotóxicos, indicam que há uma provável transferência de contaminação das áreas das barragens para outros locais, pela interação existente entre os rios da região. Quanto ao extrato lixiviado, os pontos, ao serem comparados com o controle da solução de extração não apresentaram resultados significativos para nenhum dos parâmetros avaliados. Esses dados alertam para possíveis riscos à saúde da população de Paracatu e para possíveis impactos ambientais, associados com as atividades de mineração.

**Palavras-Chave:** *Allium cepa*; mutagenicidade; genotoxicidade, citotoxicidade; solubilizado; lixiviado

## **ABSTRACT**

Minas Gerais state is the one that receives the biggest part of the invests from mineral extractive sector and gold is an ore that gets highlighted in this state. However, despite the economic relevance, mining can cause harmful and silent consequences for cities that contains mining companies. Paracatu – MG is the city that contains the biggest gold open mining of the country, the Morro de Ouro mine. In this study, cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials of solubilized and leached extracts samples of sediment from four different rivers from Paracatu were assessed, totalizing 7 points of collect/assessment. The points P1, P2 and P3 were collected from Rico stream, that is born inside the mining company, being that P1 was collected next to the mining company, P2, a bit before the urban perimeter of Paracatu and P3, at the end of the urban perimeter. The point P4 were collected from Santo Antônio stream, because this point is located right after the mining company's tailings pond. Following the Santo Antônio stream, the point P5 was collected from Santa Rita stream, right after the meeting of Santo Antônio e Santa Rita streams. Following the Santa Rita stream, a sample was collected from São Pedro stream (P6), right after the meeting of the two rivers. The last point (P7) was collected next to the water treatment station of the city, from Santa Izabel stream before the municipality's water supply. In relation to the solubilized extract, cytotoxic potential assessment showed that points P1, P2, P3, P5, P6 and P7 are statistically significant, when compared with negative control. The assessment of genotoxicity of solubilized extract indicated that points P5 and P6 presented significative values for this parameter, while the mutagenic test with F1 cells showed that any of the point was statistically significant. The Micronucleus assay showed that is possible to deduce that the micronuclei observed in meristematic cells must be considered genotoxicity endpoints and not mutagenicity endpoints, because there was no transfer of damage to the daughter cells. Moreover, the points P5 and P6, that showed a significative result for genotoxic potential, show that there is a likely transference of contamination from the dam areas to other places, through interaction between the local rivers. About the leached extract, when the points were compared with the extraction solution control, they did not show any statistically significant result for any of the assessed parameters. These results warn to potential damages to population health and environmental impacts causing by mining activities in Paracatu.

**Key-words:** *Allium cepa*; mutagenicity; genotoxicity; citototoxicity; solubilized extract; leached extract.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. A mineração no Brasil.....	11
1.2. Histórico e características da área de estudo.....	12
1.3. Legislação ambiental.....	13
1.4. Nutrição mineral e toxicidade em plantas.....	13
1.5. Características e toxicidade de metais.....	14
1.5.1. Alumínio (Al).....	14
1.5.2. Arsênio (As).....	15
1.5.3. Ferro (Fe).....	16
1.5.4. Manganês (Mn).....	17
1.6. Efeitos de íons tóxicos nas plantas.....	18
1.7. Avaliação ecotoxicológica.....	20
1.8. Extratos solubilizado e lixiviado.....	22
1.9. Bioindicador <i>Allium cepa</i> .....	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivos específicos.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Amostra testada.....	25
3.2. Material Biológico.....	27
3.3. Processamento do sedimento.....	27
3.4. Bioensaios com sementes de <i>A. cepa</i> .....	28
3.5. Análise estatística dos resultados.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. Análise química dos metais presentes nos sedimentos.....	29
4.2. Índice de germinação.....	30
4.3. Extrato solubilizado.....	31
4.3.1. Índice mitótico (IM).....	31
4.3.2. Genotoxicidade.....	34
4.3.3. Mutagenicidade.....	39
4.4. Extrato lixiviado.....	43
4.4.1. Índice mitótico (IM).....	43
4.4.2. Genotoxicidade.....	45
4.4.3. Mutagenicidade.....	48

5. CONCLUSÕES.....	49
6. REFERÊNCIAS.....	50

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. A mineração no Brasil**

A primeira descoberta de ouro no estado de Minas Gerais, na então cidade de Vila Rica, hoje Ouro Preto, data do final do século XVII (entre 1693 e 1695). Neste período, iniciou-se uma corrida pela obtenção desse minério, cuja exploração foi tão intensa que, nos primeiros 70 anos do século XVIII, o Brasil apresentou uma exploração aurífera equivalente à do resto da América, atingindo a marca de produção de 15 toneladas por ano. Essa ascensão da atividade mineradora provocou também mudanças sociais, pelo fato de pessoas de diversas localidades serem atraídas para as regiões em torno das jazidas. Como consequência dessa intensa exploração, ao final desse período, considerado como o apogeu da exploração de ouro, essa atividade entrou em decadência. Por esses relatos, nota-se que a importância da mineração no Brasil não é de hoje e, em decorrência desse processo, o Brasil vem ocupando, nos últimos anos, a posição de um dos maiores produtores e exportadores de metais e minérios do mundo, onde, aproximadamente, 85% do que é produzido no país nessa categoria é exportado. (FERNANDES; ARAÚJO, 2016; FIGUEIRÔA, 1994).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Mineração (IBRAM, 2020), o setor extrativista mineral representou, em 2018, 2,3% do PIB brasileiro. Esse setor foi ainda responsável por empregar diretamente 174 mil trabalhadores. Ainda de acordo com o IBRAM, em 2019, foram exportados 358 milhões de toneladas de bens minerais, sendo os principais deles o minério de ferro, o ouro, o ferronióbio, o cobre, a bauxita e o manganês. O estado de Minas Gerais é o que recebe mais investimentos do setor mineral (34%), sendo o de maior destaque na produção do ouro (IBRAM, 2020). O ouro, além de ser extremamente relevante para o setor joalheiro, também é muito importante para a produção de materiais eletrônicos, hospitalares e odontológicos, de peças automobilísticas e da construção civil (IBRAM, 2012).

Apesar da sua extrema importância econômica para o país, as atividades da mineração também trazem problemas tanto para o meio ambiente quanto para a saúde da população, o que pode ser comprovado pelas consequências danosas que a mineração causou em dois episódios marcantes e recentes da história do país: os desastres ocorridos, em 2015, na cidade de Mariana - MG (G1 MINAS GERAIS, 2015) e, em 2019, em Brumadinho - MG (G1 MINAS GERAIS, 2019).

A mineração pode ainda trazer consequências comprometedoras, mas muitas vezes silenciosas, por passarem despercebidas a curto prazo, mas que causam sérios problemas ao meio ambiente e à saúde humana, como o que vem acontecendo na cidade de Paracatu-MG.

De acordo com Farias (2002), os principais problemas ambientais causados pelas mineradoras podem ser divididos em 4 grupos distintos: poluição da água, poluição do ar, poluição sonora e subsidência de terreno. Adicionalmente, Farias (2002) ainda destaca que os rejeitos ricos em arsênio e o aumento da turbidez nos corpos hídricos são dois dos principais problemas relacionados com a extração de ouro no estado de Minas Gerais.

## **1.2. Histórico e características da área de estudo**

A cidade de Paracatu (latitude 17°13'20''S, longitude 46°52'29''W), que está localizada na região noroeste (NE) do estado de Minas Gerais, possui uma área de 8 mil e 300 quilômetros quadrados. De acordo com o último censo realizado pelo IBGE em 2010, a população estimada de Paracatu, para o ano de 2020, seria de 93 mil habitantes, sendo esse o dado mais recente, quanto à população do município (IBGE, 2017).

O nome Paracatu é de origem tupi e significa “rio bom”. A criação da cidade teve início no ano de 1744, após os bandeirantes comunicarem à coroa a existência das minas do vale de Paracatu. Porém, só em 20 de outubro de 1798 foi criada a Vila de Paracatu do Príncipe. Nessa época, a região já era habitada e a descoberta do ouro, que fluía pelos veios d'água da cidade, alavancou ainda mais o crescimento da vila que, em 1840, foi elevada a cidade (GONÇALVES, 2019).

Com o passar do tempo, o declínio produtivo do ouro aluvial levou a cidade à uma decadência econômica, que foi superada por atividades da agropecuária. Com a construção da capital em Brasília, a cidade de Paracatu teve um novo impulso, dada a sua localização próxima à BR 040, uma importante rodovia de acesso à nova capital federal do país (GONÇALVES, 2019). Atualmente, a mineração é ainda considerada a principal atividade da cidade, devido às reservas de ouro, calcário, zinco e chumbo que possui. Além disso, a agropecuária continua sendo também uma atividade muito importante para a cidade (PARACATU, 2019).

Fernandes e Araújo (2016) citam que no Brasil o ouro é extraído de um minério que é comumente associado à presença de arsênio, elemento este com alto potencial tóxico. O ouro associado com esse minério pode ser encontrado em Ouro Preto (Minas Gerais), Crixás (Goiás), Fazenda Brasileiro (Bahia) e Paracatu (Minas Gerais), mais especificamente na Mina Morro do Ouro.

A Mina Morro do Ouro é considerada a maior mina de ouro a céu aberto no Brasil. A região da mina é também rica em arsênio (As), elemento este que é encontrado na forma mineral de arsenopirita. Assim, o ouro da região está associado à arsenopirita, formando a

arsenopirita-ouro (BIDONE *et al.*, 2016). Apesar da Mina de Paracatu ser a maior mina de ouro do país, ela contém baixos teores desse metal, o que faz com que seja necessária uma grande extração do mineral arsenopirita, para a obtenção de uma quantidade significativa de ouro. Um exemplo disso foi a projeção de produção de ouro desta mina para 2020 de 0,39 g de ouro para cada tonelada de arsenopirita (SIMS, 2014). Essa extração é também preocupante, pois, de acordo com Kafruni (2015), para a retirada de 1 g de ouro, são liberados 7 kg de As para o ambiente, em diferentes estados de valência, dentre eles o trióxido de As, considerado o mais perigoso.

As atividades de extração em Paracatu, além da alta liberação de As, também intensificam a liberação de outros compostos para o ambiente, como o ferro, o que tem gerado preocupação das autoridades locais, com relação aos riscos iminentes à saúde da população (BIDONE *et al.*, 2016). Um fator agravante dos dados apresentados acima é a distância, considerada pequena (aproximadamente 250 metros), entre a mineradora e o perímetro urbano da cidade (LABOISSIÈRE, 2015). Os prejuízos causados aos moradores já motivaram a população a solicitar, em 2015, uma audiência pública (VIEIRA, 2015).

### **1.3. Legislação ambiental**

O CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) é um órgão nacional do Sistema Nacional do Meio Ambiente (SISNAMA), responsável por estabelecer critérios e padrões da qualidade do meio ambiente (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2021). A resolução CONAMA nº 454 (01 de novembro de 2012) estabelece parâmetros nacionais para a qualidade dos sedimentos em águas sob jurisdição nacional, dentre eles os limites para alguns metais e semimetais, como por exemplo o arsênio, que, de acordo com a sua concentração (mg/kg) no sedimento analisado, pode ser classificado como de Nível 1 ou Nível 2 (BRASIL, 2012). Além disso, essa mesma resolução, em seu Art. 12, estabelece que há a necessidade de desenvolver estudos ecotoxicológicos, quando as concentrações de arsênio, cádmio, chumbo ou mercúrio forem superiores ao Nível 1 e que, para quaisquer outras substâncias que a própria resolução traz (como, por exemplo, cobre, níquel e zinco), os ensaios toxicológicos devem ser realizados se a concentração destes for superior ao Nível 2, estabelecido pela própria resolução (BRASIL, 2012).

### **1.4. Nutrição mineral e toxicidade em plantas**

As plantas obtêm seus nutrientes do solo, apresentados, principalmente, na forma de íons inorgânicos. Alguns desses elementos são considerados essenciais para as plantas, pois a

ausência destes pode implicar em anormalidades no crescimento, no desenvolvimento, na reprodução ou ainda impedir que a planta complete o seu ciclo de vida. Dentre os elementos essenciais, temos os que são encontrados na água e no dióxido de carbono (considerados nutrientes não minerais), como os elementos hidrogênio, carbono e oxigênio (TAIZ *et al.*, 2017; KERBAUY, 2019). Já os elementos minerais essenciais podem ser divididos em dois grupos: os macronutrientes e os micronutrientes. Os macronutrientes são aqueles necessários em maiores quantidades para a planta, como, por exemplo, os elementos: nitrogênio, potássio, enxofre, fósforo, cálcio e magnésio. Já os micronutrientes, são aqueles exigidos em menores quantidades pela planta (exemplo: cloro, manganês, boro, zinco, ferro, níquel, cobre e molibidênio). Também é importante ressaltar que, além dos elementos essenciais, outros elementos como, por exemplo, o alumínio, o cobalto e o selênio podem se acumular em tecidos vegetais (TAIZ *et al.*, 2017; KERBAUY, 2019).

Ao relacionar a concentração de um nutriente no tecido de um dado vegetal com o seu crescimento e produtividade, é possível estabelecer uma zona tóxica para o elemento em questão, considerando o aumento na concentração do nutriente com o declínio do crescimento ou da produtividade. Além disso, a absorção celular de elementos como o arsênio, o alumínio e cádmio pode levar a consequências danosas para as plantas, implicando, por exemplo, no aumento da concentração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), na inibição do processo de fotossíntese, na desorganização da estrutura da membrana e da homeostase iônica, na inibição de reações enzimáticas e na ativação da morte celular programada. Essa toxicidade associada a esses elementos acontece devido ao fato destes poderem competir com os mesmos sítios de ação dos elementos essenciais e, assim, impedir reações essenciais para a sobrevivência celular (TAIZ *et al.*, 2017; KERBAUY, 2019).

## **1.5. Características e toxicidade de metais**

### **1.5.1. Alumínio (Al)**

O Al é um metal da família IIIA da tabela periódica, com número atômico igual a 13. Embora esse metal seja encontrado em abundância na litosfera (terceiro mais abundante da crosta terrestre), ele é de difícil extração. O Al é um elemento que ocorre normalmente nos aluminossilicatos (RUSSEL, 1994) e que pode estar presente em soluções aquosas, sob diferentes formas iônicas (KOCHIAN, 1995). Na natureza, ele é encontrado em sua forma trivalente ( $Al^{3+}$ ) (VERSTRAETEN *et al.*, 2008).

O Al pode entrar no organismo por ingestão ou por vias de exposição ambiental (poluição). Em humanos, ele pode causar alterações neurológicas e ser armazenado no

cérebro, fígado, sangue (PASCALICCHIO, 2002) e nos pulmões, quando inalado (LÉONARD; GERBER, 1988; ATSDR, 2008). Foi ainda observado que alguns trabalhadores, ao inalarem o elemento, apresentaram uma baixa performance do sistema nervoso (ATSDR, 2008). Quanto à exposição por via oral, alguns pesquisadores acreditam que o Al possa induzir Alzheimer, porém isso ainda não foi devidamente comprovado (Ferreira *et al*, 2008). Também vale ressaltar que pessoas que possuem alguma doença relacionada com o mal funcionamento dos rins têm uma maior dificuldade em eliminar o elemento pela urina e, conseqüentemente, maiores probabilidades de apresentarem complicações no sistema ósseo e no cérebro (ATSDR, 2008).

Já nos organismos vegetais, o Al pode interferir na divisão de meristemas radiculares, além de aumentar a rigidez da parede celular e interferir na replicação de DNA, devido ao aumento de rigidez na dupla hélice. Ainda de acordo com o autor, nas raízes, o principal sintoma da toxicidade do Al é a inibição do crescimento radicular. Já nas folhas, os sintomas estão relacionados com deficiência de fósforo, cálcio e, em alguns casos, de ferro (ROUT *et al.*,2001)

### 1.5.2. Arsênio (As)

O As é um elemento químico classificado como semimetal, que possui número atômico igual a 33. Esse elemento recebe essa classificação por apresentar características intermediárias entre metais e não-metais (RUSSELL, 1994). O As é amplamente distribuído na natureza e está comumente associado com metais como cobre, ouro e chumbo (OREMLAND; STOLZ, 2003). Esse elemento é classificado, de acordo com Ratnike (2002), como um dos metais mais tóxicos do ambiente natural. De acordo com o mesmo autor, a contaminação por As geralmente acontece por ingestão de água contaminada por processos geológicos naturais e não por processos de mineração, fundição e fontes agrícolas, como a utilização de pesticidas e fertilizantes. Para Tripathi *et al.* (1997), as principais formas de exposição ao As ocorrem por ingestão de água e alimentos contaminados e pelo ar. Contudo, para Barbosa (2013), esse elemento, que é tóxico para grande parte dos organismos, pode ser encontrado nos meios aquáticos, terrestres e até na atmosfera, sendo a mineração a principal atividade responsável pela sua liberação no ambiente.

O As pode ocorrer em diferentes estados de oxidação: arsenito ( $As_2O_3$ ; AsIII) e arsenato ( $As_2O_5$ ; AsV), e quando comparados, o arsenito é mais tóxico que o arsenato. O elemento pode ainda ocorrer na forma orgânica e inorgânica, sendo a forma inorgânica a mais tóxica. De acordo com Chung *et al.* (2014), o arsênio orgânico é considerado inócuo, por ser

fracamente absorvido pelas células, enquanto que o arsênio inorgânico é altamente reativo, podendo afetar diversas reações intracelulares.

A toxicidade do As está relacionada com a inativação de, aproximadamente, 200 enzimas que entram tanto em rotas energéticas da célula como na replicação e reparo do DNA. Além disso, ele também pode estar envolvido na produção de EROs, que podem causar peroxidação lipídica e danos ao DNA (RATNAIKE, 2003). A intoxicação por As pode também acontecer de forma aguda ou crônica, sendo que na exposição crônica (mesmo que em baixíssimas concentrações) podem ser detectados níveis desse elemento nos ossos, pele, cabelos e unhas (BARBOSA, 2013). O As pode ainda desencadear problemas cardiovasculares como hipertensão, aumentar as chances de diabetes mellitus e desenvolvimento de cânceres.

De acordo com a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) (2007), a exposição oral a baixas doses de As inorgânico pode levar à irritação estomacal e intestinal e à diminuição na produção das células vermelha e branca do sangue, tendo como consequências fadigas e ritmo cardíaco anormal. Quando a exposição oral ao As é contínua (em longo prazo), ele pode induzir desenvolvimento de neoplasias no fígado, bexiga, pulmão e também na pele, além de problemas de outras ordens no pulmão e no sistema nervoso. Ainda de acordo com a ATSDR (2007), o As inorgânico é reconhecido como carcinógeno para humanos pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) e pelo Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (DHHS). Já na forma orgânica, o As provoca diarreia, problemas nos rins e na bexiga de animais, mas ainda não existem informações sobre essas ações em humanos.

### **1.5.3. Ferro (Fe)**

O Fe é um metal de transição da família VIIIB da tabela periódica, de número atômico igual a 26. Ele é um elemento bastante abundante (aproximadamente 5% da crosta terrestre contém Fe) e de fácil extração, além de ser um metal extremamente utilizado pelo homem (RUSSEL, 1994).

Uma pessoa adulta do sexo masculino contém, aproximadamente, 4,5 gramas de Fe no seu corpo (FRAGA; OTEIZA, 2002). Embora esse elemento seja indispensável à vida de muitos organismos, por ser componente de diversas metaloproteínas e desempenhar um papel crucial em atividades bioquímicas vitais, é importante que ele seja mantido em equilíbrio nas suas quantidades.

Os mamíferos possuem numerosos sistemas que atuam de forma integrada para manter o equilíbrio de Fe no organismo, isto porque tanto a sua deficiência quanto o seu excesso são prejudiciais aos sistemas orgânicos. O excesso, apesar de ser menos frequente que a deficiência, está associado a doenças cardíacas e hepáticas, ao câncer, a doenças neurodegenerativas, diabetes, anormalidades hormonais e anormalidades do sistema imune (FRAGA; OTEIZA, 2002). Para Fraga e Oteiza (2002), a toxicidade desse elemento pode ser aguda ou crônica. A aguda é mais rara e está, geralmente, associada com hepatotoxicidade. Já a crônica pode estar associada com três diferentes fatores: heterocromatose primária (uma condição genética relacionada com o aumento da absorção de ferro no intestino); uma dieta associada com uma alta ingestão de Fe; e transfusões de sangue frequentes.

O Fe pode se tornar perigoso para o organismo, pois, quando em condições aeróbicas, o elemento pode atuar como catalisador na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). A toxicidade do Fe está associada com a reação de Fenton, na qual o elemento é utilizado para a produção do radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), a partir de superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2005).

O elemento Fe não é encontrado na lista de substâncias tóxicas das agências ATSDR, IARC e USEPA.

#### **1.5.4. Manganês (Mn)**

O Mn é classificado como metal de transição, com número atômico igual a 25. É caracterizado como um metal branco e brilhante, possuindo características tipicamente metálicas, usado como constituinte de ligas de aço (RUSSEL, 1994). O Mn é um elemento que ocorre naturalmente no ambiente, sendo o quinto metal e o 12º elemento mais abundante na crosta terrestre. Ele é encontrado, principalmente, nas formas de carbonatos, silicatos e óxidos. Esse elemento é necessário, principalmente, nas fases iniciais do desenvolvimento, mas também pode ser tóxico e atacar, principalmente, os pulmões e o sistema nervoso central (LIMA *et al.*, 2008).

O Mn é um elemento essencial tanto para animais quanto para plantas, porém, tanto a sua deficiência quanto o seu excesso podem ser prejudiciais. Em quantidades elevadas, ele pode causar neurotoxicidade, sendo que a intoxicação por esse elemento pode desencadear sintomas semelhantes aos da Doença de Parkinson (STREDRICK *et al.*, 2004).

De acordo com a ATSDR (2012), a principal via de entrada do Mn no corpo humano é pela ingestão alimentar. Porém, ele também pode entrar pelas vias aéreas (exposição à

poluição de Mn de origem industrial), pela ingestão de água contaminada com esse elemento ou ainda pelo contato com solo que contenha esse metal.

Apesar do Mn ser um elemento essencial e o seu consumo ser recomendado em pequenas doses, a alta exposição ao elemento pode trazer consequências danosas para o sistema nervoso, pulmões e sistema reprodutor masculino. Além dessas complicações, já foram observados problemas nos rins e no sistema urinário de ratos, associados com ingestão de altas quantidades de Mn (ATSDR, 2012).

Já em plantas, os sintomas causados pela toxicidade de Mn são variáveis. O sintoma típico apresentado por plantas de ambientes com alta concentração de Mn é a presença de pontos marrons nas suas folhas senescentes, circundados por zonas cloróticas. Também já foi observado em plantas, que o Mn pode promover o escurecimento das raízes (cor marrom), possivelmente pela ação da sua forma oxidada (EL-JAOUAL; COX, 1998). Mortley (1993) observou que essa coloração está relacionada com a intensidade da toxicidade, sendo que, quanto mais intensa é a cor, maior a severidade do efeito na planta, pois essas raízes tornam-se ineficientes para a absorção de água e nutrientes do solo (EL-JAOUAL; COX, 1998).

### **1.6. Efeitos de íons tóxicos sobre as plantas**

A geração de radicais livres é, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, realizado em decorrência de funções biológicas importantes para as células. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Assim, sua produção, em proporções adequadas, é perfeitamente gerenciada pelas células, mas, quando produzidos em excesso, podem induzir sérios danos oxidativos às células. O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais. (BARBOSA *et al.*, 2010).

O acúmulo de metais no ambiente, como o Al e o As, pode se caracterizar em um estresse abiótico para as plantas. Esse estresse pode levar a um desacoplamento funcional de rotas metabólicas do vegetal, resultando na formação de compostos intermediários que podem dar origem a compostos tóxicos para as plantas, dentre eles, as EROs (TAIZ *et al.*, 2017).

A ação tóxica dos metais sobre as células vegetais é facilitada porque esses compostos imitam alguns elementos essenciais para o desenvolvimento das plantas como, por exemplo, o cálcio e o magnésio, assumindo o lugar dos mesmos nas reações celulares que participam. Os metais tóxicos podem ainda interagir com diferentes enzimas, promovendo a inibição da ação delas, e com moléculas de oxigênio, formando as EROs (TAIZ *et al.*, 2017).

As EROs são formas altamente reativas do elemento oxigênio, que, por possuírem apenas um elétron não pareado em sua órbita mais externa, adquirem a capacidade de interagir com diversas macromoléculas celulares, como, por exemplo, as proteínas e o DNA. Essas interações podem desencadear efeitos celulares drásticos, dentre eles o processo apoptótico. Em plantas, pode-se destacar quatro EROs importantes neste contexto de reação: os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e os radicais hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) (TAIZ *et al.*, 2017).

Os vegetais possuem mecanismos de defesa contra as ações das EROs, sistemas esses usualmente subdivididos em enzimático (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e não-enzimático. As moléculas antioxidantes são compostos orgânicos de pequeno peso molecular e pequenos peptídeos que atuam neutralizando as EROs. As enzimas antioxidantes atuam nas células a partir de uma rede de reações que envolve a reciclagem das moléculas antioxidantes, estimulada pelos níveis de EROs presentes nas células. Porém, quando esses níveis atingem concentrações muito altas, a atuação das enzimas antioxidantes não é o suficiente para diminuir as quantidades dessas espécies reativas, decorrendo, assim, em um acúmulo de EROs nas células (BARBOSA *et al.*, 2010; TAIZ *et al.*, 2017).

Dentre as enzimas antioxidantes, podemos citar a superóxido dimutase, que oxida e reduz o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Já a ascorbato peroxidase, que está presente nos mesmos compartimentos celulares que a superóxido dismutase, catalisa a destruição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a partir da utilização de ácido ascórbico como agente redutor da reação. Assim como a ascorbato peroxidase, a catalase também age na destruição do peróxido de hidrogênio, porém essa reação acontece nos peroxissomos, resultando em duas moléculas de água e uma de oxigênio. Por fim, a última enzima antioxidante a ser citada é a glutathione peroxidase, que também atua sobre moléculas de peróxido de hidrogênio, a partir da utilização da glutathione reduzida como um agente redutor da reação (TAIZ *et al.*, 2017). Já os sistemas não enzimáticos são mediados por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética.

Além dos sistemas de defesas citados, as plantas possuem ainda outros mecanismos contra a presença de íons tóxicos como, por exemplo o As. Entre esses mecanismos podemos citar a capacidade da célula bloquear a entrada de íons, evitando, dessa forma, que as concentrações atinjam níveis tóxicos e ultrapassem a tolerância interna. Essas atividades são dadas por adaptações bioquímicas que permitem à planta tolerar, compartimentalizar e quelar esses íons potencialmente tóxicos para ela (TAIZ *et al.*, 2017).

O processo de quelação envolve a ligação de um íon com uma molécula quelante, mecanismo utilizado para diminuir a toxicidade potencial de certos íons. As fitoquelatinas são tios de baixo peso molecular e ligantes que atuam, por exemplo, na quelação do As. Quando é formado o complexo fitoquelatina-metal, este é transportado para o interior do vacúolo celular, onde fica armazenado (TAIZ *et al.*, 2017). O acúmulo de As nas plantas pode causar tanto a clorose quanto a necrose, sendo o arsenito ( $\text{AsO}_2$ ) e o arsenato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) as formas mais comumente envolvidas nestes processos. A absorção de As pelas plantas ocorre, principalmente, pela raiz, sendo que a absorção do arsenato ocorre pelos transportadores de fosfato, enquanto a absorção do arsenito por canais de aquaporinas. Ambas as formas de As são transportadas para as folhas via xilema (DE SOUSA, 2020).

O acúmulo de Al também pode desencadear consequências danosas para a planta. O acúmulo desse metal em solos com pH menores que 5 (ácidos) é um dos mais importantes problemas de toxicidades de metais. O Al pode ser encontrado em diversas formas no solo, o que dificulta a generalização dos seus efeitos sobre as plantas. Porém, estudos mostram que a inibição causada pelo Al sobre o crescimento da planta, é primeiramente observado no sistema radicular e, posteriormente, nas partes aéreas (ECHART; CAVALLI-MOLINA, 2001).

Outros efeitos do acúmulo protoplasmático de metais em plantas, são vistos para os íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ). Esse acúmulo pode interferir na fotofosforilação oxidativa da célula, com consequências negativas para a cadeia respiratória, assimilação de nitrogênio e síntese de proteína das plantas. Esses efeitos são decorrentes da inibição de enzimas envolvidas nesses processos. Além disso, altas concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  no solo podem ocasionar, também, a inibição da absorção de outros íons como, por exemplo,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (TRINDADE *et al.*, 2006).

### **1.7. Avaliação ecotoxicológica**

Como consequência do desenvolvimento populacional e tecnológico dos últimos anos, houve um grande desenvolvimento de tecnologias de extração de recursos naturais, o que acabou trazendo também consequências desastrosas para o meio ambiente. Essas novas tecnologias, que geralmente estão associadas ao aumento da poluição, estão modificando os ecossistemas, o que pode estar incorrendo em uma diminuição preocupante da diversidade biológica dos locais impactados. Sendo assim, estudos ecotoxicológicos podem se caracterizar com importantes ferramentas de diagnóstico dos possíveis impactos que essas atividades vêm promovendo nos ecossistemas (ZAGATTO, 2008).

O termo ecotoxicologia, proposto pela primeira vez em 1969 por Truhalt, é derivado da junção das palavras ecologia e toxicologia. Esse termo foi criado devido à preocupação do autor, quanto aos efeitos que compostos químicos presentes no ambiente possam desencadear nos organismos expostos, dentre eles o homem (DA SILVA, 2015). Embora o termo seja relativamente recente, a avaliação realizada nesta área vem desde a época de Aristóteles (384-322 a.C.), pois, naquela época já eram realizadas observações sobre as reações dos organismos vivos, frente aos diferentes tipos de estresse relacionados à qualidade dos ambientes (MAGALHÃES; FILHO, 2008).

A ecotoxicologia, uma área de estudo que se encontra em franco desenvolvimento no mundo, pode ser definida como a ciência que estuda os efeitos de substâncias químicas sobre os organismos vivos e as interações entre estes organismos com o seu habitat, cujas respostas podem ser agudas (quando os efeitos são observados em curto prazo) ou crônicas (quando os efeitos são observados em longo prazo) (MAGALHÃES; FILHO, 2008).

Embora as análises químicas sejam de alta relevância para a compreensão das características estruturais do cenário ambiental, elas não são suficientes para fornecer respostas sobre os impactos que os poluentes possam causar ao meio biológico. Assim, para uma avaliação consistente e amplamente informativa sobre a qualidade ambiental ou sobre os impactos gerados pela poluição, devem ser realizados, além das análises químicas, estudos ecotoxicológicos, desenvolvidos com organismos bioindicadores específicos para cada tipo de ação tóxica (DA SILVA *et al.*, 2015; MAGALHÃES; FILHO, 2008)

A avaliação ecotoxicológica realizada neste estudo é de extrema relevância como diagnóstico ambiental, visto que os resultados podem ser úteis para tomadas de decisão, em relação às políticas públicas ambientais da região, ou até do país como um todo. Avaliações realizadas nessa área de estudo permitem que sejam estimados os possíveis impactos das mais diversas fontes poluidoras como, por exemplo, efluentes agrícolas, domésticos, industriais dentre outros, tendo como prioridade a caracterização dos efeitos adversos de agentes poluidores sobre os organismos. (DA SILVA *et al.*, 2015; MAGALHÃES; FILHO, 2008)

Para a realização de testes de ecotoxicidade, geralmente são utilizados dois tipos de testes controles. O controle negativo, que é realizado com uma população igual à usada para testar o agente investigado, mas, neste caso, os espécimes são submetidos a uma substância inócua ao organismo testado (como, por exemplo, água de boa qualidade). Já o controle positivo também é realizado com uma população igual a usada para testar o agente de estudo, porém os espécimes são submetidos a um agente reconhecidamente tóxico. Esses controles servem, respectivamente, como resposta basal do organismo utilizado no teste e para certificar

se o organismo testado está respondendo, adequadamente, a um agente tóxico. (MAGALHÃES; FILHO, 2008).

Os ensaios ecotoxicológicos podem ser realizados para avaliação da qualidade dos mais diversos compartimentos ambientais. Dentre os estratos dos ambientes aquáticos, os sedimentos se destacam como um dos mais importantes para diagnóstico de poluição, pois essa malha ambiental retém e acumula os mais diversos contaminantes, derivados dos vários efluentes que chegam aos corpos hídricos, o que lhes confere um alto potencial como retro alimentadores de poluição da coluna d'água. Por essa sua característica, os sedimentos são considerados importantes compartimentos para se avaliar a poluição de ecossistemas aquáticos continentais (DA SILVA *et al.*, 2015). Ainda de acordo com Da Silva *et al.* (2015), os sedimentos são capazes de reter poluentes de efluentes industriais e urbanos lançados diretamente nos corpos d'águas, além de compostos usados na agricultura que são carregados aos rios, pelo escoamento de águas de chuvas. Os matérias que entram em contato com o ambiente aquático se associam aos sedimentos por processos de adsorção, complexação e reprecipitação, passando a fazer parte deste estrato (DA SILVA *et al.*, 2015). Assim, as avaliações toxicológicas dos sedimentos podem fornecer importantes informações sobre a toxicidade dos elementos presentes neste compartimento, e as possíveis retrocontaminações da coluna d'água, decorrentes de poluentes presentes nesses sedimentos.

Devido à elevada importância de realizações de análises toxicológicas com amostras ambientais, muitos estudos nesta área vêm sendo realizados tanto no Brasil como em todo mundo. Dentre esses estudos, muitos vêm sendo desenvolvidos a partir da análise de amostras de sedimento (BORRELY *et al.*, 2018; LINO *et al.*, 2020), de solo (CRUZ *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2019), de água (HARA; MARIN-MORALES, 2017; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; MANZANO *et al.*, 2015) ou ainda de combinações de duas ou mais amostras (CORROQUÉ, 2019; JARDIM *et al.*, 2008; REIS *et al.* 2019)

### **1.8. Extratos solubilizado e lixiviado**

O processo de extração de contaminantes, realizado por solubilização, permite a extração de componentes hidrossolúveis das amostras. Nesse processo, são extraídos de uma amostra sólida todos os compostos que podem ser biodisponibilizados para o meio aquático, portanto passíveis de recontaminar a coluna d'água. O processamento do material consiste, basicamente, na dissolução do material seco em água deionizada. A mistura resultante é agitada e depois deixada em repouso, por sete dias. Após esse período, o material é filtrado (ABNT, 1987b; SISSINO, 2002).

Outra forma de extração de contaminantes de uma amostra sólida é pelo processo de lixiviação. Lixiviação, de acordo com ABNT (1987a), é a determinação da capacidade de transferência de material orgânico e inorgânico de uma amostra de resíduo sólido, a partir da sua dissolução no meio extrator. Nesse processo, a extração dos possíveis componentes presentes na amostra é feita por meio da simulação de uma condição ácida, favorecendo a extração de alguns contaminantes (SISINNO, 2002), pela decomposição da matéria orgânica dessa amostra.

### **1.9. Bioindicador *Allium cepa***

As plantas superiores apresentam características que fazem delas ótimos modelos genéticos, para serem usados em avaliações de efeitos de poluentes ambientais, sendo a espécie *A. cepa* uma das mais utilizadas para este fim. Somada a essa sensibilidade reconhecida das plantas superiores, a espécie *A. cepa* apresenta ainda características que a destaca como um eficiente organismo teste para avaliação de compostos com potencialidade de induzir danos cromossômicos e distúrbios no ciclo celular (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Ainda de acordo com Leme e Marin-Morales (2009), as análises de aberrações cromossômicas (ACs) e de micronúcleos (MN) em células de meristemas radiculares, associada com análise de MN em células F1 da raiz, são reportadas na literatura como bons indicadores de ações diretas que estariam acontecendo no DNA do bioindicador. Estudos realizados por Leme e Marin-Morales (2008) mostraram que a junção de dados de indução de MN de células meristemáticas com os de células F1 permitiram uma interpretação mais confiável dos resultados obtidos nas análises realizadas com amostras de águas contaminadas com petróleo.

O bioindicador *A. cepa* apresenta características especiais, como grande tamanho e o número reduzido ( $2n = 16$ ) de seus cromossomos, características estas que facilitam a observação de efeitos de xenobiontes sobre os organismos. Além disso, a espécie é reconhecida pela sua alta sensibilidade à ação tóxica de químicos ambientais. Essas características fazem deste vegetal um excelente modelo para ser usado em avaliação de possíveis danos no material genético promovidos por xenobiontes (GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985, ALVIM *et al.*, 2011). Fiskesjö (1985) ressalta ainda que testes com *A. cepa* apresentam vantagens adicionais, por serem de baixo custo, serem ensaios reprodutíveis, de obtenção rápida e de resultados confiáveis e por terem alta correlação de resposta com outros sistemas biológicos. O autor ainda cita que as raízes desse bioindicador constituem um excelente sistema para análises de toxicidade (inibição do crescimento) e de mutagenicidade

(avaliação da taxa de quebras cromossômicas). Por essas características citadas, a espécie *A. cepa* é considerada um bioindicador de excelência para estudos ambientais.

Um dos parâmetros a ser analisado em células meristemáticas de *A. cepa* é o índice mitótico, que corresponde ao número de células em divisão. O índice mitótico pode sofrer alterações, em consequência dos efeitos de um determinado agente. A diminuição deste índice pode estar associada à potencialidade do agente promover alterações no crescimento e desenvolvimento do organismo exposto, enquanto que o seu aumento pode indicar a potencialidade de induzir divisão celular desordenada, o que pode levar, por exemplo, à formação de tecidos tumorais (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A região meristemática da espécie *A. cepa* também pode ser utilizada para testes de ACs, que são caracterizadas como alterações na estrutura ou no número cromossomos, que podem ocorrer tanto espontaneamente (não significativos, em relação ao teste controle) como pelo efeito de agentes físicos e/ou químicos (indução maior que as observadas em condições basais). Além disso, o teste de ACs permite inferir se o efeito da substância a ser analisada é clastogênico ou aneugênico. Os efeitos clastogênicos são dados por agentes cuja ação ocorre diretamente sobre o material genético, que podem ser estimados pela presença de aberrações como pontes e quebras cromossômicas. Já nos efeitos aneugênicos, os agentes acometem estruturas citoplasmáticas, como por exemplo as proteínas envolvidas com o aparelho mitótico, levando a aberrações como perdas e aderências cromossômicas (FERNANDES *et al*, 2007; 2009; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Além da utilização da região meristemática das raízes de *A. cepa*, para avaliar citogenotoxicidade de um determinado xenobionte, também pode ser realizado ensaio com as células da região F1 (região não-meristemática), para estimar os possíveis efeitos mutagênicos do agente. Neste caso, é realizada a análise de MN, cujos resultados podem aumentar a acurácia de análises de ACs observadas nas células meristemáticas e, assim, obter um melhor entendimento dos efeitos do agente sobre o organismo teste. Essa melhor acurácia, reside no fato de que tanto os fragmentos cromossômicos como os cromossomos inteiros perdidos durante a divisão celular, que foram observados nas células meristemáticas, persistiram, como MN nas células F1, mostrando a transmissão dos danos genéticos para as células descendentes, o que permite comprovar o efeito mutagênico do agente avaliado (FERNANDES *et al*, 2007; 2009; LEME; MARIN-MORALES, 2008, 2009).

É válido ressaltar que o teste de MN pode ser realizado tanto em células meristemáticas quanto em células F1 e ambos têm se mostrado sensíveis para detectar contaminantes ambientais com potencial mutagênico.

Tendo em vista o exposto acima, presente estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade de amostras de sedimentos de rios que recebem impactos das atividades de mineração (Mina Morro do Ouro) da cidade de Paracatu-MG. Foram realizados ensaios com o bioindicador *A. cepa*, por esse ser indicado e amplamente utilizado em análises de impactos ambientais (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SOMMAGGIO *et al.*, 2018 CARITÁ; MAZZEO; MARIN MORALES, 2019; SOUZA *et al.*, 2020).

## 2. OBJETIVOS

Analisar os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico de amostras de sedimento (extratos solubilizado e lixiviado), coletadas em diferentes corpos d'água do entorno da cidade de Paracatu – MG, por meio de ensaios realizados com o bioindicador *A. cepa*, em teste de germinação, de índice mitótico, de ACs e do MN.

### 2.1. Objetivos específicos

Parâmetros avaliados:

- Potencial citotóxico: pela análise da taxa de germinação das sementes e pelo índice mitótico de células de meristemas radiculares de *A. cepa*;
- Potencial genotóxico: pelo teste de ACs em células de meristemas radiculares de *A. cepa*;
- Potencial mutagênico: pelo ensaio do MN em células meristemáticas e células F1 de sistemas radiculares de *A. cepa*.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Amostra testada

Para a realização do presente estudo, foram utilizadas amostras de sedimento, coletadas em sete diferentes pontos de rios que estão sob a influência da mineradora de ouro da cidade de Paracatu – MG.

Os pontos de coleta abrangem diferentes regiões da cidade, incluindo pontos que se encontram dentro do perímetro urbano, conforme descritos abaixo:

- P1) Córrego Rico - A jusante da mineradora e a montante da confluência com o Córrego Espalha;
- P2) Córrego Rico – A jusante da junção com o Córrego Espalha e a montante do perímetro urbano da cidade de Paracatu;
- P3) Córrego Rico – Ao final do perímetro urbano de Paracatu;

P4) Córrego Santo Antônio – A jusante da barragem de rejeitos da mineradora Mina do Morro do Ouro (Paracatu);

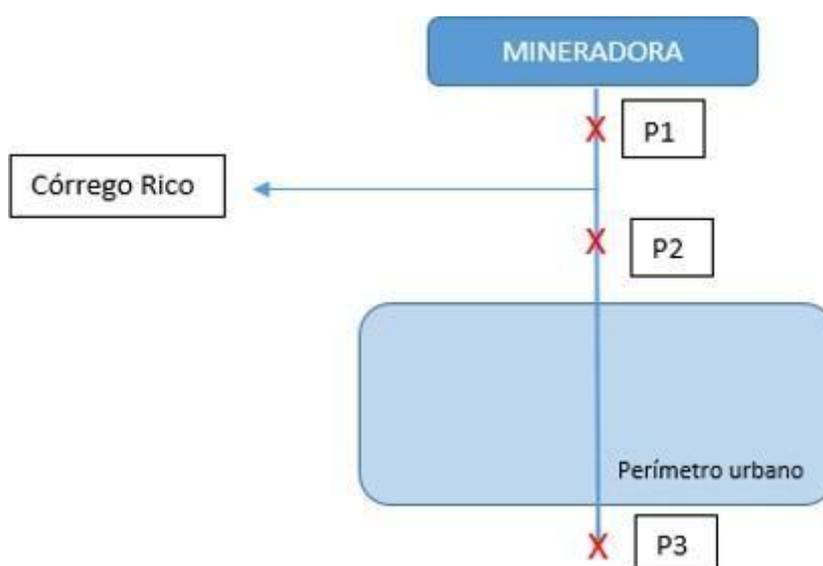
P5) Córrego Santa Rita – Pré confluência com o Córrego São Domingos;

P6) Córrego São Pedro – Após receber contribuições do Ribeirão Santa Rita e do Córrego Santo Antônio;

P7) Ribeirão Santa Isabel – Antes da captação da ETA da cidade de Paracatu (COPASA).

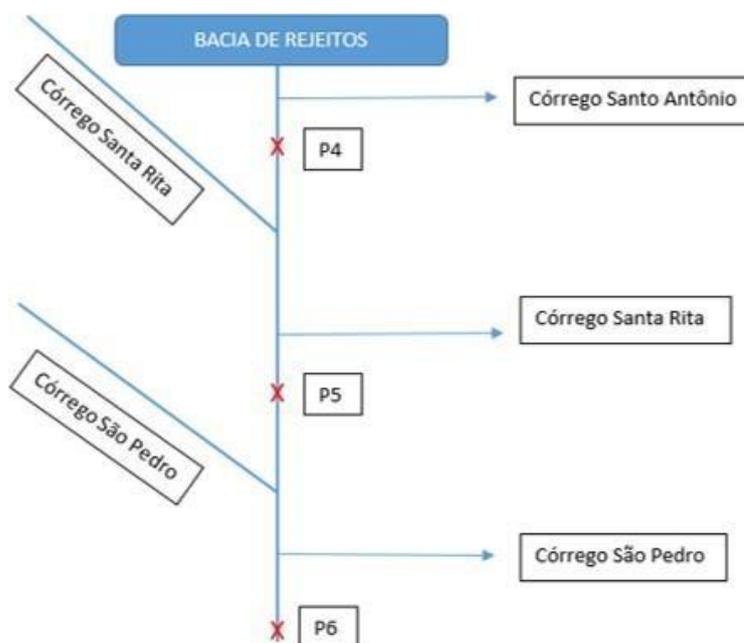
O Córrego Rico, onde foram coletadas amostras de sedimentos referentes aos três primeiros pontos de coleta, foi escolhido por possuir a sua nascente dentro da mineradora e por seu curso se estendendo por todo perímetro urbano da cidade. A amostra P1 foi coletada próximo à mineradora; P2, pouco antes do perímetro urbano de Paracatu e P3, no final do perímetro urbano da cidade (Figura 1).

**Figura 1:** Esquema dos três primeiros pontos de coleta (P1, P2 e P3).



A amostra P4 foi coletada no Córrego Santo Antônio, por este ponto estar localizado logo após a bacia de rejeitos da mineradora. Seguindo o córrego Santo Antônio, foi coletada outra amostra (P5) no córrego Santa Rita, logo após o encontro do Córrego Santo Antônio com o Córrego Santa Rita. Seguindo o córrego Santa Rita, foi coletada uma amostra no Córrego São Pedro (P6), após o encontro destes dois rios. (Figura 2). O último ponto (P7) foi coletado próximo à Estação de Tratamento de Água da cidade de Paracatu, no Ribeirão Santa Isabel, antes da captação de água de abastecimento do município.

**Figura 2:** Esquema dos locais de coleta dos pontos P4, P5 e P6.



### 3.2. Material Biológico

Para a realização dos bioensaios, foram utilizadas sementes de *A. cepa* da variedade baia periforme, variedade esta já padronizada para ensaios no laboratório de Mutagênese Ambiental (LMA) do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.

### 3.3. Processamento do sedimento

Para a realização dos ensaios a serem desenvolvidos com os sedimentos, foram preparados dois extratos com as amostras dos mesmos: extrato lixiviado, processado de acordo com a norma ABNT NBR 10005 (ABNT, 1987a), e extrato solubilizado, preparado de acordo com a norma ABNT NBR 10006 (ABNT, 1987b).

Seguindo as diretrizes da norma de obtenção do extrato lixiviado ABNT NBR 10005 (ABNT, 1987a), foi possível determinar a porcentagem de sólidos (acima de 0,5%) e a solução de extração a ser utilizada no processamento (solução de extração 1 – ácido acético e NaOH, pH  $4,93 \pm 0,05$ ). As amostras de sedimentos (filtradas em filtro de fibra de vidro de 1,6  $\mu\text{m}$ ) e a solução de extração foram colocadas em frascos de lixiviação, seguindo a proporção apresentada na equação 1.

Equação 1:

$$\text{Massa de solução de extração} = 20 \times \text{massa da fase sólida} \quad (1)$$

Os frascos contendo as amostras e a solução de extração foram mantidos em mesa agitadora (Marconi, MA 139), em velocidade 3 e temperatura ambiente ( $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), por 18 horas. Ao término desse período, as amostras foram novamente submetidas à filtração em filtro de fibra de vidro ( $1,6\text{ }\mu\text{m}$ ). Os extratos resultantes foram armazenados sob refrigeração, até sua utilização no processo de germinação das sementes.

O processamento das amostras, para a obtenção do extrato solubilizado, norma ABNT NBR 10006 (ABNT, 1987b), foi realizado a partir da dissolução de  $62,5\text{ g}$  de cada uma das amostras dos sedimentos coletadas nos rios descritos acima (peso seco) em  $250\text{ ml}$  de água ultrapura. Essas misturas foram agitadas por  $5\text{ minutos}$ . Em seguida, as amostras foram colocadas em béqueres, os quais foram mantidos em repouso em uma incubadora BOD ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), por  $7\text{ dias}$ . Após o término desse período, foi extraída a fase líquida, resultante do processo de decantação de cada um dos béqueres, que foi, posteriormente, filtrada em membrana de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ . Os extratos resultantes do processo de filtração foram mantidos refrigerados, até sua utilização no processo de germinação das sementes.

### **3.4. Bioensaios com sementes de *A. cepa***

Sementes de *A. cepa* foram dispostas em placa de Petri, previamente recobertas com papel filtro ( $100\text{ sementes}$  por placa) e umedecidas com  $5\text{ mL}$  dos extratos (solubilizado ou lixiviado) e com  $5\text{ mL}$  dos agentes controle. Os tratamentos controles foram realizados com água ultrapura, para controle negativo (CN), e com  $10\text{ mg/L}$  de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3), para controle positivo (CP). As exposições foram feitas em triplicata, para cada uma das sete diferentes amostras de lixiviado ou solubilizado dos sedimentos coletados e para os controles. No entanto, pelo fato dos extratos lixiviados puros terem impedido a germinação das sementes de *A. cepa*, foi necessário diluir esses extratos na proporção de  $1:5$  (extrato: água ultrapura – v/v, respectivamente), para que pudessem ser realizados os ensaios de crescimento radicular com as amostras coletadas.

As radículas foram coletadas com cerca de  $2,0\text{ cm}$  de comprimento e fixadas com solução de Carnoy (Álcool Etílico- Ácido Acético  $3:1$  – v/v), por aproximadamente  $6\text{ horas}$ , em temperatura ambiente. Após esse período, o fixador foi trocado por um novo fixador recém-preparado e o material armazenado a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até a utilização das raízes na confecção das lâminas. Para o preparo das lâminas, as raízes fixadas foram lavadas em  $3\text{ banhos}$  de água destilada, de  $5\text{ minutos}$  cada, e hidrolisadas em ácido clorídrico  $1\text{ N}$  a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por  $10\text{ minutos}$ .

A coloração dos meristemas foi feita pelo reativo de Schiff, por 2 horas, no escuro e a temperatura ambiente. Esse reativo é indicado para os ensaios de ACs e de MN, pela sua especificidade de reação com o material genético, o que permite um maior contraste dos cromossomos, em relação ao citoplasma e, conseqüentemente, uma melhor segurança na observação e interpretação dos danos cromossômicos induzidos pelos agentes avaliados.

Para a confecção e obtenção das lâminas permanentes, foi colocado um meristema radicular de *A. cepa* em uma lâmina limpa, contendo uma gota de carmim acético (2%). Foi seccionada a região meristemática do meristema, que foi recoberta com lamínula e, suavemente, esmagada. Esses mesmos procedimentos foram realizados com as células F1. As lâminas foram preparadas de forma que de um lado ficasse a região meristemática e do outro a sua correspondente região F1. Posteriormente, as lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética.

Para o extrato solubilizado, foram analisadas 6000 células meristemáticas por tratamento, sendo 500 células por lâmina, num total de 12 lâminas contadas para cada uma das análises. Foi observado o número de células em cada uma das diferentes fases do ciclo celular (interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase) e analisadas ACs como pontes, brotos, perdas cromossômicas, entre outras, que foram considerados como *endpoint* de genotoxicidade, e MN e quebras cromossômicas, considerados *endpoint* de mutagenicidade.

### **3.5. Análise estatística dos resultados**

Após a análise das lâminas de todos os tratamentos e grupos controle (CN e CP), os resultados obtidos foram submetidos a dois testes estatísticos preliminares: o teste de Shapiro-Wilk, com o intuito de testar a normalidade dos dados obtidos; e o teste de Levene, que tem como finalidade analisar a homogeneidade de suas variâncias. A partir dos resultados da análise estatística foi observado que os resultados dos testes de germinação, genotoxicidade e mutagenicidade (células meristemáticas e F1) não apresentavam distribuição normal, sendo então, aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Já para a análise do índice mitótico, os resultados apresentaram distribuição normal, sendo então, aplicado o teste paramétrico de análise de variância (ANOVA). Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de  $p < 0,05$  (GOTELI; ELLISON, 2011).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Análise química dos metais presentes nos sedimentos**

Os resultados das análises químicas realizadas por Corroqué (2019) com as amostras de sedimentos dos diferentes rios da região de Paracatu-MG estão apresentados de forma adaptada na tabela 1.

**Tabela1:** Resultados da análise química obtidos por Corroqué (2019) dos metais discutidos pelo presente projeto presentes nos sedimentos de rios, nos seus diferentes pontos de coleta, na fase de extração F1.

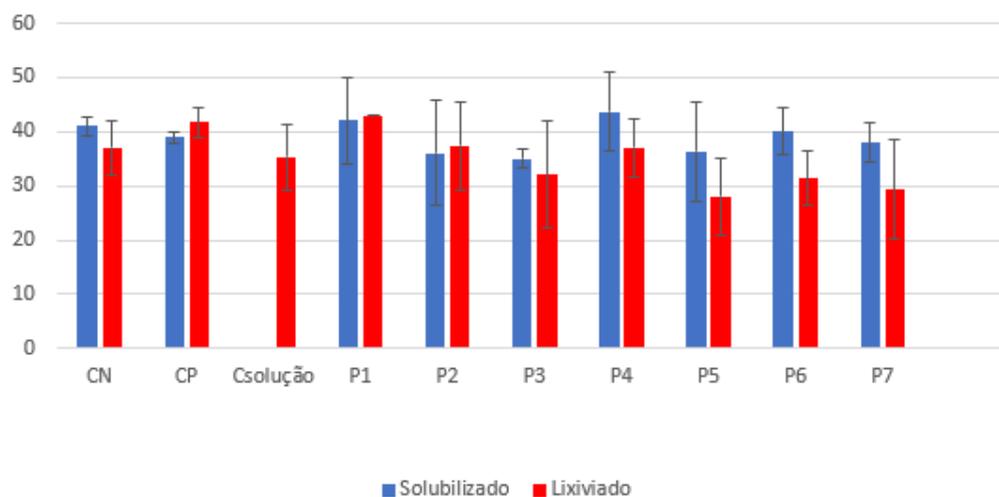
Pontos de coleta							
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
<b>Alumínio (Al)</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	24,40
<b>Arsênio (As)</b>	<LQ	<LQ	0,56	<LQ	<LQ	0,79	<LQ
<b>Ferro (Fe)</b>	3,66	2,15	3,74	7,32	2,67	16,05	68,41
<b>Manganês (Mn)</b>	11,45	14,26	18,39	15,05	51,74	104,82	93,90

Os valores estão expressos em mg/kg (média±desvio padrão). LQ = Limite de Quantificação. Adaptado de Corroqué (2019).

#### 4.2. Índice de Germinação

Os resultados dos ensaios realizados com os extratos das amostras dos sedimentos estudados mostraram que todos os tratamentos avaliados, inclusive os testes controle, apresentaram índice de germinação inferior a 45%, (Figura 3). Para que o teste de toxicidade, realizado pelo ensaio de germinação, seja validado, é necessário que a taxa de germinação do CN seja igual ou superior a 70%. Desta forma, devido ao baixo índice de germinação observado para o CN, foi inferido que este teste não se mostrou adequado para avaliar a toxicidade das amostras testadas. Nossos dados são corroborados pelos resultados de Gigeck (2018), onde a autora também não obteve índice adequado de germinação para o CN, nos ensaios realizados com o bioindicador *A. cepa* submetidos a ação de aminas biogênicas. Assim, pode-se inferir que esse teste não se caracterizou em um bom parâmetro de avaliação de toxicidade dos sedimentos estudados.

**Figura 3:** Índice de germinação observado em células meristemáticas de *A. cepa*, exposição das sementes aos extratos solubilizados e lixiviados de diferentes amostras de sedimento coletadas na região de influência da mineradora do Morro do Ouro, município de Paracatu – MG.



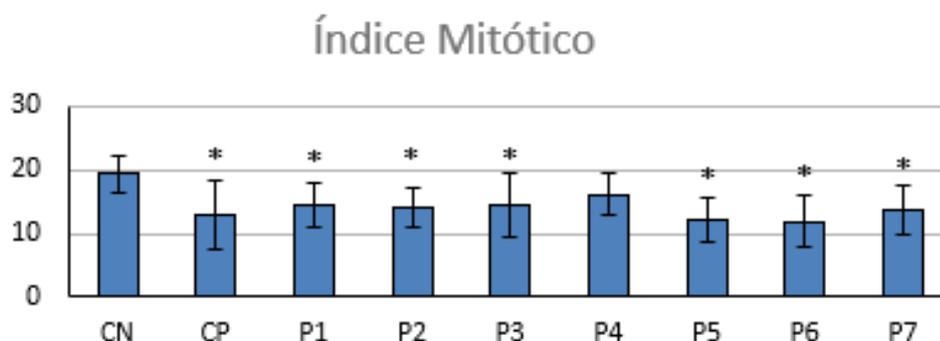
Valores Expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 10mg/L); Csolução = controle da solução de extração (solução de extração utilizada para a obtenção do lixiviado) P(1 a 7) = pontos de coleta; \*Valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao CN, de acordo com Kruskal-Wallis.

### 4.3. Extrato Solubilizado

#### 4.3.1. Índice Mitótico (IM)

O ensaio do Índice Mitótico (IM) se caracteriza como uma importante ferramenta para avaliação da citotoxicidade de um dado agente. Por esse teste, é possível estimar se uma determinada substância ou amostra ambiental é capaz de interferir na taxa de divisão celular do organismo exposto a ela. Por esse ensaio, foi possível observar que todas as amostras analisadas apresentaram, para o extrato solubilizado, IM inferiores ao do CN, sendo seis dos sete sedimentos estudados estatisticamente diferentes do CN. Os resultados comprovaram que os sedimentos induziram um efeito inibitório, significativo, sobre a divisão celular do bioindicador utilizado, com exceção do coletado no ponto 4 (Figura 4).

**Figura 4:** Índice Mitótico (IM) observado em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição das sementes aos extratos solubilizados de diferentes amostras de sedimento coletadas na região de influência da mineradora do Morro do Ouro, município de Paracatu – MG.



Valores Expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 10mg/L); P(1 a 7) = pontos de coleta; \*Valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao CN, de acordo com ANOVA.

Pela extração sequencial na Fase 1 (fração solúvel e trocável) - fase correspondente ao extrato solubilizado, realizada por Corroqué (2019) com sedimento dos mesmos pontos de coleta analisados no presente estudo (Tabela 1), os pontos P1, P2, P3 e P5 apresentaram valores significativos dos elementos Fe (3,66 mg/kg, 2,15 mg/kg, 3,74 mg/kg e 2,67 mg/kg respectivamente) e Mn (11,45 mg/kg, 14,26 mg/kg, 18,39 mg/kg e 51,74 mg/kg respectivamente). Além disso, o ponto P3 também apresentou valores significativos para o elemento As (0,56 mg/kg). O P6 foi o ponto que apresentou maior valor para os elementos As (0,79 mg/kg) e Mn (104,82mg/kg), além de apresentar também o elemento Fe (16,05 mg/kg). Nesse ponto foi também registrado o menor índice mitótico do presente estudo, sendo assim, pode-se inferir que a citotoxicidade observada está relacionada às concentrações dos elementos As, Mn e Fe. O ponto P7, apresentou o maior valor de Fe entre os pontos analisados (68,41 mg/kg). Esse ponto também apresentou valores significativos de Al (24,40 mg/kg) e Mn (93,90 mg/kg). Pelos resultados obtidos, pode-se inferir que os elementos químicos encontrados nas amostras dos sedimentos estudados podem estar atuando, sinergicamente, para a diminuição do índice mitótico, dados estes que reforçam as considerações de Enserink *et al.* (1991), quanto a importância de se considerar as ações conjuntas das substâncias em estudos ecotoxicológicos, uma vez que as substâncias químicas não se encontram isoladas na natureza.

Estudos *in vitro* realizados com linfócitos humanos por Lima *et al.* (2008), mostraram que o Mn, na forma  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (forma comumente encontradas do elemento), induziu diminuição do índice mitótico, sendo, portanto, citotóxico para essas células. Já em vegetais,

existem poucos registros sobre a citotoxicidades de sais de Mn. O Mn é um elemento essencial para a planta, por estar envolvido diretamente com a fotossíntese e com a ativação de diferentes sistemas enzimáticos (MUKHOPADHYAY; SHARMA, 1991). Os autores afirmam que a deficiência desse elemento pode induzir inibição do alongamento celular e diminuição do crescimento da planta, enquanto que o seu excesso reduz a captação de certos elementos e aumenta a de outros, alterando assim a fisiologia celular. A toxicidade do Mn é um dos importantes fatores limitantes do crescimento vegetal em solos ácidos. Já foi observado que o Mn pode estar relacionado com as limitações de crescimento da raiz de *Trifolium subterraneum* e danos citoplasmáticos e cromatínicos na espécie *A. cepa* (MUKHOPADHYAY; SHARMA, 1991).

Wu *et al.* (2010), ao realizarem ensaios com os organismos teste *A. cepa* e *Vicia faba*, observaram que o índice mitótico dessas plantas diminuía, conforme aumentava a concentração de As, resultados esses que corroboram os resultados do presente estudo e também reforçam a evidência de citotoxicidade desse elemento. Resultados semelhantes foram obtidos por Gupta *et al.* (2018), que observaram uma relação entre o aumento na concentração de As e a diminuição do comprimento de raízes de *A. cepa*.

O elemento Al, que é bastante conhecido pelos seus efeitos neurotóxicos (DO NASCIMENTO, 2013), também apresenta toxicidade para plantas. Alguns estudos têm mostrado que o Al induz a inibição do crescimento da raiz, sendo este o sintoma de toxicidade mais observado em plantas, o que resulta na redução e danos no sistema radicular, podendo conduzir à deficiência mineral e estresse hídrico (DEGENHARDT *et al.*, 1998; ECHART; CAVALLI-MOLINA, 2001). Para alguns autores, a principal causa da inibição do crescimento da raiz pelo Al é a inibição da mitose nas suas células do meristemáticas (MORIMURA *et al.*, 1978; ECHART; CAVALLI-MOLINA, 2001). Em solos ácidos, a solubilidade do Al aumenta, intensificando os problemas de desenvolvimento da planta (MIGUEL *et al.*, 2010). Estudos realizados por Yi *et al.* (2010) com células de raízes de *Vicia faba*, expostas a águas contaminadas com Al, também mostraram que esse elemento causou um decréscimo do índice mitótico e induziu a formação de células picnóticas, eventos esses considerados *endpoints* de citotoxicidade para planta.

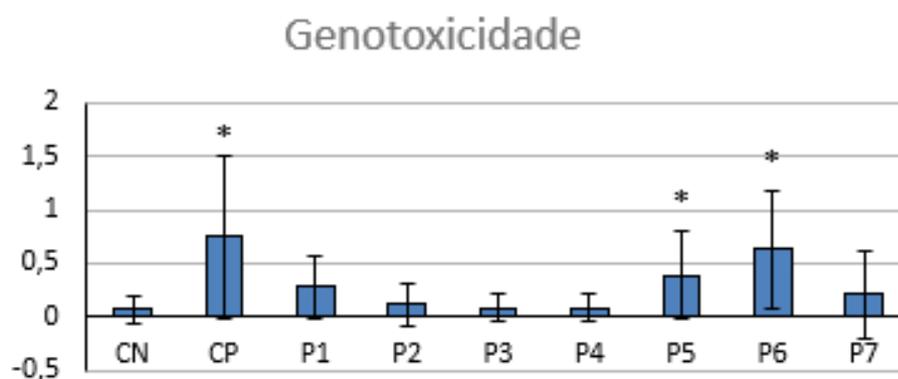
O Fe é um elemento essencial para as plantas, porém solos com pH baixo (ácidos) podem aumentar a disponibilidade desse elemento em sua forma  $Fe^{2+}$ , que é a forma absorvida pelas plantas, o que pode causar toxicidade aos organismos. Os sintomas de toxicidade por Fe podem incluir atrofia no desenvolvimento, entre outros. Pelos resultados observados, esse elemento também pode estar atuando na diminuição do índice mitótico,

observada nos ensaios realizados com os sedimentos coletados nos pontos descritos anteriormente.

#### 4.3.2. Genotoxicidade

Pelas análises de genotoxicidade (Figura 5), realizadas com amostras de sedimento coletadas, os pontos P5 e P6 apresentaram valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ), quando comparados com o CN.

**Figura 5:** Índice de genotoxicidade de células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição das sementes aos extratos solubilizados de diferentes amostras de sedimento, coletadas na região de influência da mineradora do Morro do Ouro, município de Paracatu – MG.



Valores Expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 10mg/L); P(1 a 7) = pontos de coleta; \*Valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao CN, de acordo com Kruskal-Wallis.

Conforme citado anteriormente, os resultados das extrações sequenciais na Fase 1 (fração solúvel e trocável), realizadas por Corroqué (2019), com os extratos solubilizados das amostras dos mesmos sedimentos desse projeto (Tabela 1), mostraram que o ponto P6 foi o que apresentou maior valor para os elementos químicos As (0,79 mg/kg) e Mn (104,82mg/kg), além da presença de Fe (16,05 mg/kg). Neste mesmo estudo citado acima, o ponto P5 apresentou níveis alterados somente para os elementos Fe (2,67 mg/kg) e Mn (51,74 mg/kg). A presença desses elementos nos sedimentos dos P4 e P6 infere um forte indício de que a contaminação observada seja proveniente das atividades da mineradora, que expõe ao ambiente metais presentes no próprio solo da região, uma vez que estes corpos d'água citados estão situados à jusante da barragem. Também pode-se inferir, pela presença de As no ponto 6 e os maiores índices de genotoxicidade deste ponto de coleta, que este elemento teve um efeito aditivo às toxicidades conferidas pelo Al e Fe. Os resultados

apresentados para genotoxicidade ainda sugerem que as frações solúveis disponíveis desses sedimentos apresentam potenciais de indução de danos genotóxicos para a biota local.

O Mn, apesar de ser essencial para a manutenção dos organismos, quando em altas concentrações, pode causar alteração no funcionamento dos pulmões e do sistema nervoso central dos organismos expostos. Além disso, o Mn apresenta potencial genotóxico, por interferir na integridade do DNA e na própria replicação dessa molécula (BECKMAN *et al.*, 1985). A genotoxicidade desse elemento também pode ser derivada da oxidação de dopamina, reação esta que leva à liberação descontrolada de radicais livres, ocasionando sintomas neurológicos semelhantes à Doença de Parkinson (LIMA *et al.*, 2011). Estudos realizados em ratos por Donaldson e Labella (1982) mostraram que o Mn (dependendo do seu estado oxidativo) pode estimular ou inibir a síntese de monoaminas, alterações estas que podem desencadear efeitos antioxidantes ou pró-oxidantes. Joardar e Sharma (1989) mostraram que o  $\text{MnSO}_4$  promove quebras significativas na fita de DNA, provavelmente pela ação do  $\text{Mn}^{2+}$  sobre os cromossomos. Os autores ainda citam que o aumento no número de aberrações cromossômicas está diretamente relacionado com o aumento da concentração de  $\text{KMnO}_4$ . Lima *et al.* (2008) observaram, por meio dos ensaios de ACs e do MN, que o  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (uma das formas mais encontradas do elemento) foi genotóxico para cultura celular de linfócitos humanos, quando estas foram expostas. durante a fase G2 do ciclo celular, a concentrações altas dessa molécula.

De acordo com Kesari *et al.* (2012), a exposição ao As provoca tanto danos à molécula do DNA como aos cromossomos. Os danos cromossômicos induzidos pela exposição ao As incluem deleções cromossômicas e aneuploidias, como já foi observado tanto em experimentos *in vitro* quanto em modelos animais. Além disso, também já foi observado que exposições a esse elemento podem levar à formação de MN e troca de cromátides-irmãs (JOARDAR; SHARMA, 1989; SCHOEN *et al.*, 2004). O estudo realizado por Rudel *et al.* (1996) ressalta que o elemento As possui potencial clastogênico e aneugênico, por induzir o aumento dos índices de troca de cromátides irmãs, ACs estruturais e numéricas e amplificação do DNA. O autor ainda cita que, quando foram comparados os efeitos do arsenato de sódio e do arsenito de sódio, o arsenato (estado de valência 5+) foi, aproximadamente, 10 vezes menos potente que o arsenito (estado de valência 3+) e ambos foram relacionados com o aparecimento de ACs em células de linfoma de rato.

Estudos realizados por Yi *et al.* (2010) mostraram que o Al causou aumento significativo na frequência de ACs em anáfase em raízes de *Vicia faba*. Os autores concluíram

que o Al é um agente citotóxico e genotóxico, de ação clastogênica para células de raízes de *Vicia faba*.

As EROs podem oxidar diferentes macromoléculas, entre elas lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. A oxidação dos ácidos nucleicos pode gerar diversas modificações nesta molécula, inclusive, eventos mutagênicos (ROLDÁN-ARJONA, 2009). A ação do As no organismo está principalmente envolvida com o aumento da formação de EROs e do aldeído malônico (MDA), sendo que esses dois produtos, quando em altas concentrações, podem interagir com o material genético nuclear, provocando modificações passíveis de induzir a morte celular (BARBOSA, 2013). O MDA é formado pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido usada para avaliar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos (BONNES; GUÉRIN, 1992, MAFRA *et al.*, 1999). Marnett (1998) afirma que o MDA é uma molécula mutagênica e carcinogênica, por interagir com as bases dos ácidos nucleicos, formando adutos de DNA. De acordo com esse autor, essa molécula já foi associada com o aparecimento de cânceres de tireoide e de bexiga em ratos. Yadav e Trivedi (2009) observaram um aumento significativo de ACs ao exporem o organismo *Channa punctata* a concentrações sub-letais de trióxido de arsênio ( $As_2O_3$ ). Os autores atribuíram esse aumento de ACs à geração de EROs e a inibição dos mecanismos de reparo do DNA, também decorrente da ação do As.

Assim como o As está envolvido com a geração de EROs, o Al e o Fe também podem gerar essas espécies reativas. Embora o Al tenha um potencial redox relativamente baixo, ele pode induzir danos oxidativos por vários mecanismos. Esse elemento pode se ligar a fosfolipídios cerebrais carregados negativamente que, por terem ácidos graxos poli insaturados na sua estrutura, são facilmente atacados por EROs (VERSTRAETEN *et al.*, 1997; YUAN *et al.*, 2012). O Al também pode estimular a peroxidação lipídica iniciada pelo ferro na reação de Fenton, que causa a produção de EROs e a formação de  $Fe^{3+}$ . O superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) é neutralizado pelo  $Al^{3+}$  para formar um complexo  $Al-O_2^{\cdot-}$ , que aumenta a capacidade oxidativa do  $O_2^{\cdot-}$  (EXLEY *et al.*, 2004; YUAN *et al.*, 2012). Yuan *et al.* (2012) afirmam, com base nos seus estudos realizados com ratos expostos a  $AlCl_3$ , que a sobrecarga de Al aumentou o estresse oxidativo (com alta produção de  $H_2O_2$ ) no hipocampo, diencéfalo, cerebelo e tronco encefálico em ratos neonatos.

O Fe é um micronutriente essencial para os sistemas biológicos, porém também problemático, pois gera radicais livres por inter conversão entre as formas ferrosa ( $Fe^{2+}$ ) e férrica ( $Fe^{3+}$ ). Embora o ferro seja um metal abundante, ele é amplamente insolúvel, por isso, quando biologicamente disponíveis, são acionados mecanismos celulares para

absorvê-lo, reciclá-lo e armazená-lo, o que minimiza a sua toxicidade (EID *et al.*, 2017). Contudo, em excesso, o ferro celular catalisa a geração de radicais livres que danificam proteínas, lipídios e DNA, incorrendo em danos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, enquanto que a sua deficiência prejudica a proliferação celular. Assim, o teor de ferro celular deve ser mantido dentro de uma faixa estreita, para evitar as consequências adversas ao sistema celular. (ANDERSONA *et al.*, 2012).

Os danos ao DNA podem estar diretamente envolvidos com o aparecimento de ACs e MN (FENECH, 2000). Também é sabido que perdas cromossômicas e segregação incorreta de cromossomos são eventos relacionados tanto ao envelhecimento (RUSSEL *et al.*, 2007), quanto ao câncer (DUIJF *et al.*, 2013).

Um agente aneugênico é aquele que interage com elementos citoplasmáticos, como, por exemplo, o fuso mitótico, interferindo na divisão celular, resultando em alterações como perda de cromossomos inteiros (aneuploidias), poliploidizações e aderências cromossômicas (FERNANDES, *et al.*, 2007; 2009). Já os agentes clastogênicos são aqueles cuja ação se dá diretamente sobre o material genético, o que pode resultar em fragmentação cromossômica (FENECH, 2000, FERNANDES, *et al.* 2009).

Foram encontradas nas análises citogenéticas, realizadas com os extratos solubilizados obtidos das amostras de sedimentos coletadas, oito tipos de ACs (broto celular, célula binucleada, aderência cromossômica, perda cromossômica, poliploidia, ponte cromossômica, quebra cromossômica e MN) (Figura 6), sendo 6 delas também encontradas nas análises realizadas com os extratos lixiviados (Figura 11). Nesta análise não foram encontradas aderência cromossômica e célula poliploide. Além disso, dentre essas oito alterações, as mais observadas foram: broto nuclear, célula binucleada e MN. Das oito aberrações encontradas, cinco delas são derivadas de efeito aneugênico (broto celular, célula binucleada, aderência cromossômica, perda cromossômica e poliploidia), duas de clastogênico (pontes e quebras cromossômicas) e, por fim, os MN, que podem ser decorrentes tanto de efeito clastogênico como de aneugênico (FERNANDES *et al.*, 2007; 2009; LEME; MARIN-MORALES, 2009). O potencial predominantemente aneugênico observados nos resultados das analisadas realizadas no presente estudo corrobora as citações de Corroqué (2019). A autora também observou ação aneugênica para as mesmas amostras de sedimento bruto usadas para preparar os extratos do presente estudo. As ACs e as Anormalidades Nucleares (ANs) observadas tanto para o extrato solubilizado quanto para o lixiviado estão apresentadas na Figura 12.

Poliploidias, de acordo com Fiskejo (1985) e Fernandes *et al.* (2007; 2009), são alterações derivadas da inativação dos fusos mitóticos, devido a ação aneugênica de um agente. As aderências cromossômicas já são alterações provenientes de modificações na matriz protéica da célula e não diretamente no material genético, portanto também derivadas de ação aneugênica do agente indutor. As aderências cromossômicas dificilmente são revertidas, o que pode levar a célula à morte (FERNANDES *et al.*, 2009).

Na Figura 6, é possível observar a alta quantidade de brotos nucleares e MN em P1. A formação desses brotos é um indicativo de material genético excedente, que pode ser decorrente de alterações no fuso mitótico, que impediram a migração correta dos cromossomos para os polos da célula e decorreram em poliploidização ou aneuploidias (ELHAJOUJI *et al.*, 1998). O material excedente, quando eliminado do núcleo celular, aparece no citoplasma sob a forma de MN (FERNANDES *et al.*, 2007, 2009). Esse material excedente, que pode dar origem aos brotos e, posteriormente, aos MN, também pode dar origem à minicélulas, quando esses MN formados são eliminados da célula. As minicélulas são constituídas de uma pequena porção citoplasmática portadora de um material genético reduzido (FERNANDES *et al.*, 2007).

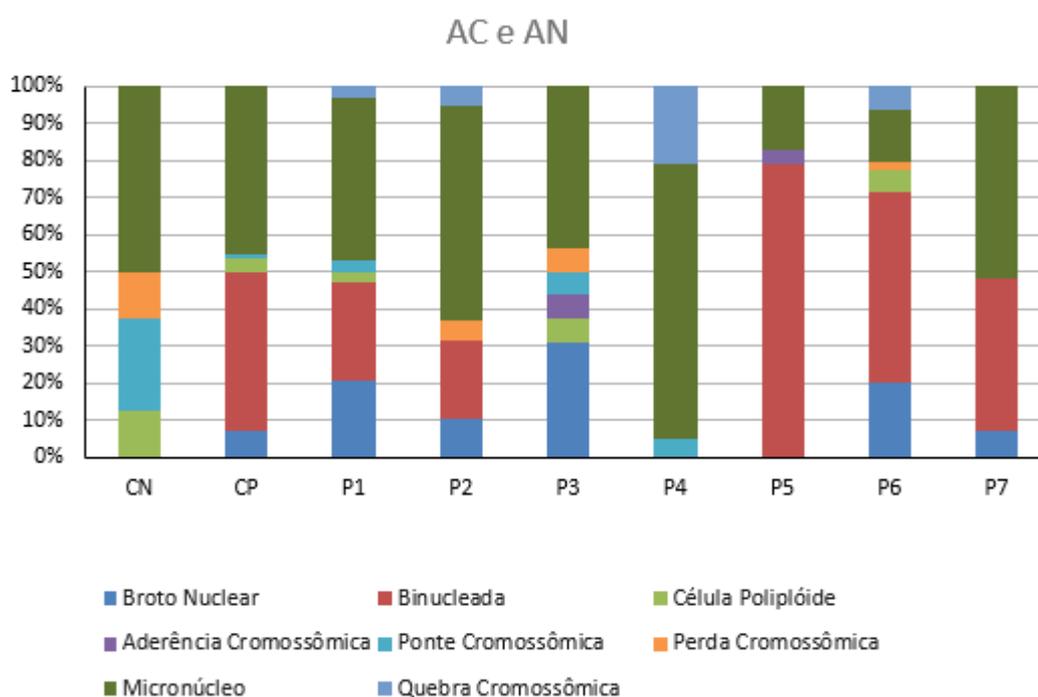
Neste estudo também foram observadas células binucleadas em P1, P2, P5, P6 e P7. Essa alteração pode estar associada com a não formação do fragmoplasto (estrutura formada durante a citocinese no final do processo de divisão celular), que serve como ancoragem de elementos para a formação da nova parede celular. Esse é um processo complexo que envolve microtúbulos, microfilamentos, complexo de Golgi e retículo endoplasmático (ALBERTS *et al.*, 2017). Nossos resultados são coincidentes com os estudos de Chakraborty *et al.* (2009), onde os autores afirmam que sais dos metais cádmio (Cd), Al, chumbo (Pb), cobre (Cu) e zinco (Zn) podem atuar sobre o citoesqueleto da célula, podendo levar à formação de células binucleadas (CHAKRABORTY *et al.*, 2009). No presente estudo foram registradas altas concentrações de Al, mas também outros metais como As e Fe. Desta forma, podemos inferir que, pelo menos, o Al presente nas amostras estudadas pode estar relacionado com a indução das células binucleadas observadas.

A presença de MN, de acordo com Fernandes *et al.* (2007), pode estar relacionada com os altos índices de brotos nucleares. No presente estudo, também foram observadas altas frequências tanto de MN como de brotos nucleares, confirmando então essa relação entre essas duas alterações celulares. Os MN podem ser originados de ação clastogênica, quando decorrentes de quebras cromossômicas durante a divisão celular. Neste caso, esses MN apresentam-se de menor tamanho (FERNANDES *et al.*, 2007), quando se considera um

bioindicador com cariótipo homogêneo, como é o caso de *A. cepa*. Já os de efeito aneugênico, como os dados pela inativação do fuso mitótico, decorrem em perda de cromossomos inteiros. Esse MN pode se apresentar de maior tamanho (FERNANDES *et al.* acima citado), considerando a mesma característica cariotípica citada acima.

Além dessas origens citadas acima para os MN, estas estruturas também podem ser derivadas de outros processos, como o de poliploidização. Neste caso, são acionados mecanismos de reparo da célula, que atuam para eliminar o material genético excedente, sob a forma de MN, na tentativa de reestabelecer a ploidia normal da célula (ELHAJOUJI *et al.*, 1998; FERNANDES *et al.*, 2007; 2009).

**Figura 6:** Aberrações Cromossômicas (AC) e Anormalidades Nucleares (AN) observadas em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição das sementes aos extratos solubilizados de diferentes amostras de sedimentos, coletadas na região de influência da mineradora do Morro do Ouro, município de Paracatu – MG.



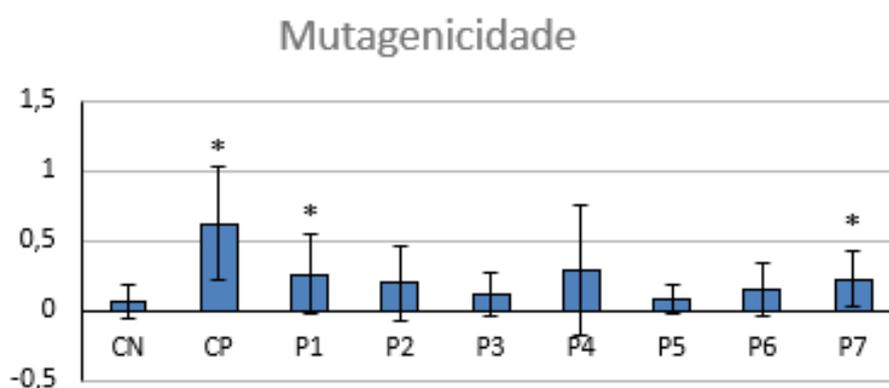
Valores Expressos em Porcentagem  $\pm$  Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 10mg/L); P(1 a 7) = pontos de coleta; \*Valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao CN, de acordo com Kruskal-Wallis.

#### 4.3.3. Mutagenicidade

Foram observadas frequências significativas de MN ( $p < 0,05$ ) nos ensaios realizados com células meristemáticas expostas ao extrato solubilizado das amostras de sedimento coletadas nos pontos P1 e P7 (Figura 7). De acordo com Fernandes *et al.* (2007), a presença

desses MN pode estar relacionada com a presença de brotos nucleares, alterações estas também muito frequentes nas análises realizadas com os solubilizados dos P1 e P7 (Figura 6). MN podem ser originados tanto de ação clastogênica, que promovem quebras cromossômicas durante a divisão celular, quanto aneugênica, devido a inativação do fuso mitótico, o que leva a perda de cromossomos inteiros (FERNANDES *et al.*, 2007).

**Figura 7:** Índice de mutagenicidade observado em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição das sementes aos extratos solubilizados de diferentes amostras de sedimentos, coletadas na região de influência da mineradora do Morro do Ouro, município de Paracatu – MG.



Valores Expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 10mg/L); P(1 a 7) = pontos de coleta; \*Valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao CN, de acordo com Kruskal-Wallis.

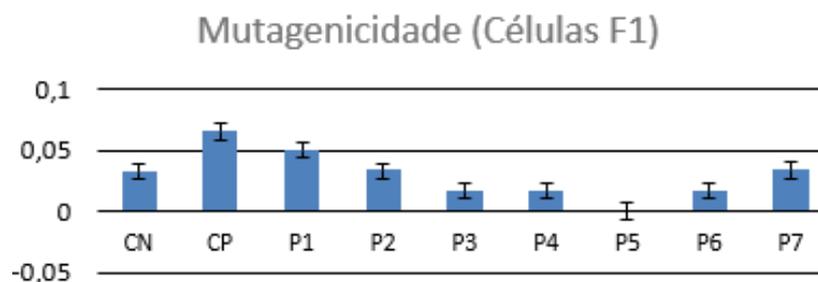
O valor significativo observado para o ponto P1 mostra que os sedimentos do Córrego Rico possuem potencial mutagênico, o que confere um risco tanto à biota local como à população, pois esse rio atravessa todo o perímetro urbano da cidade. Os sedimentos do ponto P7 (Ribeirão Santa Isabel), que é de um corpo d'água utilizado para a captação de água de abastecimento público, também apresentou potencial mutagênico, o que alerta para um possível risco à saúde da população local.

A extração sequencial da Fase 1 (fração solúvel e trocável), que é a fase correspondente ao extrato solubilizado, realizada por Corroqué (2019) com sedimento dos mesmos pontos de coleta utilizados nesse projeto, mostra que o ponto P7 foi o que apresentou os maiores valores para os elementos químicos Al (24,40 mg/kg) e Fe (68,41 mg/kg), além da presença de Mn (93,90 mg/kg). Já o ponto P1 apresentou somente níveis de Fe (3,66 mg/kg) e Mn (11,45 mg/kg) nessa fração solúvel.

De acordo com Yi *et al.* (2010), diversos estudos mostraram que o Al pode estar relacionado com a formação de MN. Ensaios realizados com *Vicia faba* exposta ao  $AlCl_3$ , por esses autores, mostram um aumento no número de MN para os grupos tratados em pH 4.5 em relação aos de pH 5.8. Migliore *et al.* (1999) também observaram um número estatisticamente significativo de MN em linfócitos humanos expostos ao  $Al_2(SO_4)_3$ , que, de acordo com os autores, reforça o potencial do Al induzir alterações citogenéticas.

O Fe é um elemento essencial à vida, por estar envolvido no transporte de  $O_2/CO_2$ , e atuar como cofator em várias reações celulares. Tanto a falta quanto o seu excesso desse metal pode ser prejudicial aos organismos. Quando em excesso, o Fe pode induzir a liberação de radicais livres e induzir peroxidação lipídica, que pode causar danos às membranas plasmáticas (DUNKES *et al.*, 1999; TOYOKUNI, 2009) e, conseqüentemente, morte celular. O ferro é uma molécula que pode ainda interagir com o DNA. De acordo com Halliwell e Gutteridge (1992), íons de metais de transição, como o  $Fe^{2+}$ , são os principais mediadores do dano oxidativo. Dunkel *et al.*, (1999) afirmam que o Fe (dependendo da forma em que ele se encontra) pode atuar como precursor da síntese de  $OH\bullet$ , na chamada reação de Fenton. Já Toyokuni (2009; 2016) aponta o Fe como um agente carcinogênico, pela sua possibilidade de liberar EROs (como é o caso do  $OH\bullet$ ), que podem aumentar os riscos de câncer. Também é colocado por Eaton e Qian (2002), que o excesso de Fe no organismo pode afetar órgãos como fígado, coração e células beta pancreáticas. Além disso, os autores alertam que a sobrecarga desse elemento pode provocar danos no DNA, porém, não se sabe ao certo quais são os produtos da interação DNA-Ferro-oxidantes.

**Figura 8:** Índice de mutagenicidade, observado em células F1 de *A. cepa*, após exposição das sementes aos extratos solubilizados de diferentes amostras de sedimento coletadas na região de influência da mineradora do Morro do Ouro, município de Paracatu – MG.



Valores Expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 10mg/L); P(1 a 7) = pontos de coleta; \*Valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao CN, de acordo com Kruskal-Wallis.

Pelas análises da mutagenicidade das amostras dos sedimentos coletados em rios sob influência da mineradora, realizadas com células da região F1 do organismo teste *A. cepa*, nenhum dos pontos analisados apresentou valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), quando comparados com o CN (Figura 8). Os dados referentes à presença de MN em células da região F1, tanto para o extrato solubilizado, quanto para o lixiviado estão apresentadas em fotos na Figura 14.

As análises realizadas com células da região F1 da raiz de *A. cepa* são reconhecidas como um eficiente método de avaliação de danos mutagênicos. MN observados nessas células podem ser resultado de um reparo incompleto ou de uma ausência de reparo dos danos observados nas células meristemáticas (LEME; MARIN-MORALES, 2007).

Os resultados observados no presente estudo, para MN de células meristemáticas radiculares e de células F1 das raízes de *A. cepa*, indicam que os danos ocorridos nas células meristemáticas não foram transferidos para as células F1. Desta forma, os MN das meristemáticas não podem ser considerados como *endpoint* de mutagenicidade, pois não se trata de uma alteração que foi repassada para as células filhas. Neste caso, esses MN devem ser considerados como *endpoint* de genotoxicidade. Contudo, pelos resultados obtidos para células meristemáticas, não se pode descartar e nem negligenciar o potencial genotóxico das amostras avaliadas, uma vez que estes apontam para a indução de danos no material genético, que deve servir como um alerta, principalmente, em relação à saúde humana, uma vez que existe uma alta correlação entre os efeitos registrados para o organismo-teste *A. cepa* e os mamíferos.

#### 4.4. Extrato Lixiviado

##### 4.4.1. Índice Mitótico (IM)

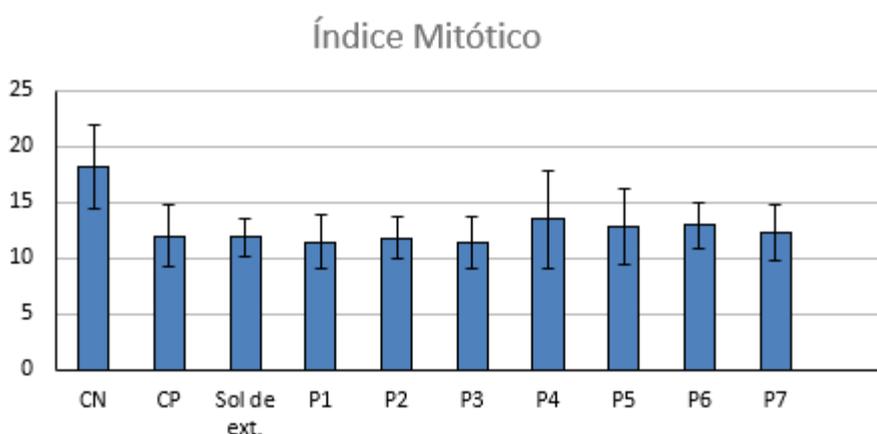
Na análise do índice mitótico, nenhum dos sete pontos analisados apresentou valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o controle da solução de extração, como é possível observar na figura 9.

É válido ressaltar que optou-se por comparar com o controle da solução de extração para minimizar os efeitos causados pelo próprio solvente, garantindo que o resultado obtido seja resultante das amostras e não do solvente utilizado.

Ao serem estatisticamente comparados com o CN todos os pontos, além de CP e o controle da solução de extração, se apresentaram como significativos ( $p < 0,05$ ).

Também é válido ressaltar que foi conduzido um teste preliminar de germinação utilizando os extratos lixiviados, de cada um de seus respectivos pontos, em seu formato puro, ou seja, sem diluição e, como resultado desse teste preliminar, a germinação das sementes praticamente não ocorreu. Sendo assim, para obter uma melhor germinação radicular, optou-se por utilizar esses extratos em uma diluição na proporção de 1:5 (extrato: água ultrapura – v/v, respectivamente), já indicando a ação citotóxica desses extratos.

**Figura 9:** Índice Mitótico (IM) observado em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição das sementes aos extratos lixiviados de diferentes amostras de sedimentos coletados na região de influência da mineradora do Morro do Ouro, município de Paracatu – MG.



Valores Expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 10mg/L); Sol de ext. = solução de extração; P(1 a 7) = pontos de coleta; \*Valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação a Sol de ext., de acordo com ANOVA.

As análises estatísticas apontaram que a diminuição no índice mitótico, observada para os sete pontos, ocorreu devido à ação da solução de extração utilizada na preparação do extrato. De acordo com a norma ABNT NBR 10005 (Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos), duas soluções de extração podem ser utilizadas para a realização do procedimento: 1. com pH  $4,93 \pm 0,05$ ; 2. com pH  $2,88 \pm 0,05$ .

Para a preparação de ambas às soluções, foi utilizado o ácido acético glacial. O ácido acético é um ácido orgânico alifático de baixo peso molecular, cuja presença durante a germinação de plantas pode apresentar efeito tóxico, passível de ser observado pela diminuição da germinação e do crescimento radicular, nos casos mais brandos, ou ainda, em uma menor absorção de nutriente em casos mais severos (KOPP *et al.*, 2015).

A presença de ácidos orgânicos voláteis, entre eles o ácido acético, na cultura de algumas espécies como o arroz, por exemplo, pode ocasionar uma diminuição na absorção de alguns nutrientes essenciais para a planta como, por exemplo, o potássio (K), o fósforo (P), o magnésio (Mg), entre outros. Ademais, a ação tóxica desses ácidos depende do pH. Em condições mais ácidas, ou seja, com pH mais baixo, ocorre um aumento da forma não dissociada desses elementos, aumentando a sua lipossolubilidade, o que, por sua vez, ocasiona o aumento da sua permeabilidade nos componentes lipídicos das membranas vegetais (CAMARGO *et al.*, 2001).

A mudança nas condições de pH do solo pode, não somente, influenciar na disponibilidade de alguns elementos essenciais, como também aumentar a disponibilidade de elementos com possível potencial fitotóxico. Essas reações acontecem devido ao aumento da concentração de íons  $H^+$ , em detrimento da concentração de  $OH^-$ , e o aumento na concentração desses íons ocasiona a diminuição da absorção de K, principalmente em condições nas quais o cálcio (Ca), está ausente. Em solos ácidos, alguns micronutrientes considerados essenciais para as plantas se tornam mais disponíveis em sua forma de espécie solúvel. Entre esses micronutrientes está o Fe, que é um dos elementos identificados nas análises químicas das amostras utilizadas. (CORROQUÉ, 2019; KEARBAUY, 2019).

Esse aumento na concentração de íons  $H^+$  e, conseqüentemente, a diminuição do pH no solo afetam também o tamanho das raízes, sendo que esse crescimento geralmente é favorecido em condições nas quais o pH encontra-se entre 5,5 e 6,5 (TAIZ *et al.*, 2017).

A espécie *A. cepa* é sensível ao fator pH, sendo que a sua faixa ideal de desenvolvimento está entre 6,0 e 6,5 (CIRILO *et al.*, 2019; FARIA, 2007), tanto que para o cultivo da espécie em solos ácidos, é indicado o uso do método de calagem, para neutralizar

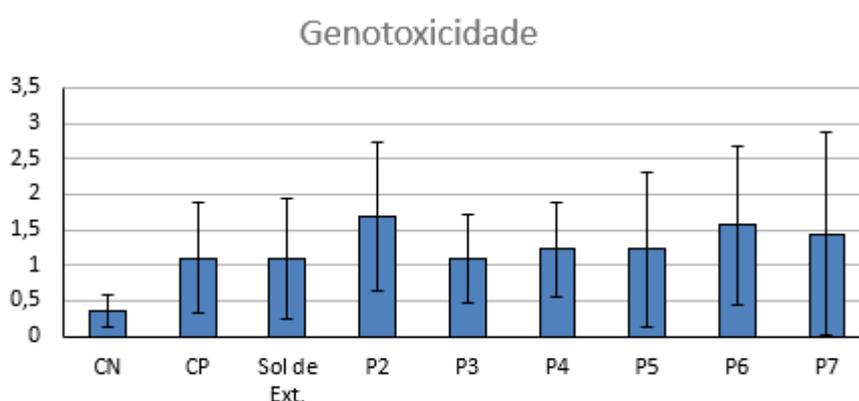
o alumínio trocável e aumentar a disponibilidade de elementos como o cálcio, o fósforo, o manganês e o molibdênio, que são essenciais para o desenvolvimento da planta (CIRILO *et al.*, 2019; FARIA, 2007).

Frente a todo exposto, pode-se inferir que tanto a presença do ácido acético quanto a diminuição do pH das soluções, interferiram no crescimento das raízes, diminuindo o seu índice mitótico, como observado pela Figura 9.

#### 4.4.2. Genotoxicidade

Quanto à avaliação da genotoxicidade das amostras (Figura 10) nenhum dos sete pontos analisados apresentaram resultados estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ), quando comparados com o controle da solução de extração. Já quando os mesmos pontos foram comparados com o controle negativo, todos os sete pontos apresentaram resultados estatisticamente significativos, igualmente ao que ocorreu na avaliação de citotoxicidade discutida anteriormente.

**Figura 10:** Índice de Genotoxicidade, observado em células meristemáticas de *A. cepa*, após a exposição das sementes aos extratos lixiviados de diferentes amostras de sedimento coletadas na região de influência da mineradora do Morro do Ouro, município de Paracatu – MG.



Valores Expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 10mg/L); Sol de ext. = solução de extração; P(1 a 7) = pontos de coleta; \*Valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação a sol de ext., de acordo com Kruskal-Wallis.

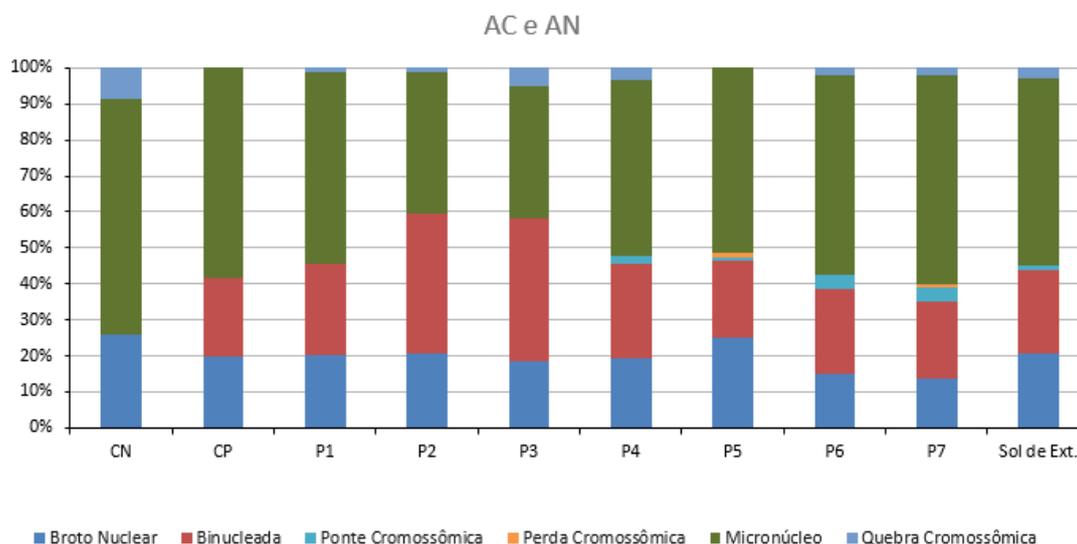
As seis ACs e ANs observadas nas células meristemáticas, expostas ao extrato lixiviado, foram: broto nuclear, célula binucleada, ponte cromossômica, perda cromossômica, MN e quebra cromossômica (Figura 11, 12). Todas as seis alterações foram também encontradas no extrato solubilizado (Figura 6).

As quebras são classificadas como ACs que, de maneira geral, são caracterizadas como alteração na estrutura dos cromossomos, o que pode acontecer de maneira natural ou devido à exposição à agentes físicos ou químicos. A presença de quebras cromossômicas é um indicativo de ação clastogênica de um dado agente (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Além disso, as quebras podem ser originadas de outras ACs, como as pontes cromossômicas, que podem se romper, gerando fragmentos acêntricos (LEME; MARIN-MORALES, 2008).

No presente estudo, também foram observadas pontes cromossômicas (Figura 6), alterações consideradas como precursoras de efeitos clastogênicos. Levan (1945) também observou pontes cromossômicas em células anafásicas de raízes de *A. cepa* expostas aos elementos Al, cromo (Cr), Fe, cobalto (Co), Cu, As, ouro (Au) e mercúrio (Hg). De acordo com esse autor, essas alterações podem ser decorrentes de aderências cromossômicas, afirmação esta corroborada por Fernandes *et al.* (2009), que citam que as pontes cromossômicas observadas nos seus estudos com o herbicida Trifluralina estavam relacionadas com aderências cromossômicas.

As perdas cromossômicas são classificadas como resultantes de efeito aneugênico, e são, de maneira geral, decorrentes de inativação do fuso mitótico durante a divisão celular. Contudo, de acordo com Luzhna, *et al.* (2013), os MN portadores de cromátides ou cromossomos inteiros são formados devido a (a) hipometilação de sequências centroméricas ou paracentroméricas de satélite; (b) defeito no cinetócoro; (c) fuso disfuncional; (d) mutação nos genes de *checkpoint* da anáfase. Além disso, também é provável que a presença de MN seja decorrente da incapacidade celular de reincorporar o material genético nuclear perdido (cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos) durante o processo de divisão. Como já foi citado anteriormente, os MN provenientes de perdas cromossômicas tendem a apresentar um tamanho maior que aqueles provenientes de quebras cromossômicas por apresentarem conteúdos diferente de DNA (LEME; MARIN-MORALES, 2008, 2009).

**Figura 11:** Aberrações Cromossômicas (AC) e Anormalidades Nucleares (AN) observadas em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição das sementes aos extratos lixiviados de diferentes amostras de sedimento coletadas na região de influência da mineradora do Morro do Ouro, município de Paracatu – MG

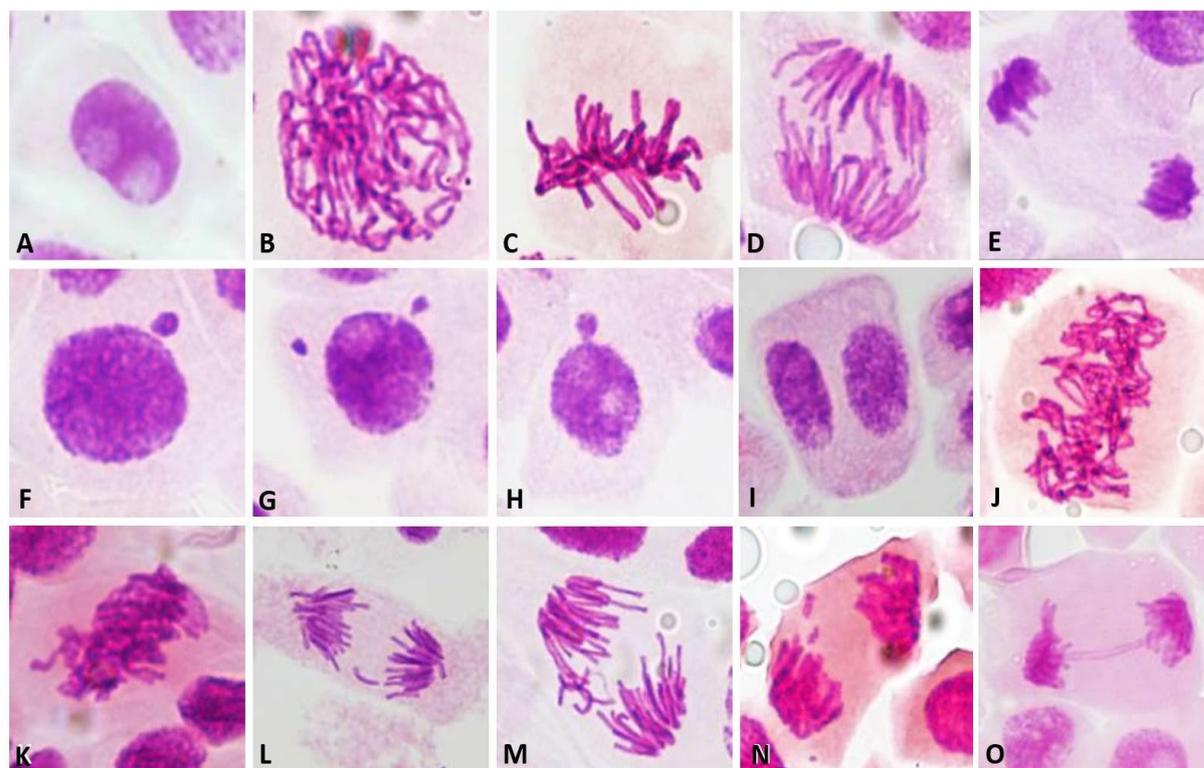


Valores Expressos em Porcentagem  $\pm$  Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 10mg/L); Sol de ext. = solução de extração; P(1 a 7) = pontos de coleta; \*Valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao CN, de acordo com Kruskal-Wallis.

Conforme pode ser observado nas Figuras 6 e 11, as alterações mais presentes nas análises de genotoxicidade, realizadas com os dois extratos, foram MN, célula binucleada e broto nuclear, tendo essa respectiva ordem de importância.

Com essa semelhança de respostas entre os dois tipos de extratos avaliados, é possível inferir que, mesmo considerando que a análise estatística tenha indicado que os resultados dos ensaios desenvolvidos com o extrato lixiviado possam estar mais relacionados à solução de extração e não necessariamente à amostra em si, os resultados observados para os extratos solubilizados comprovam os efeitos genotóxicos das amostras de sedimentos avaliadas.

**Figura 12:** Efeitos genotóxicos observados em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição das sementes em amostras de sedimento solubilizado e lixiviado de rios do entorno das atividades de uma mineradora de ouro de Paracatu – MG.



A: Intérfase normal; B: Prófase normal; C: Metáfase normal; D: Anáfase normal; E: Telófase normal; F: MN em intérfase; G: 2 MN em intérfase; H: Broto em intérfase; I: Célula binucleada; J: Metáfase poliploide; K: Metáfase poliploide com aderência cromossômica; L: Quebra cromossômica em anáfase; M: Perda cromossômica em anáfase; N: Quebras cromossômicas em telófase; O: Ponte em telófase.

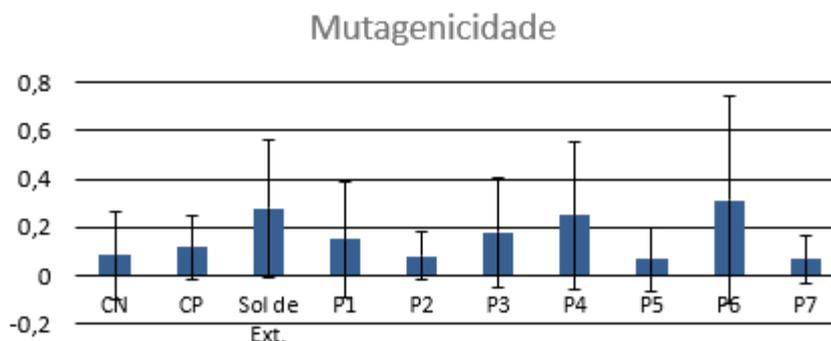
#### 4.4.3. Mutagenicidade

Assim como para o extrato solubilizado, foi também realizado ensaio de mutagenicidade para o extrato lixiviado, por meio de testes com células da região F1. Os resultados dos ensaios com os lixiviados também não demonstraram mutagenicidade para os sedimentos avaliados. Esses resultados permitem inferir que as alterações observadas na região meristemática da radícula foram reparadas pelo próprio sistema do organismo, ou levaram a célula à morte, não mantendo, assim, essas alterações na região F1. Esses resultados observados tanto para extrato solubilizado como lixiviado reforçam que os MN e quebras cromossômicas observados na região meristemática são, na verdade, resultado de efeito genotóxico e não mutagênico dos sedimentos.

Para as análises do índice de mutagenicidade, nenhum dos sete pontos apresentou resultado estatisticamente significativo, quando comparado com o controle da solução de

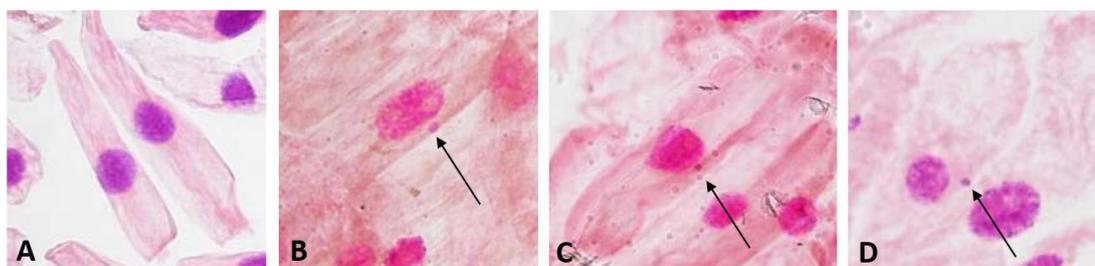
extração e com o controle negativo (figura 13). Os poucos MN observados em células da região F1, tanto para o extrato solubilizado, quanto para o lixiviado estão apresentadas em fotos na Figura 14.

**Figura 13:** Índice de mutagenicidade, observado em células F1 de *A. cepa*, após a exposição das sementes aos extratos lixiviados de diferentes amostras de sedimento coletadas na região de influência da mineradora do Morro do Ouro, município de Paracatu – MG.



Valores Expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão. CN = controle negativo (água ultrapura); CP = controle positivo (MMS 10mg/L); Sol de ext. = solução de extração; P(1 a 7) = pontos de coleta; \*Valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação a sol de ext., de acordo com Kruskal-Wallis.

**Figura 14:** MN observados em células da região F1 de *A. cepa*, após exposição das sementes em amostras de sedimentos solubilizados e lixiviados de rios do entorno das atividades de uma mineradora de ouro de Paracatu – MG.



A: Célula da região F1 normal; B-D: Célula da região F1 com Micronúcleo (MN).

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com o bioindicador *A. cepa* exposto aos extratos solubilizados, são bastante preocupantes, pois as amostras de sedimentos estudadas mostraram, de maneira geral, que o ambiente está contaminado com metais que têm ação deletéria sobre os organismos.

Pelos resultados obtidos, pode-se inferir que o organismo teste utilizado foi sensível aos efeitos dos contaminantes presentes nos sedimentos de rios que estão sob a influência da Minerador Morro do ouro – Paracatu-MG, podendo assim ser considerado um eficiente bioindicador para esse tipo de avaliação.

Os sedimentos dos pontos P5 e P6 mostraram potencial genotóxico. Apesar desses rios não estarem diretamente relacionados ao município de Paracatu, eles podem estar envolvidos com uma provável transferência de contaminação das áreas das barragens para outros locais, devido à interação existente entre os rios da região.

O ponto P7 (Ribeirão Santa Isabel), que corresponde ao ponto de captação de água para abastecimento do município de Paracatu-MG, apresentou potencial genotóxico significativo, o traz uma preocupação muito grande sobre os possíveis comprometimentos que essa genotoxicidade passa causar à saúde da população de Paracatu.

Apesar análises estatísticas mostrarem que os resultados de genotoxicidade obtidos para o extrato lixiviado serem, aparentemente, consequentes da solução de extração utilizada, os resultados dos ensaios com os extratos solubilizados mostram que o ambiente contém agentes, principalmente metálicos, que podem estar provocando as alterações observadas. Além disso, o processo de lixiviação natural tende a aumentar ainda mais a biodisponibilidade desses metais, o que pode acarretar em consequências ainda mais danosas do que aquelas observadas no presente estudo.

Apesar dos resultados não significativos, obtidos nos ensaios realizados com a região F1 das raízes de *A. cepa*, para nenhum dos extratos observados, as alterações observadas para as células meristemáticas podem alertar sobre possíveis riscos ambientais e à saúde pública, decorrente da contaminação provocada pelas atividades de extração de ouro da cidade de Paracatu-MG.

Os resultados obtidos pelo presente estudo também indicam que, ao contrário da interpretação mais amplamente adotada, a presença de micronúcleos em células da região meristemática de *A. cepa* é, seguramente, um indicativo de dano genotóxico, mas não de mutagenicidade. A mutagenicidade, por sua vez, pode ser comprovada por ensaios realizados células da região F1 das raízes deste bioindicador.

## 6. BIBLIOGRAFIA

ABERNATHY, C. O.; THOMAS, D. J.; CALDERON, R. L. Health effects and risk assessment of arsenic. **The Journal of nutrition**, v. 133, p. 1536S-1538S, 2003.

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 1987a. **Lixiviação de Resíduos - Procedimento –NBR 10.005**. Rio de Janeiro: ABNT
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas),1987b. **Solubilização de Resíduos – Procedimento– NBR 10.006**. Rio de Janeiro: ABNT.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; MORGAN, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSON, J.; HUNT, T. **Biologia Celular da Célula**. 6a Edição. – Porto Alegre, Artmed, 2017.
- ALVIM, L. B.; KUMMROW, F.; BEIJO, L. A.; LIMA, C. A. A.; BARBOSA, S. Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. **Revista Ambiente & Água**, v. 6, n. 2, p. 255-265, 2011.
- ANDERSON, C. P.; SHEN, M.; EISENSTEIN, R. S.; LEIBOLD, E. A. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1823, 1468–1483. 2012.
- 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: outubro 2021.
- ATSDR – AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for arsenic**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, 2007. Disponível em: < <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf> >. Acesso em: outubro 2021.
- ATSDR – AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for manganese**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, 2012. Disponível em:<<https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp151.pdf>>. Acesso em: outubro 2021.
- 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.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Oxidative stress: concept, implications and modulating factors **Revista de Nutrição**, v. 23, n.4, p. 629-643, 2010.
- BONNES, T., GUÉRIN, T. Is malonaldehyde a valuable of peroxidation? **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 985-988, 1992.
- BORRELY, S.I.; GARCIA, V.S.G.; BORRELY, T.; FAVARO, D I.T. Metals, trace elements and ecotoxicity in sediments of the Cubatão River, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 13, n.2, p. 49-61, 2018.

BRASIL. **Ministério de Minas e Energia – MME**. Setor mineral fecha 2017 com superávit de US\$ 23,4 bi, maior dos últimos cinco anos. Disponível em: <[http://www.mme.gov.br/web/guest/pagina-inicial/outras-noticias/-/asset\\_publisher/32hLrOzMKwWb/content/setor-mineral-fecha-2017-com-superavit-de-us-23-4-bi-maior-dos-ultimos-cinco-anos](http://www.mme.gov.br/web/guest/pagina-inicial/outras-noticias/-/asset_publisher/32hLrOzMKwWb/content/setor-mineral-fecha-2017-com-superavit-de-us-23-4-bi-maior-dos-ultimos-cinco-anos)>. Acesso em: outubro 2021.

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.

BECKMAN R. A.; MILDVAN A. S.; LOEB L. A. On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis *in vitro*. **Biochemistry**. v. 24, p. 5810-5817. 1985

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.

CAMARGO, F. A. O. *et al.* Aspectos fisiológicos e caracterização da toxidez de ácidos orgânicos voláteis em plantas. **Ciência Rural**, v. 31, n. 3, p. 523-529, 2001.

CARITÁ, R; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Comparison of the toxicogenetic potential of sewage sludges from diferente treatment processes focusing agricultural use. **Environmental Science na 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.

CHUNG, J.; YU, S.; HONG, Y.. Environmental source of arsenic exposure. **Journal of preventive medicine and public health**, v. 47, n. 5, p. 253, 2014.

CIRILO, N. R. M. *et al.* Qualidade da água no enraizamento de *Allium cepa* L. em sistema de hidroponia para o estudo da mitose. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 12, p. 29405-29416, 2019.

CORROQUÉ, N. A. **Avaliação toxicogenética de amostras ambientais de uma área de mineração de ouro (Paracatu-MG) contaminada com arsênio e outros metais**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2019.

CRUZ, J. M. *et al.* Comparative study of phytotoxicity and genotoxicity of soil contaminated with biodiesel, diesel fuel and petroleum. **Ecotoxicology**, v. 28, n. 4, p. 449-456, 2019.

DA SILVA, D. C. V. R.; POMPÊO, M.; DE PAIVA, T. C. B. A ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. In: POMPÊO et al (Orgs). **Ecologia de reservatórios e interfaces**. Instituto de Biociência da USP, v. 22, 2015.

DE SOUSA, G. V. **Mecanismos de tolerância e alterações metabólicas em plantas de linhaça dourada (*Linum usitatissimum* L.) expostas e co-expostas a arsênio e selênio.** Tese (Doutorado em Ciências - Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2020.

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.

DO NASCIMENTO S. F. *et al.* Riscos relacionados à intoxicação por alumínio. **Infarmacia-Ciências Farmacêuticas**, v. 24, n. 1/3, p. 120-124, 2013.

DONALDSON J, M. D.; LABELLA F. Manganese neurotoxicity: a model of free radical mediated neurodegeneration? **Canadian Journal Physiology Pharmacology**. v. 60, p. 1398-1405, 1982.

DUIJF, P. H. G.; SCHULTZ, N.; BENEZRA, R. Cancer cells preferentially lose small chromosomes. **International Journal of Cancer**. v. 132, n.10, p. 2316-2326, 2013.

DUNKEL V. C.; SAN R. H.; SEIFRIED H. E.; WHITTAKER P. Genotoxicity of iron compounds in *Salmonella typhimurium* and L5178Y mouse lymphoma cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 33, p. 28-41, 1999.

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

ECHART, C. L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, v. 31, p. 531-541, 2001.

EID, R.; NAGLA T.T. ARAB, N. T. T.; GREENWOOD, M. T. Iron mediated toxicity and programmed cell death: A review and re-examination of existing paradigms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1864, p. 399–430, 2017.

ELHAJOUJI, A.; CUNHA, M.; KIRSCH-VOLDERS, M. Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. **Mutagenesis**, v.13, n.2 p. 193-198, 1998.

EL-JAOUAL, T.; COX, D. A. Manganese toxicity in plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, n. 2, p. 353-386, 1998.

ENSERINK, E. L.; MAAS-DIEPEVEEN, J. L.; VAN LEEUWEN, C. J. Combined effects of metals; an ecotoxicological evaluation. **Water Research**, v. 25, p. 679-687, 1991.

EXLEY, C. *et al.* The pro-oxidant activity of aluminum. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 3 p. 380-387, 2004.

FARIA, C. M. B. ; SILVA, D. J.; MENDES, A. M. S. Nutrição e adubação. In: COSTA, N. D.; RESENDE, G. M. (Org.). **Cultivo da Cebola no Nordeste**. 3 ed. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido, 2007, p. 1-6. Disponível em

<[http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/sistema\\_producao/spcebola/adubacao.htm](http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/sistema_producao/spcebola/adubacao.htm)>. Acesso em : outubro 2021.

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, F. R. C.; ARAÚJO, E. R. Mineração no Brasil: crescimento econômico e conflitos ambientais. In: GUIMARÃES, P. E.; CEBADA J. D. P. (Org.). **Conflitos Ambientais na Indústria Mineira e Metalúrgica: o passado e o presente**. 1ed. Rio de Janeiro; Évora: Centro de Investigação em Ciência Política (CICP); Centro de Tecnologia Mineral (CETEM/MCTI), v. 1, p. 65-88, 2016.

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

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72: 1680 – 1686, 2009.

FERREIRA, P. C. *et al.* Aluminum as a risk factor for Alzheimer's disease. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v.16, n.1, p.151-157, 2008.

FIGUEIRÔA, S. F. de M. Mineração no Brasil: aspectos técnicos e científicos de sua história na colônia e no império (séculos XVIII-XIX). **América Latina en la historia económica**, p. 41-55, 1994.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**. Sweden, p. 99-112. Abr, 1985.

FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. Iron toxicity and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 180, n. 1, p. 23-32, 2002.

G1 MINAS GERAIS. **Barragem se rompe, e enxurrada de lama destrói distrito de Mariana**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/minas-gerais/noticia/2015/11/barragem-de-rejeitos-se-rompe-em-distrito-de-mariana.html>>. Acesso em: outubro 2021.

G1 MINAS GERAIS. **Barragem da Vale se rompe em Brumadinho, MG**. Disponível em:<<https://g1.globo.com/mg/minas-gerais/noticia/2019/01/25/bombeiros-e-defesa-civil-sao-mobilizados-para-chamada-de-rompimento-de-barragem-em-brumadinho-na-grande-bh.ghtml>>. Acesso em: outubro 2021.

GIGECK, L. S. **Avaliação dos efeitos citogenotóxicos da associação das amins biogênicas (cadaverina e putrescina) presentes no necrochorume, por meio de bioensaios com *Allium cepa* (liliaceae) e *Lactuca sativa* (Asteraceae)**. Trabalho de Conclusão de Curso –TCC, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas da

Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP/Faculdade de Ciências da Saúde – FACIS, 2018.

GISSELSSON, D. *et al.* Mitotic instability associated with late genomic changes in bone and soft tissue tumours. **Cancer letters**, v. 206, p. 69-76, 2004.

GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de estatística em ecologia**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

GRANT, W. F. Chromosome Aberration Assays in *Allium*. **Mutation Research**, v. 99, p. 273– 291, 1982.

GUPTA, K. *et al.* Cytotoxic Assessment of Chromium and Arsenic Using Chromosomal Behavior of Root Meristem in *Allium cepa* L. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 100, p. 803-808, 2018.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M. C. J. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation an update. **FEBS letters**, v. 307, p. 108-112, 1992.

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.

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

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Minas Gerais – Paracatu**. 2017. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/paracatu/panorama>>. Acesso em: outubro 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. **Economia Mineral Brasileira 2020**. Brasília, 2020. Disponível em: <https://ibram.org.br/publicacoes/>. Acesso em: 11 out. 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO (IBRAM). **Informações e análises da economia mineral brasileira**. 7ª ed., 2012. Disponível em: <<http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00002806.pdf>>. Acesso em: 11 out. 2021.

JARDIM, G.M.; ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R. Avaliação ecotoxicológica da água e do sedimento do rio Corumbataí, SP. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n.1, p. 51-9, 2008.

JOARDAR, M.; SHARMA, A. Comparison of clastogenicity of inorganic Mn administered in cationic and anionic forms in vivo. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 240, p. 159- 163, 1990.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Guanabara Koogan, 2019.

KESARI, V. P.; KUMAR, A.; KHAN, P. K. Genotoxic potential of arsenic at its reference dose. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 80, p. 126-131, 2012.

KOCHIAN, Leon V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual review of plant biology**, v. 46, n. 1, p. 237-260, 1995.

KOPP, M. M. *et al.* Níveis críticos dos ácidos acético, propiônico e butírico para estudos de toxicidade em arroz em solução nutritiva. **Acta Botanica Brasílica**, v. 21, n. 1, p. 147-154, 2007.

LABOISSIÈRE, M. **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\\_cidades\\_df,475445/proximidade-mineradora-populacao-poe-moradores-de-paracatu-em-risco.shtml](http://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/cidades/2015/03/14/interna_cidades_df,475445/proximidade-mineradora-populacao-poe-moradores-de-paracatu-em-risco.shtml)>. Acesso em: outubro 2021.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LEME, D. M., MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study, **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 650 p. 80–86. 2008.

LEONARD, A.; GERBER, G. B. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of aluminium. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 196, p. 247-257, 1988.

LEVAN, A. Cytological reaction induced by inorganic salt solutions. *Nature*, v. 156, p. 751-752, 1945.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, p. 471-486, 1938.

LIMA, P. D. L. *et al.* Genotoxic effects of aluminum, iron and manganese in human cells and experimental systems: a review of the literature. **Human & experimental toxicology**, v. 30, n. 10, p. 1435-1444, 2011.

LIMA P. D.; VASCONCELLOS M. C.; BAHIA M. O.; MONTENEGRO R. C.; PESSOA C. O.; COSTA-LOTUFO L. V. *et al.* Genotoxic and cytotoxic effects of manganese chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. **Toxicology In Vitro**. v. 22, p. 1032-1037, 2008.

LINO, A. S.; KASPER, D.; CARVALHO, G. O.; GUIDA, Y.; MALM, O. Selenium in sediment and food webs of the Tapajós River basin (Brazilian Amazon) and its relation to mercury. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 62, p. 1-8, 2020.

LUZHNA, L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n.131, 2013.

MAFRA, D.; ABDALLA, D.S.P; COZZOLINO, S. M. Lipid peroxidation in patients with chronic renal failure. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 3, p. 205-212, 1999.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A. S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis.**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

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, n. 2, p. 1399-1407, 2015.

MARNETT, J. L. Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research**, v. 424, p. 83-95, 1998.

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

MIGLIORE, L. *et al.* Micronuclei assay and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 34, n. 4, p. 279-284, 1999.

MIGUEL, P. S. B. *et al.* Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. **Ces revista**, v. 24, n. 1, p. 13-29, 2010.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **O que é o CONAMA?** Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/>. Acesso em: 27 set. 2021.

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.

MORÔCO, JOÃO. **Análise Estatística com o SPSS Statistics**. Editora Report Number, 7ª Edição, 2018.

MORTLEY, D. G. Manganese toxicity and tolerance in sweetpotato. **HortScience**, v. 28, n. 8, p. 812-813, 1993.

MUKHOPADHYAY M. J.; SHARMA A. Manganese in cell metabolism of higher plants. **The Botanical Review**, v. 57, p. 117-149, 1991.

OREMLAND, R. S.; STOLZ, J. F. The ecology of arsenic. **Science**, v. 300, n. 5621, p. 939-944, 2003.

PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and toxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 202, n. 2, p. 199-211, 2005.

- PASCALICCHIO, A. E. **Contaminação por metais pesados**. São Paulo: Ed. Annablume, 2002. 132p.
- RATNAIKE, R. N. Acute and chronic arsenic toxicity. **Postgraduate Medical Journal**. Woodville, p. 391-396, 2003
- REIS, M. M.; SANTOS, L. D. T.; SILVA, A. J.; PINHO, G. P.; MONTES, W. G. Metal Contamination of Water and Sediments of the Vieira River, Montes Claros, Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, p. 527–536, 2019.
- ROLDÁN-ARJONA T, ARIZA RR. Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. **Mutation Research**, v. 681, p. 169-179, 2009.
- ROUT, G.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Aluminium toxicity in plants: a review. **Agronomie**, v. 21, p. 3-21, 2001.
- RUDEL, R.; SLAYTON, T. M.; BECK, B. D. Implications of arsenic genotoxicity for dose response of carcinogenic effects. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 23, p. 87-105, 1996.
- RUSSEL, J. B. **Química Geral**. 2. Ed. São Paulo: Makron Books, 1994.
- RUSSELL, L. M.; STRIKE, P.; BROWNE, C. E.; JACOBS, P. A. X chromosome loss and ageing. **Cytogenetic and Genome Research**., v. 116, n.3, p. 181-185, 2007.
- SCHOEN, A. *et al.* Arsenic toxicity at low doses: epidemiological and mode of action considerations. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 198, p. 253-267, 2004.
- SIMS, J., 2014. **Paracatu Project Brazil Nacional Instrument NI-43-101 Technical Report prepared by Kinross Gold Corporation**. Disponível em: <[https://www.miningdataonline.com/reports/Paracatu\\_3312014\\_TR.pdf](https://www.miningdataonline.com/reports/Paracatu_3312014_TR.pdf)> Acesso em: setembro 2021.
- SISINNO, C. L. S. Disposição em aterros controlados de resíduos sólidos industriais não-inertes: avaliação dos componentes tóxicos e implicações para o ambiente e para a saúde humana. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, p. 369-374, 2003.
- SOMMAGGIO, L. R. D. *et al.* Ecotoxicological na microbiological assessment of sewage sludge associated with sugarcane bagasse. **Ecotoxicological and Environmental Safety**, v. 147, p. 550-557, 2018.
- SOUZA, P. M. S. *et al.* Disintegration and biodegradation in soil of PBAT mulch films: influence of the stabilization systems based on carbon black/hindered amine light stabilizer and carbon black/vitamin E. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 27, n. 7, p. 1584-1594, 2019.
- STREDRICK, D. L. *et al.* Manganese-induced cytotoxicity in dopamine-producing cells. **Neurotoxicology**, v. 25, p. 543-553, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. **Fisiologia do desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TOYOKUNI, S. Role of iron in carcinogenesis: Cancer as a ferrotoxic disease. **Cancer Science**, v. 100, p. 9-16, 2009.

TOYOKUNI, S. The origin and future of oxidative stress pathology: From the recognition of carcinogenesis as na iron addiction with ferroptosis-resistance to non-thermal plasma therapy. **Pathology International**. v. 66, p. 245–259, 2016.

TRINDADE, A. R. *et al.* Influência do acúmulo e distribuição de íons sobre a aclimação de plantas de sorgo e feijão-de-corda, ao estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, p. 804-810, 2006.

TRIPATHI, R. M.; RAGHUNATH, R.; KRISHNAMOORTHY, T. M. Arsenic intake by the adult population in Bombay city. **Science of the total environment**, v. 208, n. 1-2, p. 89-95, 1997.

VERSTRAETEN, S. V.; AIMO, L.; OTEIZA, P. I. Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. **Archives of toxicology**, v. 82, n. 11, p. 789-802, 2008.

VERSTRAETEN, S. V., NOGUEIRA, L. V , SCHREIER, S., OTEIZA, P.I.. Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing: role in lipid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 338, n. 1, p. 121-127, 1997.

WU, L.; YI, H.; YI, M. Assessment of arsenic toxicity using *Allium/Vicia* root tip micronucleus assays. **Journal of hazardous materials**, v. 176, p. 952-956, 2010.

YI, M. *et al.* Aluminum induces chromosome aberrations, micronuclei, and cell cycle dysfunction in root cells of *Vicia faba*. **Environmental Toxicology: An International Journal**, v. 25, p. 124-129, 2010.

YUAN, C.; LEE, Y.; HSU, G. W. Aluminum overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. **Journal of Biomedical Science**, v. 19, n. 51, 2012.

ZAGATTO, P. A. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos. 2008.