



Maione Wittig Franco

**Avaliação da qualidade ambiental no entorno de áreas de
mineração e análise da exposição da cianobactéria
Synechococcus nidulans a oxidação de arsênio**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Francisco A. R. Barbosa

Co-orientadora: Sérgia M. S. Magalhães

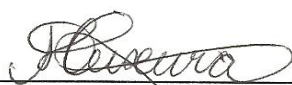
**Belo Horizonte,
Março de 2014**

Maione Wittig Franco

**Avaliação da qualidade ambiental no entorno de áreas de mineração
e análise da exposição da cianobactéria *Synechococcus nidulans* a
oxiânions de arsênio**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 21 de Março de 2014.



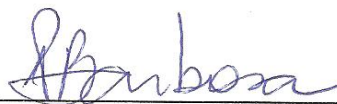
Monica Cristina Teixeira



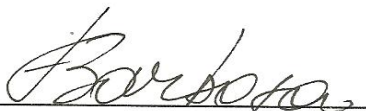
Luiz Drude de Lacerda



Clésia Cristina Nascentes



Paulina Maria Maia Barbosa



Francisco Antônio Rodrigues Barbosa

(Orientador)

Por toda a minha ausência,
Por todo tempo de saudade,
Dedico esse trabalho aos meus pais,
Mussolini Franco e Zenilde Wolff
Wittig.

Esse mundo é muito mais desconhecido do que a escala em que do nosso pensamento consegue alcançar. Ainda há muito a ser descoberto e aplicado desde a ciência empírica ao convívio social. Este trabalho é um grão de areia no mar da ciência, que eu tenho o prazer de adicionar.

Maione Wittig Franco

Agradecimento

Agradeço a todos os cidadãos brasileiros que financiam e acreditam na educação no Brasil. Ao governo Federal, pelo repasse de parte da arrecadação de impostos à CAPES, CNPq e FAPEMIG.

A todos os professores que deram vida ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – INCT Acqua- Recursos Minerais Água e Biodiversidade.

Uma tese ou dissertação Não é o resultado do esforço perseverante de uma só pessoa, mas do seu grupo de trabalho e parcerias. Agradeço a todos que contribuíram:

Ao Professor e Orientador Francisco, exemplo de dedicação profissional, pelos desafios, apoio e oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

À professora Sérgia, por compartilhar seus conhecimentos, por ter praticamente me adotado. Agradeço pelo seu esforço em contribuir para minha formação profissional.

Ao Professor Igor Vasconcelos pelas análises de XAFS no LNLS, pelas proveitosas discussões, pela confiança e apoio.

À Professora Luzia Modolo por compartilhar seus conhecimentos, pelo apoio com a realização dos experimentos.

Aos professores Francisco, Paulina e Arnola pelo esforço para encontrarmos áreas de estudo apropriadas. Ao pessoal que trabalhou nas coletas do INCT: Karine, Luiz, Camila, Rodrigo, Suellen, Luiz (Dursinho), Professores Paulina e Francisco. À Júnia e Aline pelo apoio com as análises de fitoplâncton.

Aos professores que gentilmente me emprestaram equipamentos: Ronaldo Nagem, Geraldo Wilson, Ricardo P. Coelho, Arnola Rietzler.

Aos amigos do Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia aquática: Marcelo, pela ajuda com as análises, à Graça e Lana pelo suporte. Agradeço às amigas, sempre me dando força: Natália, Liliam, Mirla, Iara, Thécia, Paula Reis, Liss, Lorena, Letícia, Laura, Paula Nóbrega. Às amigas Fernanda, Camila, Dirce e Raquel pelo apoio no cultivo e realização dos experimentos. Ao Diego pela solidariedade nas análises de dados.

Aos estudantes do laboratório de Análises químicas – (Laq-DEMET) pelas determinações de metais.

Ao professor Jaime Mello e ao técnico Mário pelo apoio na realização das análises de arsênio na Universidade Federal de Viçosa.

Aos Professores Bruno Batista e Fernando Barbosa pelas análises de especiação de arsênio na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Ao professor e tutor do programa Reuni – José Fernandes pelo apoio com as disciplinas de Limnologia e Ecologia II, o que contribuiu enormemente para minha formação profissional.

Reforço que este trabalho é resultado de esforço coletivo. Especialmente de Meus pais, Zenilde e Mussolini, que se esforçaram desde sempre para que eu estudasse, estudasse e estudasse... “mas esse estudo não vai acabar nunca, menina?”.

Agradeço ao Paulo, meu marido por seu companheirismo, apoio e por sua paciência no tempo dedicado à realização deste trabalho. Agradeço pelas mensais idas e vindas Nanuque - Belo Horizonte passando pela conhecida BR-381.

À amiga Ana Luiza pelo apoio principalmente no início da mudança de viçosa para Belo Horizonte.

Aos meus irmãos, Marcelino e Meriane, pelo apoio: “vem pra cá, pode trazer o computador”.

Aos meus sogros, Elpídio e Diana, pelo apoio, especialmente à Diana pelo carinho de uma segunda mãe, que sabe fazer o impossível para que tudo fique bem.

À Deus por guiar minhas escolhas.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| LISTA DE FIGURAS..... | 1 |
| LISTA DE TABELAS..... | 5 |
| RESUMO GERAL..... | 6 |
| GENERAL ABSTRACT..... | 8 |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 10 |
| REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 1. Arsênio | 13 |
| 2. Aplicações do arsênio e contaminação humana..... | 15 |
| 3. O arsênio nas teias tróficas | 18 |
| 4. Cianobactérias..... | 19 |
| 5. Interação do As com cianobactérias | 20 |
| CAPÍTULO I: Contaminação de cursos d'água por metais tóxicos e pelo semimetal arsênio em áreas de mineração no estado de Minas Gerais (Brasil)..... | 25 |
| CAPÍTULO II: A comunidade fitoplanctônica como bioindicadora da qualidade ambiental em riachos de áreas de mineração no quadrilátero ferrífero, Estado de Minas Gerais | 44 |
| CAPÍTULO III: Um estudo de XAFS das interações do arseniato e arsenito com o tripeptídeo glutationa | 62 |
| CAPÍTULO IV: Efeito bacteriostático e biotransformação de espécies inorgânicas de arsênio em <i>Synechococcus nidulans</i> (Cyanobacteria)..... | 74 |
| DISCUSSÃO GERAL..... | 94 |
| ANEXO I: Micrografias de cianobactérias e microalgas isoladas de pontos de mineração..... | 96 |
| APÊNDICE: A Espectroscopia de absorção de raios X | 98 |

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1: Estrutura trigonal piramidal do arsênio cinza elementar (As^0). Cada átomo de As compartilha seus elétrons de valência com três outros átomos de As formando ligações covalentes. Fonte: Henke e Hutchinson, 2009.

Figura 2: Alguns compostos de arsênio comuns na natureza. Traduzido de Henke e Hutchinson, 2009.

Figura 3: Distribuição de espécies de arsênio em função do pH, a 25 °C e 1 bar. (A): arsenito; (B): arseniato. Fonte (A): Wood et al., 2002 (B): Wolfe-simon et al., 2009.

Figura 4. Modelo de probabilidade global de contaminação geogênica por arsênio nas águas subterrâneas para (a) condições redutoras em águas subterrâneas; (b) Condições oxidantes, onde o arsênio se encontra no seu estado oxidado. Os modelos explicaram 77% da variação do arsênio nas regiões redutoras e 68% da variação do arsênio em regiões oxidantes. Fonte: Amini et al., 2008.

Figura 5: Queratoses causadas pela exposição ao arsênio. Fonte (A): Smith et al., 2000; (B): www.toxipedia.org/display/toxipedia/Arsenic+Poisoning+in+Bangladesh.

Figura 6: Modelo para a transformação de arsênio pelos organismos fitoplanctônicos. (A) condição de fosfato limitante. (B) condição de fosfato luxuriante. A linha tracejada representa a membrana celular. O tamanho do texto corresponde à concentração de espécies e os tamanhos das setas às taxas de reação. DMA: dimetilarsênio, MMA: monometilarsênio, As(III): arsenito, As(V): arseniato, PO_4 : fosfato. Fonte: Hellweger e Lall, 2004.

Figura 7: Esquema da parede celular de cianobactérias, mostrando a camada de peptídeoglicano, a membrana externa, típica de bactérias gram-negativas e a camada S. A bainha de mucilagem não foi representada. Fonte: Šmarda et al., 2002.

Capítulo I

Figura 1: Variáveis físicas e químicas avaliadas nos períodos hidrológicos de seca e de chuva. Barras escuras correspondem ao período de chuvas, barras claras ao período de seca. M1: captação Mutuca (área de referência); M2: córrego da Mina - (área impactada), bacia do Rio Das Velhas. P1: córrego da área de referência, P2: córrego em Barra Feliz (área impactada), na bacia do Rio Doce.

Figura 2: Variações das concentrações de As e Mn na água em P1 –ponto de referencia (cor preta) e P2 – ponto impactado (cor branca), bacia do rio Doce. Linha inferior: limite de quantificação; linha superior: valor de referência (Res. 357 –CONAMA).

Figura 3: Variações das concentrações de arsênio e Mn na água em M2, ponto impactado, bacia do rio das Velhas. Todos os valores de M1, área de referencia, estiveram abaixo do limite de quantificação. Linha inferior: limite de quantificação; linha superior: valor de referência (Res. 357 –CONAMA).

Figura 4: Análise de componentes principais para pontos amostrados na bacia do Rio Doce. P1: ponto de referência, P2: ponto impactado. Metais: As, Fe, Mn, Cu e Zn em água (A); e As, Fe,

Mn, Cu, Pb, Zn, Mg, Ni, Cr, Al e Cd no sedimento (S). Variáveis físicas e químicas: pH, alcalinidade, condutividade e sólidos em suspensão (TDS).

Figura 5: Análise de componentes principais para pontos amostrados na bacia do Rio Das Velhas. M1: ponto de referência, M2: ponto impactado. Metais: As, Fe, Mn, Zn e Mg em água (A) e no sedimento (S): As, Fe, Mn, Cu, Pb, Zn, Ni, Cr, Al, Cd e Mg. Variáveis físicas e químicas: pH, alcalinidade (Alc.), condutividade, total de sólidos dissolvidos (TDS).

Figura 6: Análise de componentes principais realizada com todos os pontos amostrados nas bacias do Rio Doce e Velhas. P1: ponto de referência; P2: ponto impactado, na bacia do Rio Doce. M1: ponto de referência e M2: ponto impactado, amostrados na bacia do Rio Das Velhas. Pontos vermelhos indicam período hidrológico de seca, e pontos azuis, de chuva.

Capítulo II

Figura 1. Concentrações do íon amônio nos pontos da bacia do Rio Doce, sub-bacia do Ribeirão Conceição. P1: ponto de referência; P2: Ponto impactado.

Figura 2. Concentrações de fósforo total na área da bacia do Rio Doce, sub-bacia do Ribeirão Conceição. P1: ponto de referência; P2: Ponto impactado. A linha tracejada representa valor de referência para classe 3 (Resolução 357 - CONAMA).

Figura 3. Concentrações de íon amônio para área da bacia do Rio Das Velhas. M1: ponto de referência; M2: ponto impactado.

Figura 4. Concentrações de P-total para área da bacia do Rio Das Velhas. M1: ponto de referência; M2: ponto impactado.

Figura 5. Curvas de acumulação de espécies em função do número de amostras para cada ponto. A: Ponto de referencia da bacia do Rio Doce (P1); B: Ponto impactado na bacia do Rio Doce (P2); C: Ponto de referencia da bacia do Rio Das Velhas, captação Mutuca (M1); D: ponto impactado na bacia do Rio Das Velhas, córrego da Mina (M2). As linhas azuis representam o intervalo de confiança a 95%.

Figura 6: Diagrama de Venn das espécies de Bacillariophyceae. A: pontos no bacia do Rio Doce, P1: ponto de referência, P2: ponto impactado. B: Bacia do Rio Das Velhas, M1: ponto de referencia; M2: ponto impactado.

Figura 7. Abundância de grupos de organismos fitoplanctônicos em pontos na bacia do Rio Doce nos períodos de seca (setembro de 2011) e chuvoso (novembro e dezembro de 2011). A: a área de Referência (P1); B: área impactada (P2). Legenda: ZYGN: Zygnematophyceae, EUGL: Euglenophyceae; DINO: Dinophyceae, CYAN: Cyanophyceae, CRYP: Cryptophyceae, CHRY: Chrysophyceae, CHLO: Chlorophyceae, BACI: Bacillariophyceae.

Figura 8. Abundância de grupos de organismos fitoplanctônicos na Bacia do Rio Das Velhas nos períodos de Chuva, (novembro e dezembro de 2010 e 2011), e de seca (junho e julho de 2011). Legenda: ZYGN: Zygnematophyceae, EUGL: Euglenophyceae; DINO: Dinophyceae, CYAN: Cyanophyceae, CRYP: Cryptophyceae, CHRY: Chrysophyceae, Chlo: Chlorophyceae, BACI: Bacillariophyceae.

Figura 9. Análise de correspondência canônica nos pontos amostrados. (A) bacia do Rio Doce, P1: ponto de referência, P2: ponto impactado. (B) Bacia do Rio Das Velhas, M1: ponto de referência; M2: ponto impactado. Variáveis ambientais: As, Fe, Mn, Zn, Mg dissolvidos em água; COND: condutividade; ALC: alcalinidade; TDS: total de sólidos dissolvidos; NH₄: amônio; NO₂: nitrito; NO₃: nitrato; PO₄: fosfato; Hs: índice de diversidade de Shannon; Ej: equabilidade. Grupos fitoplanctônicos: ZYGN: Zygnematophyceae, EUGL: Euglenophyceae; DINO: Dinophyceae, CYAN: Cyanophyceae, CRYP: Cryptophyceae, CHRY: Chrysophyceae, CHLO: Chlorophyceae, BACI: Bacillariophyceae.

Capítulo III

Figura 1. Espectro de XANES normalizado da borda K de espécies inorgânicas de arsênio em concentrações crescentes de GSH. (A) As(III)+GSH em proporções molares de 1:0; 1:0.5; 1:1, 1:2, e 1:4. (B) As(V)+GSH nas proporções molares de 1:0; 1:0.5; 1:2; 1:4; e 1:6. (C) Complexo As(GS)₃ derivado de As(III) ou As(V) nas proporções de 1:4 e 1:6, respectivamente.

Figura 2. Ajuste dos dados dos espectros de XANES obtidos para espécies inorgânicas de As em concentrações crescentes de GSH. (A) As(III)+GSH nas proporções molares de 1:0.5, 1:1,1:2. (B) As(V)+GSH nas proporções molares de 1:0.5, 1:2,1:4. A percentagem de cada uma das espécies químicas de arsênio é dada na cor correspondente com a legenda.

Figura 3. Espectro de EXAFS da borda K do As em concentrações crescentes de GSH. (A) As(III)+GSH nas proporções molares de 1:0, 1:0.5; 1:1, 1:2; 1:4; (B) As(V)+GSH nas proporções molares de 1:0, 1:0.5; 1:2, 1:4; 1:6.

Figura 4: Transformada de Fourier (FT) da região de EXAFS do espectro da borda K do As em concentrações crescentes de GSH. (A) As(III) nas proporções molares de 1:0; 1:0.5, 1:1, 1:2, e 1:4. (B) As(V) nas proporções molares de 1:0, 1:0.5, 1:2, 1:4 e 1:6.

Capítulo IV

Figura 1. Curvas de crescimento de *S. nidulans* sob concentrações crescentes de (A) As(V); (B) As(III), por 96 h. Controle: n=4, testes: n=3, p<0.05, análise de co-variância.

Figura 2. Percentagem de inibição do crescimento de *S. nidulans* sob exposição ao arsênio, 96 h. (A) As(V) (B) As(III).

Figura 3: Cromatograma obtido em HPLC-ICP-MS, para controle da especiação de As(III).

Figura 4: Cromatograma obtido em HPLC-ICP-MS, para biomassa de *S. nidulans* exposta ao As(V), com a expansão para as espécies que aparecem entre os tempos de 3 e 4.5 min.

Figura 5: Cromatograma obtido em HPLC-ICP-MS, para biomassa de *S. nidulans* exposta ao As(III), com a expansão para as espécies que aparecem entre os tempos de 3 e 4,5 min.

Figura 6. espectro de XANES da borda K do As para os padrões aquosos e cristalinos (crist.) do As(III) e As(V).

Figura 7. Transformada de Fourier das oscilações de EXAFS para o padrão de As(V) aquoso [As(V)aq] e o sobrenadante das culturas tratadas com As(V) [As(V)-SN] após 30 dias.

Figura 8. espectro de XANES da borda K do As na biomassa e dos padrões de As(III), As(V), DMA, As(GS)₃, para as ligações de As⁵⁺-O; As³⁺-O; As-C; e As-S.

Figura 9. Ajuste do espectro de XANES da borda K do As para a biomassa de *S. nidulans* exposta ao As(V) (em vermelho), e os padrões de As(V) em amarelo e As(III) em verde. O ajuste realizado para o espectro de As intracelular indicou 66% de As com nox +5 e 34% com nox +3.

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1: valores médio, máximo e mínimo de metais na água (mg/l) nos pontos amostrados nas bacias do Rio Das Velhas e bacia do Rio Doce.

Tabela 2: Valores médio, máximo e mínimo de metais no sedimento (mg/kg) nos pontos amostrados nas bacias do Rio das Velhas e bacia do Rio Doce.

Capítulo II

Tabela 1: Riqueza de espécies nos pontos amostrados.

Capítulo III

Tabela 1: ajuste dos dados de EXAFS para amostras de As(III) ou As(V) em concentrações crescentes de GSH.

Capítulo IV

Tabela 1. Concentrações de As inicial e após 96 h no meio de cultivo em teste de toxicidade.

Tabela 2: Percentagem das espécies de As do total extraído encontradas na biomassa, sobrenadante (SN) e controle.

Tabela 3. Determinação das concentrações de As total por ICP-OES.

Tabela 4: Espécies de As intracelulares em algumas espécies de cianobactérias.

RESUMO GERAL

FRANCO, Maione Wittig, D.Sc., Universidade Federal de Minas Gerais, Março de 2014.

Avaliação da qualidade ambiental no entorno de área de mineração e análise da exposição da cianobactéria *Synechococcus nidulans* a oxiânions de arsênio

Orientador: Francisco Antônio Rodrigues Barbosa. Co-orientadora: Sérgia Maria Starling Magalhães.

O Quadrilátero Ferrífero (QF), localizado no Estado de Minas Gerais, é uma região de formação geológica rica em depósitos arseníferos, onde a atividade de mineração aumenta o risco de contaminação por elementos tóxicos. A primeira etapa desse trabalho teve por objetivo avaliar as concentrações de metais tóxicos em água e sedimento em cursos d'água na bacia do Rio Doce e Rio Das Velhas, no entorno de empreendimentos de mineração, com atenção voltada para os riscos de contaminação humana nestes locais. A segunda etapa teve por objetivo comparar a comunidade fitoplanctônica entre pontos impactados e de referência, para avaliação da qualidade ambiental. Em uma terceira etapa experimental, utilizou-se como organismo-teste a cianobactéria *Synechococcus nidulans* (Pringsheim) Komárek proveniente de curso d'água em área de mineração, para estudar a toxicidade e bioacumulação do As e verificar a possibilidade de utilizar cianobactérias como agentes de bioacumulação de As e/ou biotransformação de formas de As inorgânico em formas orgânicas. Para isso, cultivou-se *S. nidulans* em meio de cultivo BG-11 sob exposição ao As(III) e As(V). Foram utilizadas as técnicas de Espectroscopia de Absorção de Raios X (XAFS) para os estudos do comportamento intracelular do As e Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (HPLC-ICP-MS) para especificação química. Quanto à contaminação por metais tóxicos nas águas destacaram-se a contaminação por As e manganês (Mn). Além desses elementos, no sedimento foram encontrados outros metais tóxicos como o cádmio na bacia do Rio Doce. Por se tratar de uma zona rural, onde é comum a utilização direta das águas, a população local está sob o risco de contaminação por exposição crônica. Entre os grupos de organismos fitoplanctônicos, Zignematophyceae e Bacillariophyceae se destacaram com maiores riqueza e abundância associadas aos pontos de referência, e Euglenophyceae associada a locais com altas concentrações de nutrientes. As diferenças na composição e estrutura da comunidade fitoplanctônica indicaram seu potencial como bioindicadora da qualidade ambiental. A cepa de *S. nidulans* demonstrou elevada resistência aos oxiânions de As(III) e As(V). Por meio das taxas de crescimento em função da concentração de As, foram determinadas as EC₅₀ sob exposição ao As(V) de 2642,97 mg/l e As(III) de 6,64 mg/l. Neste trabalho verificou-se que as cianobactérias são resistentes a concentrações de As muito elevadas em relação àquelas encontradas nos pontos amostrados. Utilizando-se a técnica de XAFS demonstrou-se que o

principal sítio de ligação do As(III) são os grupos sulfidríla, com a formação do complexo $\text{As}(\text{GS})_3$. Em estudo de longo tempo de exposição (30 dias) ao As(III) e As(V) a biotransformação de As(V) em As(III) e compostos orgânicos de As foram observadas, sendo que a espécie predominante intracelularmente foi As(V) sob exposição a ambas espécies químicas. Proporções elevadas de As inorgânico intracelular foi encontrado em *S. nidulans*, indicando seu potencial como agente de biotransformação de As e a participação dessa espécie de cianobactéria na geoquímica desse elemento. Assim, foram apresentadas contribuições para esclarecer a dinâmica de penetração e do comportamento intracelular do As em *S. nidulans*, uma cepa de cianobactéria proveniente de um local contaminado.

GENERAL ABSTRACT

Assessment of environmental quality in the vicinity of mining and analysis of the exposure of the cyanobacterium *Synechococcus nidulans* to arsenic oxyanions. Advisor: Francisco Antônio Rodrigues Barbosa . Co-advisor: Sérgia Maria Starling Magalhães.

The Iron Quadrangle is a region in Minas Gerais state rich in arsenic (As) in soils and sediments, where mining activity increases the risk of contamination by toxic elements. In the present study, the first step was to evaluate the concentrations of toxic metals in water and sediment in streams in the Rio Doce and Rio Das Velhas basin in the vicinity of mining areas, with attention focused on the risks of human contamination at these sites. The second step was to compare the phytoplankton community between impacted and reference sites to evaluate environmental quality. In a third step, the cyanobacterium *Synechococcus nidulans* (Pringsheim) Komárek, collected and isolated from a stream in a mining area, was used as a test organism to study As toxicity, bioaccumulation and speciation, in order to verify the possibility of using cyanobacteria as agents to remove As oxyanions from aqueous solution or to biotransform inorganic As into organic forms. *S. nidulans* was cultivated in culture media BG-11 under exposure to As(III) and As(V). The X-ray Absorption Spectroscopy (XAFS) was used to investigate intracellular As binding sites and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (HPLC-ICP-MS) was used for As chemical speciation. In the water from sampled points, it was observed contamination by the toxic metals As and manganese (Mn). In addition to these elements, other toxic metals were found in the sediments, such as cadmium (Cd) in the Rio Doce basin. Because it is a rural area where direct use of water is common, the local population is at risk of contamination by chronic exposure. Among the groups of phytoplanktonic organisms, Bacillariophyceae and Zignematophyceae stood out with greater richness and abundance associated with reference sites and Euglenophyceae associated with higher nutrients concentrations sites. The differences in the composition and structure of the phytoplankton community indicated its potential as bioindicator of environmental quality. *S. nidulans* showed high resistance to As(III) and As(V) oxyanions. The EC₅₀ were determined upon exposure to As(V) = 2,642.97 mg/l and As(III) = 6.64 mg/l. In the present study, it was found that cyanobacteria are resistant to very high concentrations of As compared to those found in the sampled points. As(III) seems to easily interact with cell wall components than As(V), which results in greater cell penetration. Using XAFS technique, it was demonstrated that sulfhydryl groups are the primary binding site of As(III), forming As(GS)₃ complex. In long-term exposure (30 days) to As(III) and As(V), *S. nidulans* reduced As(V) to As(III) and produced organic compounds of As, indicating the involvement of *S. nidulans* in As biogeochemistry and

its potential to be tested as an agent of arsenic biotransformation. Thus, contributions were presented to clarify the dynamics of As penetration and intracellular behavior in *S. nidulans*, a cyanobacteria strain isolated from a site contaminated with As and other toxic elements.

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a atividade de mineração é um setor de grande relevância, no qual o estado de Minas Gerais contribui com grande parte (41%) do valor da produção mineral do país (Anuário Mineral Brasileiro, 2010). Neste Estado, existem grandes áreas entorno de minas em pleno funcionamento, ou já descomissionadas, nas quais se observa a contaminação do solo e das águas por metais pesados (Figueiredo, et al., 2007). Desta forma, os elementos que permaneciam em depósitos entram em contato com os diversos níveis da cadeia trófica, causando problemas ecológicos importantes, como a biomagnificação (Jordão, et al., 1996; Amado-Filho et al., 2008).

Entre todos os elementos disponibilizados pelo processo da drenagem de minas, o semimetal arsênio (As), é um dos mais tóxicos, razão pela qual este elemento vem recebendo especial atenção das autoridades governamentais, com a adoção de limites mais restritivos para sua concentração em água potável. O limite máximo permitido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente é de 10 µg/L, para água potável, e de 33 µg/L para águas classe III (Resolução 357, CONAMA).

O Quadrilátero Ferrífero, no Estado de Minas Gerais, é uma das principais áreas onde se observa a contaminação por As, relacionada à intensa atividade de mineração de ouro em áreas com formação geológica rica em As (Matschullat, 2000). Nesta região, alguns locais utilizam água subterrânea, proveniente de nascentes ou de minas abandonadas, para o abastecimento humano. Em algumas minas auríferas subterrâneas e nascentes das regiões de Ouro Preto e Mariana, foram quantificadas concentrações variando de 2 a 2980 µg/l para As total. Em alguns locais amostrados na mina da Passagem, município de Mariana, foi encontrado o arsenito [As(III)], a espécie química mais tóxica do As, em concentrações de até 86 µg/l (Borba et al., 2004), o que torna a água imprópria para o consumo.

A toxicidade do As é conhecida há muitos séculos. Em 1879, a alta incidência de câncer de pulmão em trabalhadores das minas na Saxônia foi atribuída ao As inalado. Alguns anos depois, o câncer de pele foi registrado em pacientes tratados com medicamentos contendo As. A evidência de que a ingestão deste semimetal na água poderia causar câncer de pele foi confirmada na década de 30, na Argentina. Desde então, as consequências prejudiciais da exposição crônica ao As vem sendo documentadas em vários outros países, como Taiwan, Chile, México, China, Índia e Bangladesh (Banerjee, 2009; Matschullat, 2000).

Vários pesquisadores registraram consequências da atividade de mineração tais como a intoxicação de animais e a redução da biodiversidade de algas, peixes, macroinvertebrados em cursos d'água a jusante de minas. Concentrações elevadas de metais podem ser

encontradas mesmo em grãos e vegetais cultivados em solos contaminados por rejeitos de minas (Zhuang et al., 2009), uma situação preocupante, devido aos efeitos tóxicos para a saúde humana.

A toxicidade do arsênio está amplamente relacionada à sua espécie química. É um consenso que o As(III) é mais tóxico do que o arseniato [As(V)] para animais (Petrick et al., 2000). Porém, para microalgas e cianobactérias a toxicidade do arsênio varia grandemente com o número de oxidação e com a espécie estudada (Bhattacharya & Pal, 2010; Levy et al., 2005).

Foi demonstrado, em condições de laboratório, que diferentes grupos de microalgas e cianobactérias são capazes de tolerar o arsênio e incorporá-lo em compostos orgânicos. Além disto, de acordo com Shaheen et al., 2007, cianobactérias mostraram-se eficientes na remoção de arsênio de solo contaminado, coletados em áreas de mineração. Portanto as cianobactérias formam um interessante grupo de micro-organismos para se estudar os processos que levam à desintoxicação por As.

Considerando a contaminação por As em águas superficiais e a necessidade de investigar a interação deste semimetal com as cianobactérias, este estudo teve por objetivo monitorar as concentrações de metais tóxicos em áreas no entorno de indústrias de mineração, bem como coletar e isolar organismos fitoplanctônicos nestas áreas, testar sua capacidade de absorção dos oxiânions As(III) e As(V), bem como avaliar a capacidade de biotransformação destas espécies químicas pelas cianobactérias. Estes objetivos foram trabalhados em etapas. Inicialmente, foi avaliado o grau de contaminação ambiental por arsênio e outros metais tóxicos em áreas de mineração no Estado de Minas Gerais (Brasil). Nestas áreas, amostras de água foram coletadas e em laboratório foi realizado o isolamento de cepas de cianobactérias e microalgas. Vários representantes de cianobactérias das ordens Nostocales (*Nostoc* spp., *Scytonema* sp.), Oscillatoriales (*Phormidium* cf *tergestinum*, *Phormidium* *ambigum*, *Phormidium* cf *inundatum*, *Phormidium* *autumnale*, *Pseudanabaena* *minima*, *Pseudanabaena* *limnetica*, *Geitlerinema* cf *amphibium*) e Chroococcales (*Synechococcus* *nidulans*) foram obtidos, além de microalgas (Chlorophyta) como *Chorella* *vulgaris* e *Stigeoclonium* *tenue* (anexo 1). Selecionou-se a cepa de *S. nidulans* para os experimentos subsequentes por sua fácil homogeneização em meio de cultivo e ausência de bainha mucilaginosa, que poderia atuar como uma barreira para o contato do As com as células. Foram determinadas as concentrações de As(III) e As(V), que causam inibição do crescimento em 50% (CE₅₀). Foi investigada a interação do As(III) e As(V) com a glutatona (GSH), tendo em vista que esta é uma molécula chave para a imobilização do arsênio intracelularmente. A absorção do arsênio e especiação foi analisada em culturas de *S. nidulans*

após 30 dias de exposição ao As(III) e As(V) utilizando-se as técnicas de Espectroscopia de Absorção de Raios X (XAFS) e Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (HPLC-ICP-MS).

Referências:

Amado-Filho, G. M., Salgado, L. T., Rebelo, M. F., Rezende, C. E., Karez, C. S., Pfeiffer, W. C., 2008. Heavy metals in benthic organisms from Todos os Santos Bay. Brazil. *Braz. J. Biol.*, 68 (1), 95-100.

Banerjee N., Banerjee S., Sen R., Bandyopadhyay A., Sarma, N., Majumder, P., Das J. K., Chatterjee, M., Kabir, S., Giri, A. K., 2009. Chronic Arsenic Exposure Impairs Macrophage Functions in the Exposed Individuals. *J. Clin. Immunol.* (29), 582–594.

Bhattacharya, P., Pal, R., 2010. Response of cyanobacteria to arsenic toxicity. *J. Appl. Phycol.* 23, 293-299.

Borba R. P., Figueiredo B. R., Cavalcanti J. A., 2004. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). *Rev. Esc. Minas*, 57 (1), 45-51.

Anuário Mineral Brasileiro 2010. Departamento Nacional de Produção Mineral. Brasília: DNPM, 2010.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 357, de 17 DE Março de 2005.

Figueiredo, B. R., Borba, R. P., Angélica, R. S., 2007. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environ. Geochem. Health* 29, 109–118.

Jordão, C. P., Pereira, J. C., Brune W., Pereira J. L., Braathen P. C., 1996. Heavy Metal Dispersion from Industrial Wastes in the Vale Do Aço, Minas Gerais, Brazil. *Environ. Technol.* 17 (5), 489 – 500.

Levy, J. L., Stauber, J. L., Adams, M. S., Maher, W. A, Kirby, J. K., Jolley, D. F., 2005. Toxicity, biotransformation, and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella* sp. and *Monoraphidium arcuatum*). *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (10), 2630-2639.

Matschullat, Jörg. (2000). Arsenic in the geosphere: a review. *Sci. Tot. Environ.* 249, 297- 312.

Petrick, J.S., Ayala-Fierro, F., Cullen, W.R., Carter, D.E., Vasken Aposhian, H., 2000. Monomethylarsonous acid [MMA(III)] is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 163, 203-207.

Shaheen, R., Mahmud, R., & Sen, J. 2007. A study on arsenic decontaminating cyanobacteria of an arsenic affected. *J. Soil. Nature*, 1, 23–29.

Zhuang P., McBride M. B., Xia H., Li N. & Li Z., 2009. Health risk from heavy metals via consumption of food crops in the vicinity of Dabaoshan mine, South China. *Sci. Tot. Environ.* V. 407 (5) 1551-1561.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Arsênio

O arsênio (do latim, *arsenium*) é um elemento químico de símbolo As que pertence ao grupo dos semimetais, localizado na coluna 15 da tabela periódica, juntamente com o nitrogênio, fósforo, antimônio e bismuto. Na forma de As não carregado (As^0), seus 33 elétrons estão distribuídos em número de 2, 8, 18 e 5, respectivamente nas camadas K, L, M e N, com estrutura eletrônica dos orbitais escrita como $1s^2, 2s^2, 2p^6, 3s^2, 3p^6, 3d^{10}, 4s^2, 4p^3$. Nesta configuração, o As assume estrutura cristalina trigonal (figura 1) sendo que cada átomo compartilha os elétrons de valência 4p com outros três átomos de As vizinhos (Henke e Hutchinson, 2009).

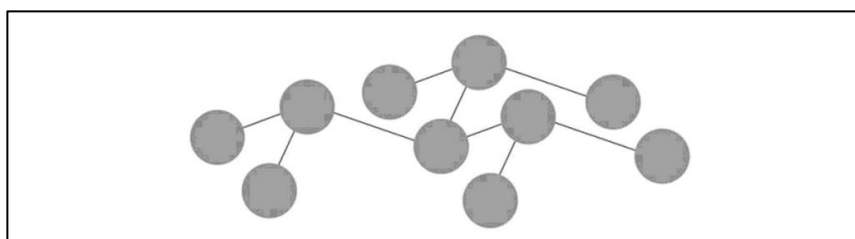


Figura 1: Estrutura trigonal piramidal do arsênio cinza elementar (As^0). Cada átomo de As compartilha seus elétrons de valência com três outros átomos de As formando ligações covalentes. Fonte: Henke e Hutchinson, 2009.

Os estados de valência mais comuns são: -3, 0, +3 e +5 (Smedley and Kinniburgh, 2002). A valência +3 ocorre quando o As se liga covalentemente a não-metais (oxigênio ou enxofre), e três elétrons do orbital 4p são mais fortemente atraídos pelos átomos vizinhos. Quando os elétrons de ambos os orbitais 4s e 4p participam de ligações covalentes com oxigênio, o As assume valência +5. O tamanho do raio atômico do As depende do seu estado de oxidação e do número de átomos vizinhos (número de coordenação). Quando os elétrons de valência são removidos de um átomo, o raio atômico diminui em consequência da perda dos elétrons e também porque os prótons atraem mais fortemente os elétrons para o núcleo (Thomas et al., 1990; Henke e Hutchinson, 2009).

Existe uma grande variedade de compostos de arsênio na natureza. Podem ser encontradas tanto moléculas orgânicas, onde o As se encontra ligado ao carbono, quanto inorgânicas com o As ligado a outros elementos tais como Fe, S, O. Compostos orgânicos de As (Figura 2) são produzidos por atividade biológica geralmente em águas superficiais significativamente impactadas por poluição industrial. As formas mais comuns de As dissolvido ocorrem com valência +3 e +5, preferencialmente ligado ao oxigênio formando arsenito

[As(III)] e arseniato [As(V)]. O primeiro predomina em águas subterrâneas, o segundo em águas superficiais (Smedley e Kinniburgh, 2002; Amini et al., 2008).

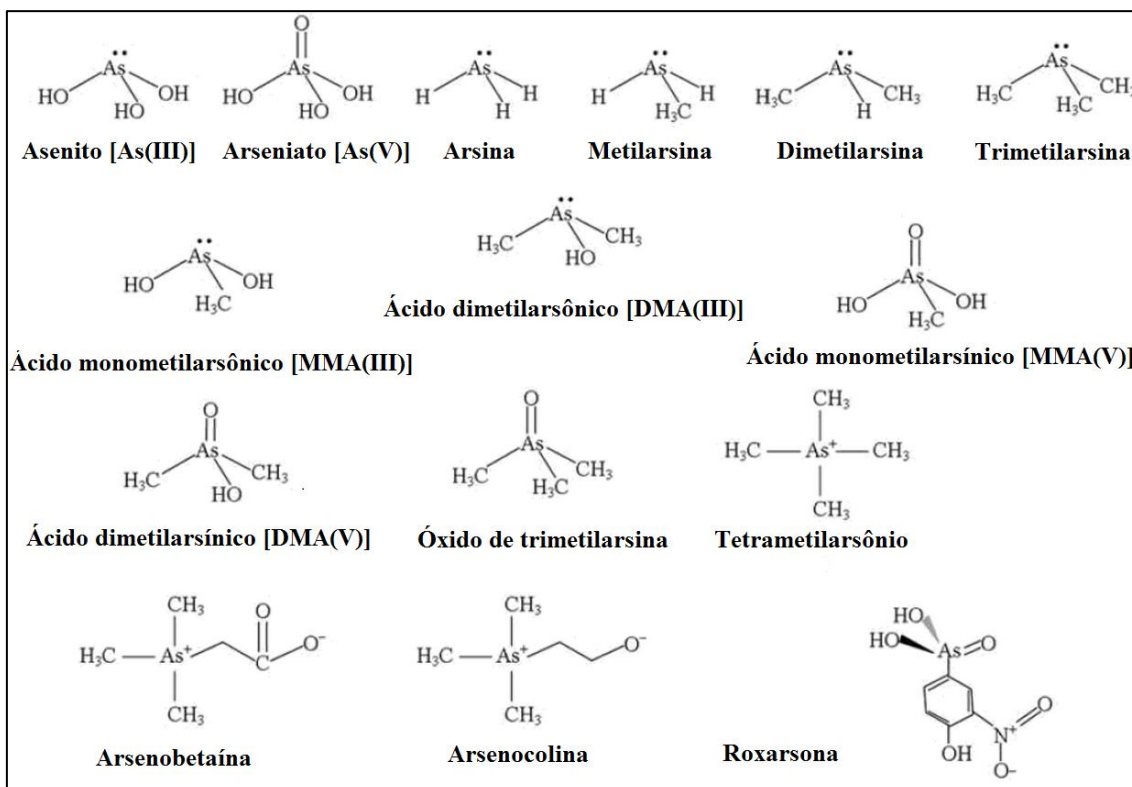


Figura 2: Alguns compostos de arsênio comuns na natureza. Traduzido de Henke e Hutchinson, 2009.

Dependendo do pH do meio, há predominância da forma molecular ou dos diferentes estados de dissociação: $H_3AsO_3^0$, $H_2AsO_3^-$, HAO_3^{2-} e AsO_3^{3-} para As(III) (Figura 3A) ou $H_3AsO_4^0$, $H_2AsO_4^-$, HAO_4^{2-} e AsO_4^{3-} para o As(V) (figura 3B) (Lu e Zhu, 2010). Em águas ricas em sulfitos e anóxicas, tioarseniato ou tioarsenito podem ser formados, com a substituição de um ou mais átomos de oxigênio pelo enxofre, tais espécies incluem: $HA_3S_6^{2-}$, $H_3As_3S_6^0$, $H_2AsO_3S^-$, $H_2AsS_2O_2^-$ (Henke e Hutchinson, 2009).

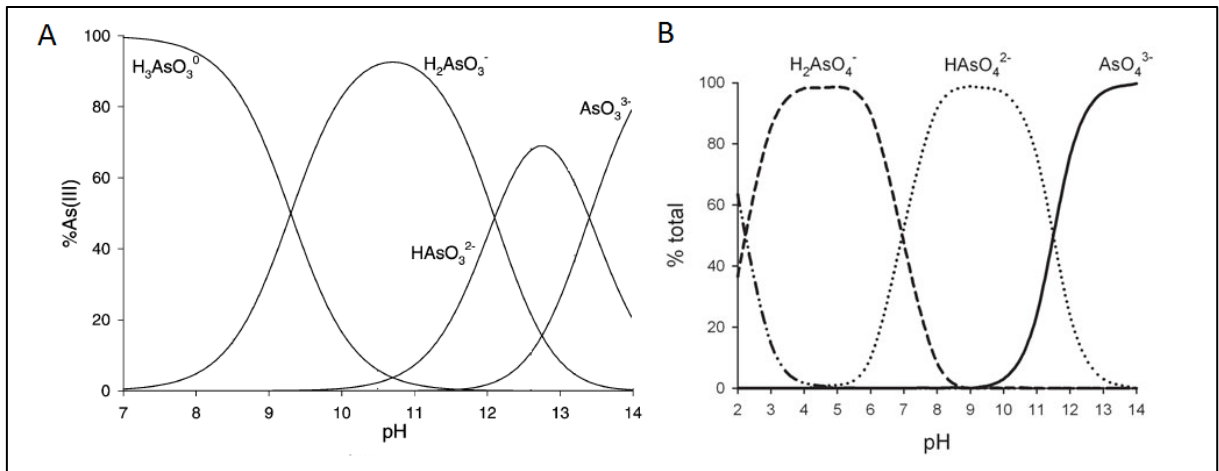


Figura 3: Distribuição de espécies de arsênio em função do pH, a 25 °C e 1 bar. (A): arsenito; (B): arseniato. Fonte (A): Wood et al., 2002 (B): Wolfe-simon et al., 2009.

2. Aplicações do arsênio e contaminação humana

O arsênio possui uma variedade muito grande de aplicações. Nas últimas décadas, tem sido utilizado com sucesso para o tratamento da leucemia promielocítica aguda, ministrando-se doses subletais (Niu et al., 1999). Nos Estados Unidos e outros países é utilizado como aditivo na alimentação de frangos, na forma de roxarsona, para controle de parasitas e melhor aproveitamento da ração, aumentando o ganho de peso. Seu uso está sendo questionado em razão do aumento das fontes de exposição ao arsênio (Nachman et al., 2013; Silbergeld e Nachman, 2008). A exposição humana ao arsênio pode ocorrer também por meio da inalação de As proveniente da combustão de carvão mineral, o que é ainda mais relevante em países como a China, onde a fonte de energia predominante é o carvão, que contém o arsênio entre outros elementos tóxicos (Kang et al., 2011).

Arseniato de chumbo ($PbHAsO_4$) foi amplamente utilizado como inseticida em altas doses em pomares antes da introdução do diclorodifeniltricloroetano (Peryea and Creger, 1994). Inseticidas à base de arsênio foram utilizados até os anos 70 nos Estados Unidos, deixando extensas áreas cultiváveis contaminadas por este semimetal, o que resulta em fitotoxicidade, com prejuízos ao crescimento das raízes das plantas (Quazi et al., 2011). Além de riscos de contaminação pela ingestão de vegetais contaminados (Baig and Kazi, 2012).

Águas subterrâneas naturalmente ricas em arsênio já foram identificadas em países como Argentina, Mexico, China, Hungria e Bangladesh (Smedley and Kinniburgh, 2002). Modelos de predição da contaminação por arsênio baseados em dados geológicos (figura 4)

indicam que a extensão de áreas com lençol freático contaminado pode ser ainda maior (Amini et al., 2008).

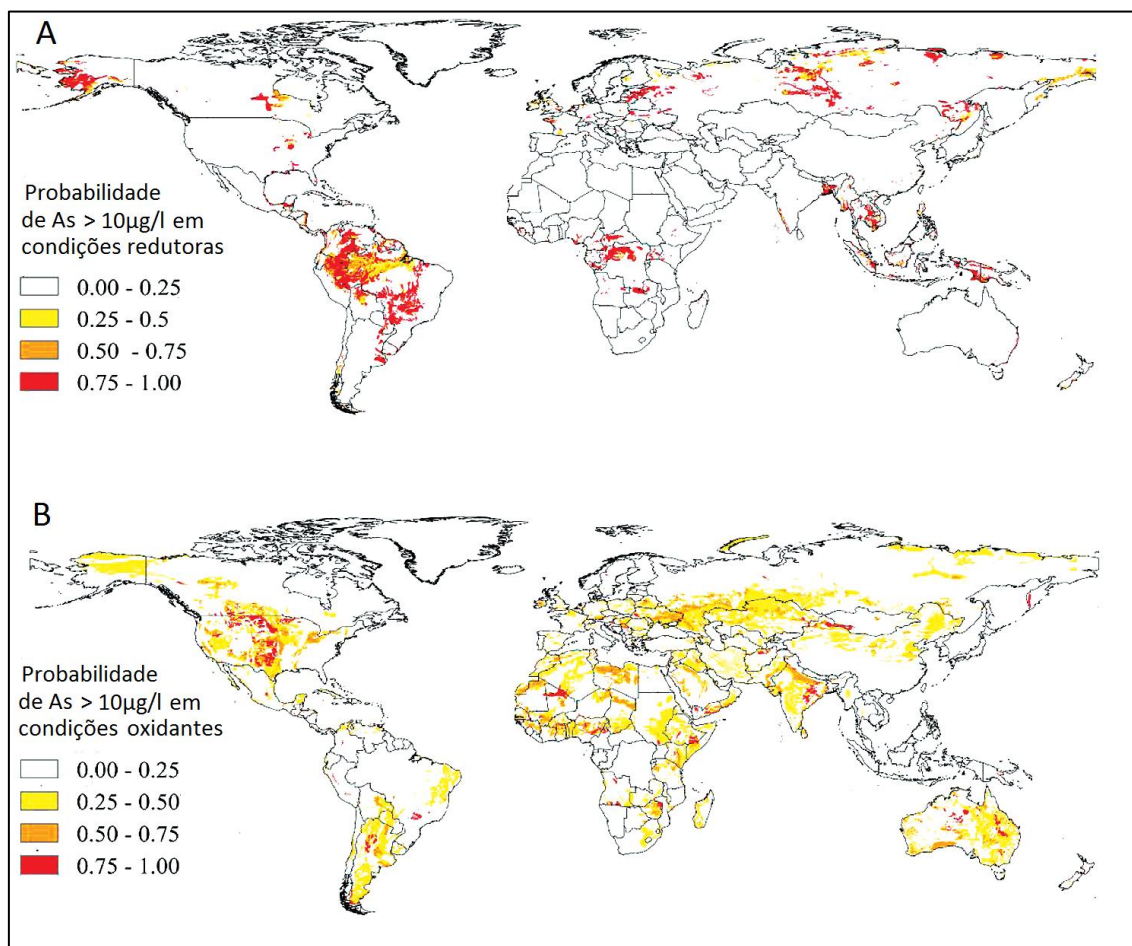


Figura 4. Modelo de probabilidade global de contaminação geogênica por arsênio nas águas subterrâneas para (a) condições redutoras em águas subterrâneas; (b) Condições oxidantes, onde o arsênio se encontra no seu estado oxidado. Os modelos explicaram 77% da variação do arsênio nas regiões redutoras e 68% da variação do arsênio em regiões oxidantes. Fonte: Amini et al., 2008.

Tendo em vista que a maior fonte de exposição humana é por ingestão de água contaminada (Ng, 2005), o risco de exposição ao arsênio nestas regiões é considerável. Em Bangladesh, na década de 80, foi registrada a maior tragédia de exposição humana a este elemento. Poços artesianos foram construídos com o objetivo de evitar a disseminação de doenças de veiculação hídrica, no entanto, não foi feita análise da concentração de metais tóxicos na água, o que resultou na exposição crônica a elevadas concentrações. O diagnóstico do problema ocorreu somente quando sintomas visíveis foram observados, como queratoses na palma das mãos e planta dos pés (Figura 5). Esse acontecimento ficou conhecido como

“doença do pé preto” (Lamm et al., 2013). Outras doenças foram diagnosticadas, como câncer de pele, bexiga, rins, pulmões, hipertensão e doenças cardiovasculares. Entre 2022 poços artesianos amostrados, 35% tinham concentrações $>50 \mu\text{g/l}$ e 8,4% tinham concentrações $>300 \mu\text{g/l}$ (Smith et al., 2000). No intuito de diminuir os riscos de contaminação humana, a Organização Mundial de Saúde (WHO) estabeleceu o limite máximo em água potável de $10 \mu\text{g/l}$, o mesmo valor foi adotado no Brasil (Portaria nº 2.914/2011 M. Saúde, Res. 357/2005, CONAMA).



Figura 5: Queratoses causadas pela exposição ao arsênio. Fonte (A): Smith et al., 2000; (B): www.toxipedia.org/display/toxipedia/Arsenic+Poisoning+in+Bangladesh.

No Brasil, além da ocorrência natural, fontes antropogênicas do arsênio são bem conhecidas, principalmente em razão da exploração de minérios. Destacam-se: o quadrilátero ferrífero na região sudeste em razão da exploração de minas de ouro; o Vale do Ribeira (SP), onde o arsênio ocorre em rejeitos de mineração de Pb e Zn ou de forma natural em rochas e solo; e a região amazônica onde o arsênio está associado com depósitos geológicos de manganês, minerados durante os últimos cinquenta anos (Figueiredo et al., 2007).

A utilização majoritária de águas superficiais pela população brasileira diminui os riscos de exposição. No entanto em locais como o distrito de Passagem de Mariana, estado de Minas Gerais, onde a utilização de água não tratada é mais frequente, verifica-se que grande parte da população (33%) apresenta concentrações de As em amostras de urina na faixa de risco toxicológico, acima de $15 \mu\text{g/l}$ (Mendes, 2012). Algumas avaliações em crianças, coletando-se amostras de urina, foram realizadas em área de mineração de chumbo em São Paulo e Paraná. Nessas áreas concluiu-se que os valores médios de arsênio não justificavam preocupação imediata com a saúde (Sakuma et al., 2010). Por outro lado, na região do quadrilátero ferrífero, 20% das crianças mostraram elevadas concentrações, de forma que efeitos adversos para a saúde não podem ser excluídos em longo prazo (Matschullat et al., 2000).

3. O arsênio nas teias tróficas

A distribuição e especiação de arsênio em sistemas aquáticos são fatores importantes na determinação da sua bioacumulação e transferência trófica. A espécie química predominante em cada nível trófico está relacionada aos processos de desintoxicação e suas particularidades em cada grupo de organismos. Entre procariontes e eucariontes, os passos iniciais das vias de desintoxicação são universais: a espécie inorgânica As(V) é a forma mais abundante na natureza e portanto absorvida pelos organismos. Uma vez absorvida, é transformada em As(III), o segundo passo, é a produção de compostos de As metilados (Rosen, 2002). Outras espécies orgânicas mais complexas são produzidas, dependendo do organismo. Arsenoaçúcares são produzidos por algas marinhas, arsenolipídeos podem ser encontrados em peixes (Rahman et al., 2012). Especialmente em crustáceos, a maior parte do As absorvido é transformado em arsenobetaína, menos tóxica para seus tecidos (Zhang et al., 2013).

Em organismos fitoplanctônicos a absorção do As(V) é fortemente influenciada pela concentração de fosfato (PO_4) no meio de cultivo em razão da similaridade química entre tais compostos (Markley e Herbert, 2009). No interior das células, o As(V) sofre redução a As(III), e pode ser excretado ou metilado, com a formação de dimetilarsênio. Em lagos, foi demonstrado que a extrusão de As(III) ou a metilação predominam dependendo da taxa de crescimento do fitoplâncton e das concentrações de fosfato no meio (Hellweger e Lall, 2004). Esta dinâmica foi proposta com base nas especiações de As ao longo de quatro anos em um lago no Japão (média de 8 nmol/L de As) correlacionando as espécies químicas do As no epilímnio com as florações de algas. Foi observado que no início das florações na primavera, em condições de alta concentração de fosfato (luxuriante) e altas taxas de crescimento, as algas regulam seu sistema de transportadores para absorver grandes quantidades de PO_4 , nesta condição o As(V) é rapidamente absorvido, reduzido a As(III) e excretado. Já a via de metilação é mais lenta e prevalece no verão, correlacionando-se com a estabilização do crescimento e diminuição da absorção de fosfato. Nessas condições, como também ocorre diminuição da absorção de As(V), a via de metilação, que é mais lenta, prevalece sobre a excreção de As(III), ocasionado aumento das concentrações de DMA na água (figura 6) (Hellweger e Lall, 2004).

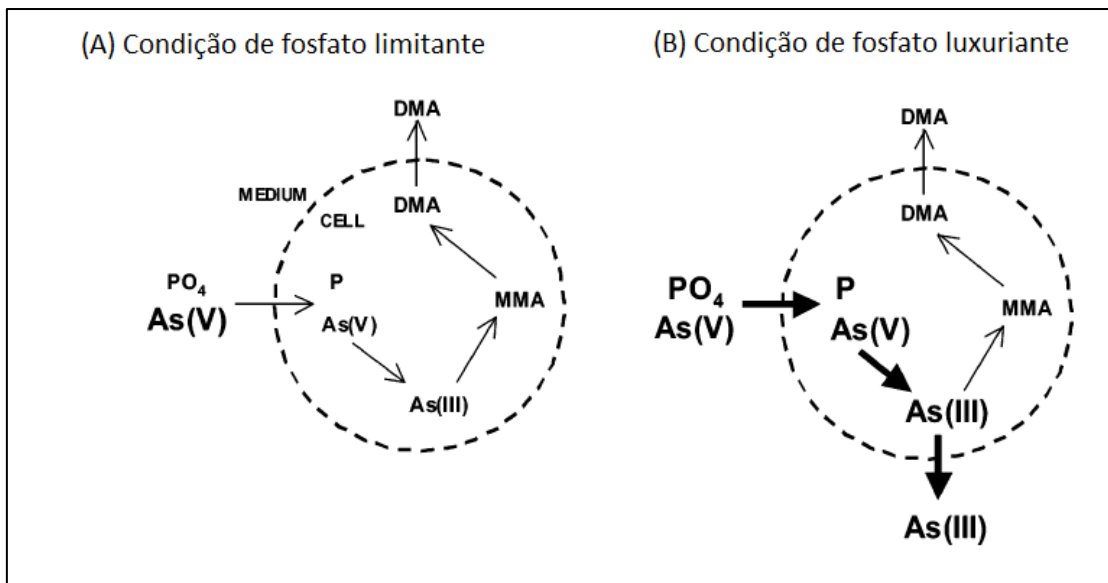


Figura 6: Modelo para a transformação de arsênio pelos organismos fitoplanctônicos. (A) condição de fosfato limitante. (B) condição de fosfato luxuriante. A linha tracejada representa a membrana celular. O tamanho do texto corresponde à concentração de espécies e os tamanhos das setas às taxas de reação. DMA: dimetilarsênio, MMA: monometilarsênio, $As(III)$: arsenito, $As(V)$: arseniato, PO_4 : fosfato. Fonte: Hellweger e Lall, 2004.

A transferência do As entre níveis tróficos foi estudada em rio em uma ilha no sudeste da França, à jusante da deposição de rejeitos, com altos níveis de contaminação. As concentrações de As no fitoplâncton estavam fortemente correlacionadas com a quantidade de As no meio. O padrão de acúmulo de arsênio na cadeia alimentar diminuiu como segue: macroinvertebrados > briófitas > água > tecidos de peixes. É importante observar que o acúmulo de As em macroinvertebrados se diferenciou de acordo com os hábitos alimentares: concentrações maiores foram encontradas em trituradores, e menores em predadores, indicando a importância dos processos detriticos na acumulação do As (Culioli et al., 2009). Em zooplâncton (*Daphnia pulex*) de um lago contaminado (0,25 mg/L) foram quantificados até 35 mg/kg de As no peso seco do animal, sendo que a maior parte do As se encontrava no tubo digestivo em concentração dez vezes mais elevada do que nos tecidos circundantes (Caumette et al., 2012).

4. Cianobactérias

As cianobactérias são procariontes fotossintetizantes e podem ser encontradas em ambientes aquáticos e solos úmidos iluminados. Seus principais pigmentos são clorofila *a* e ficobiliproteínas: ficoeritrina e ficocianina. O último pode ser produzido em grande

quantidade por alguns gêneros, fato responsável por seu nome popular “algas verde-azuladas” (Whitton e Potts, 2012). Possuem várias estratégias de adaptação a condições ambientais adversas, tais como adaptação cromática, a fixação biológica de nitrogênio, a utilização de diferentes fontes de carbono e a capacidade de armazenar nutrientes em inclusões citoplasmáticas (Lee, 2008).

As cianobactérias são classificadas como gram-negativas em razão da presença de uma segunda membrana externa à membrana celular, no entanto possuem também uma espessa camada de peptidoglicano, característica de bactérias gram-positivas. Em alguns grupos de cianobactérias (Chroococcales), é observada a camada S, formada por proteínas de alto peso molecular e glicoproteínas organizadas em um arranjo cristalino envolvendo a membrana externa (figura 7). Uma camada de mucilagem formada por polissacarídeos envolve a camada S, e sua espessura varia com a espécie (Šmarda et al., 2002; Hoiczky and Hansel, 2000). A função da camada S é de adesão, reconhecimento celular e ancoramento de enzimas (Šmarda et al., 2002). Já as funções da bainha de mucilagem incluem a redução de densidade, sequestro e armazenamento de nutrientes, bem como fonte de carbono orgânico (Reynolds, 2007).

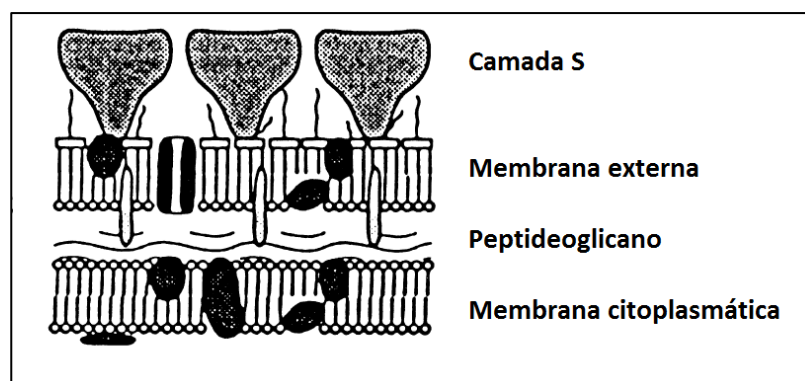


Figura 7: Esquema da parede celular de cianobactérias, mostrando a camada de peptidoglicano, a membrana externa, típica de bactérias gram-negativas e a camada S. A bainha de mucilagem não foi representada. Fonte: Šmarda et al., 2002.

5. Interação do As com cianobactérias

Vários estudos em laboratório têm sido realizados para esclarecer as respostas fisiológicas das cianobactérias sob exposição ao As e para elucidar as vias metabólicas de sua biotransformação. Conhecer como estes micro-organismos participam do ciclo biogeoquímico desse elemento é um passo fundamental para entender sua dinâmica no meio aquático. A biotecnologia tem sido fundamental nesse ramo de pesquisa ajudando a mostrar as mudanças

da expressão gênica sob exposição ao As e as diferentes formas de imobilização intracelular desse semimetal.

As vias de entrada do As(III) em cianobactérias e outros procariontes são as aquagliceroporinas, que consistem de transportadores de membrana para compostos neutros como o glicerol e a uréia, servem também como via de entrada para o As(III) por sua neutralidade em condição de pH fisiológico (Rosen, 2002). Tais canais são comumente encontrados em diversos organismos participando da absorção de As(III) em plantas (Quaghebeur and Rengel, 2005) e leveduras (Maciaszczyk-Dziubinska et al., 2012). Enquanto a absorção do As(III) ocorre via aquagliceroporinas, a similaridade química entre As(V) e fosfato (AsO_4 e PO_4) leva à competição pelos sítios de ligação dos transportadores de fosfato transmembrana. Muitos estudos experimentais demonstraram que altas concentrações de fosfato diminuem a absorção do As(V), aumentando a resistência das cianobactérias a este semimetal (Thiel et al. 1988; Takahashi et al. 2001; Guo et al. 2011).

Muitas pesquisas sobre os efeitos bioquímicos do As tem sido realizadas. Wang et al. (2012), trabalhando com *Microcystis aeruginosa*, demonstraram que um das moléculas mais sensíveis ao As(III) é o fotossistema II (PS II), com 6% de diminuição da evolução de oxigênio após 48 h de exposição a 10 mg/L. A síntese de clorofila foi também inibida, como detectado por meio da intensidade da fluorescência. Mudanças na atividade de enzimas de combate ao estresse oxidativo (ascorbato peroxidase) e concentração de glutatona intracelular foram observadas em *Phormidium* sp. (Bhattacharya e Pal, 2010) após 24h de exposição. Srivastava et al., 2009 concluíram que o sistema enzimático antioxidante de *Anabaena doliolum* é ativado mais intensamente sob exposição ao As(V) do que sob exposição ao As(III), e que essa é uma das razões que explicam a maior toxicidade do As(III) comparado ao As(V).

Em análise proteômica foram observadas diferenças na síntese de 45 proteínas após 15 dias de exposição ao As(V), o que demonstra a capacidade de aclimação da cianobactéria *Anabaena* sp. ao estresse. Tais proteínas parecem participar da regulação da via glicolítica, via das pentoses fosfato e ciclo de Calvin, mantendo a atividade destas vias em condições de estresse. Também foi aumentada a síntese de proteínas de combate ao estresse oxidativo, fitoquelatinas, arseniato reductase e canais de efluxo para o As(III). A expressão de vários genes de forma sincronizada tem um papel central na desintoxicação e sobrevivência sob exposição ao As(V) (Pandey et al., 2012).

Referências:

- Amini, M., Abbaspour, K.C., Berg, M., Winkel, L., Hug, S.J., Hoehn, E., Yang, H., Johnson, C.A., 2008. Statistical modeling of global geogenic arsenic contamination in groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3669–75.
- Baig, J. a, Kazi, T.G., 2012. Translocation of arsenic contents in vegetables from growing media of contaminated areas. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 75, 27–32.
- Bhattacharya, P., Pal, R., 2010. Response of cyanobacteria to arsenic toxicity. *J. Appl. Phycol.* 23, 293–299.
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução CONAMA nº 357 de 03/2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.
- Brasil. Portaria No. 2914/2011, do Ministério da Saúde. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, nº 239, Seção 1, pág. 39. 14 de dezembro de 2011.
- Caumette, G., Koch, I., Moriarty, M., Reimer, K.J., 2012. Arsenic distribution and speciation in *Daphnia pulex*. *Sci. Total Environ.* 432, 243–50.
- Culioli, J.L., Fouquiere, A., Calendini, S., Mori, C., Orsini, A., 2009. Trophic transfer of arsenic and antimony in a freshwater ecosystem: a field study. *Aquat. Toxicol.* 94, 286–93.
- Figueiredo, B.R., Borba, R.P., Angélica, R.S. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environ. Geochem. Health* 29, 109–18, 2007.
- Guo, P., Gong, Y., Wang, C., Liu, X., & Liu, J., 2011. Arsenic speciation and effect of arsenate inhibition in a *Microcystis aeruginosa* culture medium under different phosphate regimes. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1754–9.
- Henke k. R., Hutchison A., 2009. Arsenic Chemistry, in: Kevin Henke (Ed.), *Arsenic: Environmental Chemistry, Health Threats and Waste Treatment*. Jonh Wiley & Sons Ltd, Chichester pp. 9-68.
- Hellweger, F.L., Lall, U., 2004. Modeling the effect of algal dynamics on arsenic speciation in Lake Biwa. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6716–6723.
- Hoiczky, E., Hansel, A., 2000. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J. Bacteriol.* 182, 1191–1199.
- Kang, Y., Liu, G., Chou, C.-L., Wong, M.H., Zheng, L., Ding, R., 2011. Arsenic in Chinese coals: distribution, modes of occurrence, and environmental effects. *Sci. Total Environ.* 412-413, 1–13.
- Lamm, S.H., Robbins, S. a, Zhou, C., Lu, J., Chen, R., Feinleib, M., 2013. Bladder/lung cancer mortality in Blackfoot-disease (BFD)-endemic area villages with low (<150 µg/L) well water arsenic levels: an exploration of the dose-response Poisson analysis. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 65, 147–56.
- Lee, R. E. *Phycology*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 645p.

- Lu, P., Zhu, C., 2010. Arsenic Eh–pH diagrams at 25°C and 1 bar. *Environ. Earth Sci.* 62, 1673–1683.
- Maciaszczyk-Dziubinska, E., Wawrzycka, D., Wysocki, R., 2012. Arsenic and antimony transporters in eukaryotes. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 3527–48.
- Markley, C.T., Herbert, B.E., 2009. Modeling Phosphate Influence on Arsenate Reduction Kinetics by a Freshwater cyanobacterium. *Environ. Model. Assess.* 15, 361–368.
- Matschullat, J., Borba, R.P., Deschamps, E., Ribeiro, B., Gabrio, T., Schwenk, M., 2000. Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. *Appl. Geochemistry* 15, 181–190.
- Mendes, 2012. Avaliação da exposição da população de Passagem de Mariana (MG) aos elementos-traço, com ênfase ao arsênio. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG.
- Nachman, K.E., Baron, P. a, Raber, G., Francesconi, K. a, Navas-Acien, A., Love, D.C., 2013. Roxarsone, inorganic arsenic, and other arsenic species in chicken: a U.S.-Based market basket sample. *Environ. Health Perspect.* 121, 818–24.
- Ng, J.C., 2005. Environmental Contamination of Arsenic and its Toxicological Impact on Humans. *Environ. Chem.* 2, 146.
- Niu, C., Yan, H., Yu, T., Sun, H.P., Liu, J.X., Li, X.S., Wu, W., Zhang, F.Q., Chen, Y., Zhou, L., Li, J.M., Zeng, X.Y., Yang, R.R., Yuan, M.M., Ren, M.Y., Gu, F.Y., Cao, Q., Gu, B.W., Su, X.Y., Chen, G.Q., Xiong, S.M., Zhang, T.D., Waxman, S., Wang, Z.Y., Chen, Z., Hu, J., Shen, Z.X., Chen, S.J., 1999. Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* 94, 3315–24.
- Pandey, S., Rai, R., Rai, L.C., 2012. Proteomics combines morphological, physiological and biochemical attributes to unravel the survival strategy of *Anabaena* sp. PCC7120 under arsenic stress. *J. Proteomics* 75, 921–37.
- Peryea, F.J., Creger, T.L., 1994. Vertical distribution of lead and arsenic in soils contaminated with lead arsenate pesticide residues. *Water, air and soil Pollut.* 297–306.
- Quaghebeur, M., Rengel, Z., 2005. Arsenic Speciation Governs Arsenic Uptake and Transport in Terrestrial Plants. *Microchim. Acta* 151, 141–152.
- Quazi, S., Datta, R., Sarkar, D., 2011. Effects of soil types and forms of arsenical pesticide on rice growth and development. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 8, 445–460.
- Rahman, M.A.A., Hasegawa, H., Lim, R.P., 2012. Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. *Environ. Res.* 116, 118–35.
- Reynolds, C.S., 2007. Variability in the provision and function of mucilage in phytoplankton: facultative responses to the environment. *Hydrobiologia* 578, 37–45.
- Rosen, B.P., 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* 529, 86–92.
- Sakuma, A.M., Capitani, E.M. de, Figueiredo, B.R., Maio, F.D. de, Paoliello, M.M.B., Cunha, F.G. da, Duran, M.C., 2010. Arsenic exposure assessment of children living in a lead mining area in Southeastern Brazil. *Cad. Saúde Pública* 26, 391–398.

- Silbergeld, E.K., Nachman, K., 2008. The environmental and public health risks associated with arsenical use in animal feeds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1140, 346–57.
- Šmarda, J., Šmajš, D., Komrska, J., Krzyžánek, V., 2002. S-layers on cell walls of cyanobacteria. *Micron* 33, 257–277.
- Smedley, P., Kinniburgh, D., 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochemistry* 17, 517–568.
- Smith, A. H., Lingas, E.O., Rahman, M., 2000. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bull. World Health Organ.* 78, 1093–103.
- Srivastava, A.K., Bhargava, P., Thapar, R., Rai, L.C., 2009. Differential response of antioxidative defense system of *Anabaena doliolum* under arsenite and arsenate stress. *J. Basic Microbiol.* 49 Suppl 1, S63–72.
- Takahashi, A., Kawakami, H., Iwakiri, K., & Matsuto, S., 2001. Some characteristics of arsenate transport in a marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. *App. Organ. Chem.*, 15, 291–298.
- Thiel, T., 1988. Phosphate transport and arsenate resistance in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Journal of bacteriology*, 170, 1143–7.
- Thomas, T.D., Siggel, M., Saethre, L.J., 1990. Core-ionization energies and chemical properties. *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena* 51, 417–438.
- Wang, S., Zhang, D., Pan, X., 2012. Effects of arsenic on growth and photosystem II (PSII) activity of *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84, 104–11.
- Whitton B. E., Potts W., 2012. Introduction to Cyanobacteria. In: Brian A. Whitton (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II: their diversity in space and time*. Springer, Dordrecht, pp. 1-14.
- Wolfe-simon, F., Davies, P.C.W., Anbar, A.D., 2009. Did nature also choose arsenic? 8, 69–74.
- Wood, S. A., Tait, C.D., Janecky, D.R., 2002. A Raman spectroscopic study of arsenite and thioarsenite species in aqueous solution at 25 °C. *Geochem. Trans.* 3, 31–39.
- Zhang, W., Wang, W.-X., Zhang, L., 2013. Arsenic speciation and spatial and interspecies differences of metal concentrations in mollusks and crustaceans from a South China estuary. *Ecotoxicology* 22, 671–82.

Capítulo I

Contaminação de cursos d'água por metais tóxicos e pelo semimetal arsênio em áreas de mineração no estado de Minas Gerais (Brasil)

Contaminação de cursos d'água por metais tóxicos e pelo semimetal arsênio em áreas de mineração no estado de Minas Gerais (Brasil)

Resumo

Embora a atividade de mineração seja um dos pilares da economia brasileira, a região do Quadrilátero Ferrífero (QF), Estado de Minas Gerais, sofre consequências diretas dessa atividade, tais como a poluição das águas superficiais por metais tóxicos e arsênio (As). O programa de monitoramento do governo não atende as reais necessidades de avaliação da qualidade ambiental. Inúmeros pequenos riachos não são amostrados e as fontes de contaminação da água são em grande parte desconhecidas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o grau de contaminação por metais e As em pontos localizados em duas bacias hidrográficas: Rio Doce e Rio Das Velhas, em áreas de mineração do QF. As concentrações de metais tóxicos foram determinadas na água e sedimento e as variáveis limnológicas de condutividade, sólidos totais dissolvidos, pH e alcalinidade foram avaliadas. Por meio da análise de componentes principais foi claramente demonstrado que ambos os córregos em área de mineração possuem menor qualidade ambiental em comparação aos pontos de referência. Vários elementos tóxicos foram quantificados (valores máximos abaixo) em concentrações acima do recomendado pela legislação brasileira. Para a bacia do Rio Doce, observou-se a contaminação na água por As (0,09 mg/l) e Mn (2,19 mg/l) e em sedimentos por As (42,1 mg/kg), Cd (2,8 mg/kg), Cu (75,0 mg/kg). Os resultados para a bacia Rio Das Velhas foram: As (0,19 mg/l) e Mn (1,84 mg/l) em água e As (472,8 mg/kg), Cu (1468,4 mg/kg) e Zn (303,8 mg/kg) no sedimento. A maioria da população nessa região recebe água tratada. Os maiores riscos de exposição humana ocorrem em áreas rurais, no entorno dos pontos amostrados, onde as águas superficiais são utilizadas para irrigação das lavouras, dessedentação de animais e em atividades domésticas, expondo a população ao risco de intoxicação crônica. Alguns elementos encontrados no sedimento podem tornar-se fonte de exposição humana por meio da biomagnificação na cadeia trófica ou contato direto com os sedimentos. As alterações ambientais aqui apresentadas alertam para a necessidade de estudos ecológicos para estabelecer os efeitos desses poluentes na saúde humana e seu impacto sobre o ecossistema local. Dada a posição do Brasil como uma potência em termos de riqueza mineral, os impactos dessa atividade sobre a saúde humana e a qualidade ambiental devem ser considerados com maior rigor.

1. Introdução

A atividade de mineração, particularmente de ouro, desloca de seus depósitos naturais diversos metais tóxicos, assim como o semimetal arsênio. Além dos riscos ocupacionais, a contaminação do solo e da água do entorno de minas destaca-se pelas suas possíveis consequências à saúde pública.

Minas Gerais, estado situado na região central do Brasil, é o estado mais rico em reservas minerais, particularmente de ferro e ouro, representando 41% da produção mineral do país (Anuário Mineral Brasileiro, 2010). O estado ficou conhecido pela abundante extração de ouro que remonta ao período colonial. Como consequência, extensas áreas de mineração de ferro e outros metais são afetadas pela degradação decorrente de rejeitos minerais.

Na região central do estado, há uma concentração de jazidas de minério de ferro que levaram à distinção de uma área conhecida como quadrilátero ferrífero (QF). Esta área integra 35 municípios abrangendo as bacias do Rio Das Velhas e Doce e sua população é estimada em 4.135.951 pessoas (IBGE, 2010). No século XIX, esta região foi extensivamente explorada por atividades de mineração de ouro, conseqüentemente, ainda hoje existem passivos abandonados não identificados bem como fontes de contaminação (Cesar et al., 2011). Outro importante recurso do QF são suas reservas hídricas de onde é captada a água para abastecimento público de uma grande região do estado, incluindo a capital. Por esta razão, a identificação de minas abandonadas e seus passivos é um desafio e ao mesmo tempo uma das prioridades para as autoridades ambientais no Estado de Minas Gerais.

Somente em 1980, as primeiras iniciativas de aplicação de leis com maior controle ambiental foram adotadas. A atual legislação brasileira exige o planejamento de recuperação de áreas degradadas (PRAD), visando o adequado manejo do processo extrativo de forma a proteger a saúde humana e a biodiversidade. No entanto, a efetiva fiscalização e controle dessas atividades ainda são insuficientes. Os órgãos responsáveis, tanto na área ambiental como mineral, muitas vezes não têm recursos humanos e/ou financeiros suficientes para assumir a fiscalização efetiva. Nenhum monitoramento da saúde da população exposta é realizado de forma sistemática.

Diversas cidades se desenvolveram no entorno e em função das áreas de mineração as quais empregavam direta ou indiretamente grande parte da população local. A desativação de minas, além dos aspectos ambientais, levou a ciclos migratórios da população ou à sobrevivência a partir de outras atividades econômicas como a agricultura e pecuária de subsistência, com consequências sociais importantes. Essa população permaneceu nos

arredores das antigas áreas de mineração onde a contaminação do solo e o carreamento pela água dos metais tóxicos constituem um risco à saúde. A contaminação da água é particularmente importante já que usualmente é utilizada na forma bruta para a irrigação de culturas e dessedentação animal. É conhecido que concentrações elevadas de metais podem ser encontradas mesmo em grãos e vegetais cultivados em solos contaminados por rejeitos de minas (Zhuang et al., 2009), uma situação preocupante, devido aos efeitos tóxicos para a saúde humana.

São registrados eventos de exposição crônica em diversos países (Banza et al., 2009; Hajalilou et al., 2011; Hinwood et al., 2004; Matschullat et al., 2000). Destacam-se a contaminação por arsênio, frequentemente encontrado em jazidas de ferro e ouro na forma de arsenopirita. Esse semimetal pode ser disponibilizado na forma de arseniato e arsenito, e podem ser difundidos por áreas extensas além dos limites da mineração. A toxicidade deste elemento é conhecida há muitos séculos. Em 1879, a alta incidência de câncer de pulmão em trabalhadores das minas na Saxônia foi atribuída ao As inalado (Smith et al., 2002). Além desse semimetal, é comum a presença de metais tóxicos como o cádmio e o mercúrio, principalmente nas minas de ouro (Cesar et al., 2011).

As fontes de contaminação ambiental por cádmio são principalmente as deposições atmosféricas provenientes de atividades industriais, atividades de mineração e a aplicação de fertilizantes e lodo de esgoto contendo cádmio, que levam à sua contaminação e bioacumulação em cereais e vegetais cultivados (Järup and Åkesson, 2009).

Com o aumento da demanda por metais em todo o mundo e a expansão do setor de mineração (Cabral Junior, 2008) vem aumentando a disponibilidade de metais tóxicos no ambiente, contaminando cursos d'água (Hatjeet al., 1998; Figueiredo et al., 2007). Assim, os elementos que permaneciam em depósitos geológicos entram em contato com os diversos níveis da cadeia trófica, causando problemas ecológicos, como a biomagnificação na cadeia trófica (Jordão, et al., 1996; Amado-Filho et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi avaliar o grau de contaminação por metais tóxicos e pelo semimetal arsênio em coleções de águas nas bacias do rio Doce e rio Das Velhas que drenam o quadrilátero ferrífero. Para isso, avaliou-se as concentrações de metais tóxicos em água e sedimento em períodos hidrológicos de chuva e de seca em áreas no entorno de empreendimentos de mineração, comparando sua qualidade ambiental com áreas de referência. O conhecimento das fontes de contaminação constitui o primeiro passo para prevenir a exposição humana a elementos tóxicos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Área de estudo e amostragem

Dois pontos de coleta em cada uma das bacias do Rio Das Velhas e rio Doce no estado de Minas Gerais foram amostrados, um representando área de referência e outro área impactada. A referência na bacia do Rio Das Velhas foi o ponto de captação de água para abastecimento público da COPASA, Mutuca (M1) (20° 00' 37" S; 43° 58' 08" L) e o ponto impactado, o córrego da Mina (M2) (19° 58' 74" S 43° 49' 25" L), em Nova Lima-MG, próximo a uma planta de tratamento de minério de ouro. Nesses pontos foram realizadas coletas semanais durante o período de chuva de 2010, e períodos de seca e chuva de 2011.

O ponto de referência (P1) na bacia do Rio Doce, sub-bacia do Ribeirão Conceição, é constituído por pequeno curso d'água que nasce em uma mata de propriedade particular (19°59'12"S; 45°29' 27" L). O ponto adotado na área impactada (P2) 19°58'15"S 43°27' 50" L situa-se em um córrego em Barra Feliz, distrito de Santa Bárbara. As coletas foram realizadas durante os períodos de chuva e de seca de 2011, sendo de no mínimo quatro coletas em intervalos semanais por cada período.

2.2. Variáveis físicas e químicas

As variáveis: pH, condutividade elétrica (μScm^{-1}), alcalinidade total e sólidos totais dissolvidos (TDS-mg/L) foram obtidas por medidas *in situ*, com o auxílio de uma sonda (Hydrolab).

2.3. Quantificação de metais na água e no sedimento

A quantificação de metais dissolvidos (Fe, Mn, Cu, Pb, Zn, Ni, Cr, Cd e Al) e do semimetal As foi realizada em amostras de água e sedimento nos pontos amostrados. As amostras de água foram coletadas, filtradas em filtro de fibra de vidro (S e S GF52/C) e fixadas com ácido nítrico 50%, adicionado à amostra até o pH de aproximadamente 2 para a análise de metais (Vasconcelos et. al. 2009). Para a quantificação de metais no sedimento, as amostras foram coletadas e peneiradas *in situ*, utilizando-se uma peneira com abertura de 2 mm, e após a secagem em laboratório à temperatura ambiente, foi feita a extração utilizando-se HCl 0,1 N na proporção de 25 ml para 1 g de sedimento, sob agitação por 2 h. O extrato obtido foi filtrado em filtro de fibra de vidro (S e S GF52/C). As determinações foram feitas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) ou

espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS) no laboratório de Análises Químicas do Departamento de Metalurgia (Laq-Demet) - UFMG.

3. Análise de dados

As variáveis físicas e químicas: condutividade, alcalinidade e sólidos dissolvidos foram submetidas ao teste de Tukey, quando os dados foram paramétricos, ou teste F de Fischer quando não-paramétricos. A correlação de Spearman foi utilizada para verificar quais variáveis estão mais correlacionadas com a concentração de As na água utilizando-se as amostras de ambas as bacias. Análise de componentes principais (ACP) foi utilizada para a comparação entre área impactada e não impactada dentro de cada bacia. Para destacar a influência dos períodos hidrológicos de chuva e seca, uma ACP envolvendo todos os pontos amostrados foi realizada. Essa análise permite, de forma global, explorar um grande número de variáveis, indicando quais se destacam quantitativamente. Além disso, evidencia a similaridade entre amostras e elucida o padrão na estrutura de correlação entre variáveis. Para isso, utilizou-se o programa Paleontological Statistic Software package for education and data analysis (PAST), versão 2.16.

4. Resultados

4.1. Variáveis físicas e químicas

A condutividade, alcalinidade e sólidos em suspensão foram avaliados nos quatro pontos amostrados. Os valores obtidos encontram-se representados na figura 1.

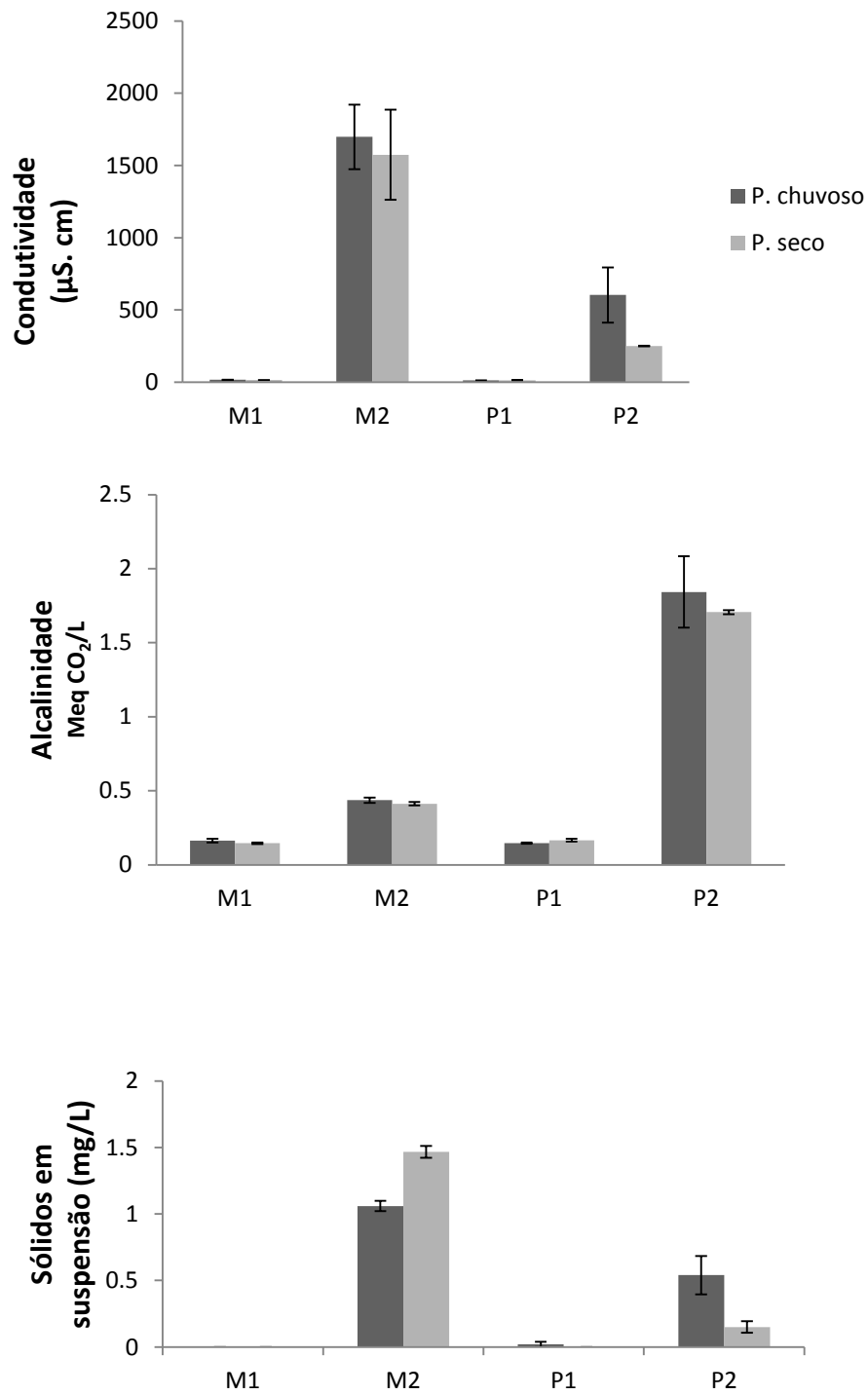


Figura 1: Variáveis físicas e químicas avaliadas nos períodos hidrológicos de seca e de chuva. Barras escuras correspondem ao período de chuvas, barras claras ao período de seca. M1: captação Mutuca (área de referência); M2: córrego da Mina - (área impactada), bacia do Rio Das Velhas. P1: córrego da área de referência, P2: córrego em Barra Feliz (área impactada), na bacia do Rio Doce.

Independentemente do período hidrológico de chuva ou seca, as variáveis: condutividade, sólidos totais dissolvidos e alcalinidade diferiram claramente entre área impactada e a de referência, em ambas as bacias, já o pH permaneceu próximo da neutralidade, com variação máxima entre 6 a 8 em todos os pontos amostrados.

4.2. Quantificação de metais tóxicos e de As nos pontos amostrados

Um total de 10 metais, além do semimetal As, foram monitorados nas áreas amostradas e comparados aos valores de referência para Classe 3 da Resolução 357, estabelecida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento de acordo com seu potencial para diversos usos. Águas da classe 3 possuem potencial para abastecimento humano após tratamento convencional ou avançado, irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras, pesca amadora, recreação de contato secundário e dessedentação de animais.

Tabela 1: valores médio, máximo e mínimo de metais na água (mg/l) nos pontos amostrados nas bacias do Rio Das Velhas e bacia do Rio Doce.

| | As | Fe | Mn | Cu | Pb | Zn | Ni | Cr | Al | Cd |
|----------------------|--------------|--------------|-------------|-----------------|-----------------|--------------|------------------|------------------|--------------|------------------|
| <i>Ref. Classe 3</i> | <i>0,033</i> | <i>5,0</i> | <i>0,5</i> | <i>0,013</i> | <i>0,033</i> | <i>5,0</i> | <i>0,025</i> | <i>0,05</i> | <i>0,2</i> | <i>0,01</i> |
| Média | 0,02 | 0,30 | 0,67 | <0,01 | <0,05 | 1,9 | <0,004 | <0,002 | 0,02 | <0,002 |
| P1 Máx. | 0,09 | 1,05 | 1,91 | <0,01 | <0,05 | 13,46 | <0,004 | <0,002 | 0,15 | <0,002 |
| P1 Mín. | <0,01 | 0,02 | <0,002 | <0,01 | <0,05 | <0,002 | <0,004 | <0,002 | <0,005 | <0,002 |
| Média | 0,08 | 1,09 | 1,45 | <0,01 | <0,05 | 0,016 | <0,004 | <0,002 | 0,01 | <0,002 |
| P2 Máx. | 0,12 | 3,21 | 2,19 | <0,01 | <0,05 | 0,072 | <0,004 | <0,002 | 0,02 | <0,002 |
| P2 Mín. | 0,05 | <0,003 | 0,68 | <0,01 | <0,05 | <0,002 | <0,004 | <0,002 | 0,005 | <0,002 |
| Média | <0,01 | 0,017 | <0,002 | 0,034 | <0,05 | 0,015 | <0,004 | <0,002 | 0,002 | <0,002 |
| M1 Máx. | <0,01 | 0,06 | <0,002 | 0,16 | <0,05 | 0,08 | <0,004 | <0,002 | 0,02 | <0,002 |
| M1 Mín. | <0,01 | <0,003 | <0,002 | 0,01 | <0,05 | <0,002 | <0,004 | <0,002 | <0,005 | <0,002 |
| Média | 0,061 | 0,63 | 0,6 | 0,08 | <0,05 | 0,052 | 0,01 | 0,002 | 0,054 | <0,002 |
| M2 Máx. | 0,193 | 6,58 | 1,84 | 0,21 | <0,05 | 0,21 | 0,065 | 0,016 | 0,31 | 0,005 |
| M2 Mín. | 0,03 | 0,18 | <0,002 | <0,01 | <0,05 | <0,002 | <0,004 | <0,002 | <0,005 | <0,002 |

Valores em mg/l. P1: ponto de referencia e P2: ponto impactado na bacia do Rio Doce.

M1: ponto de referencia, M2 – ponto impactado, bacia do rio das Velhas. Valores de referência para a classe 3 da resolução 357 – CONAMA encontram-se em itálico.

Vários elementos estiveram presentes em concentrações mais elevadas que as estabelecidas para classe 3 (tabela 1). Entre as áreas de referencia, As, Mn e Zn se destacaram em P1, e apenas Cu destacou-se em M1. Em P2 e M2, os elementos As, Mn tiveram médias acima dos valores para classe 3, e permaneceram em concentrações elevadas

independentemente do período hidrológico (figuras 2 e 3). Além destes, destacou-se Cu em M2 (tabela 1).

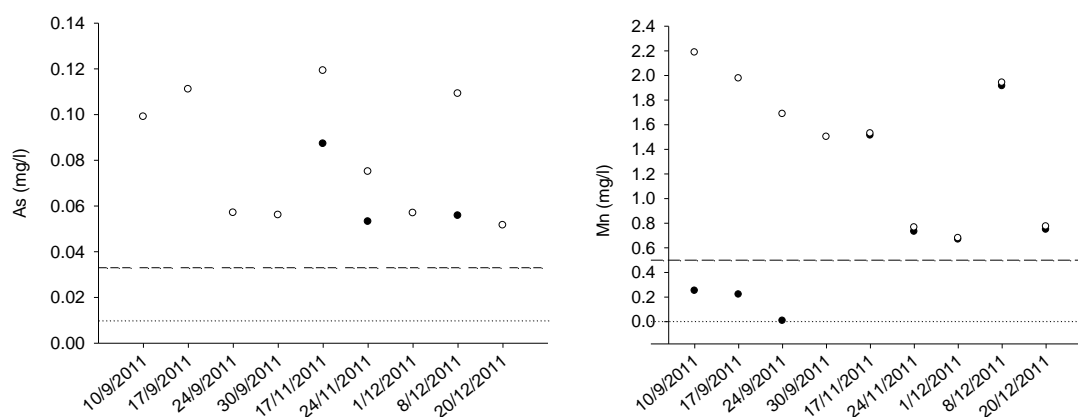


Figura 2: Variações das concentrações de As e Mn na água em P1 –ponto de referencia (cor preta) e P2 – ponto impactado (cor branca), bacia do rio Doce. Linha inferior: limite de quantificação; linha superior: valor de referência (Res. 357 –CONAMA).

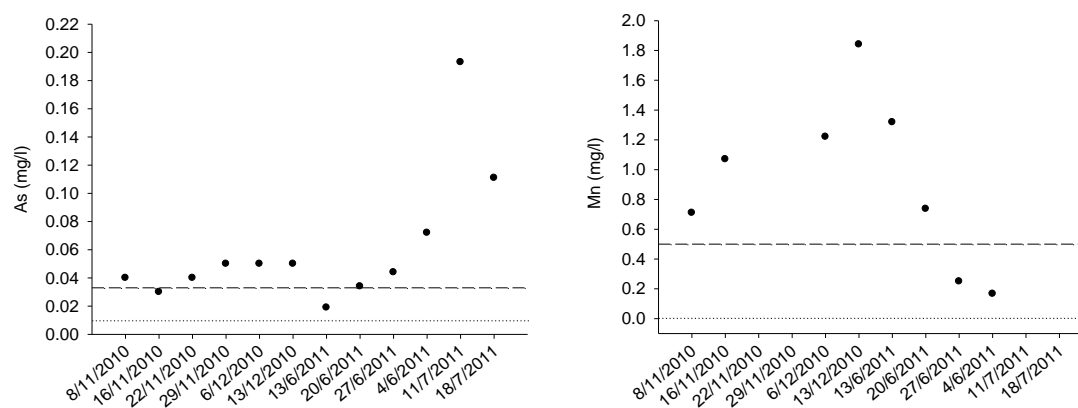


Figura 3: Variações das concentrações de arsênio e Mn na água em M2, ponto impactado, bacia do rio das Velhas. Todos os valores de M1, área de referencia, estiveram abaixo do limite de quantificação. Linha inferior: limite de quantificação; linha superior: valor de referência (Res. 357 –CONAMA).

4.3. Quantificação de metais no sedimento

Observam-se na tabela 2 as concentrações de metais em sedimento. Comparou-se os valores de concentração nas amostras com aqueles estabelecidos na Res. nº 454/2012 do CONAMA, para sedimento dragado.

Tabela 2: Valores médio, máximo e mínimo de metais no sedimento (mg/kg) nos pontos amostrados nas bacias do Rio das Velhas e bacia do Rio Doce.

| | | As | Fe | Mn | Cu | Pb | Zn | Ni | Cr | Al | Cd |
|----------|-------------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|-------------|---------------|--------------|-------------|---------------|-----------------|
| Res. 454 | Nível 1 | 5,9 | - | - | 35,7 | 35 | 123 | 18 | 37,3 | - | 0,6 |
| | Nível 2 | 17 | - | - | 197 | 91,3 | 315 | 35,9 | 90 | - | 3,5 |
| | Méd. | 5,85 | 6329,95 | 1694,3 | 25,4 | 2,07 | 42,84 | 9,02 | 0,72 | 357,21 | 0,15 |
| P1 | Máx. | 42,18 | 11470,8 | 3138,4 | 50,07 | 5,98 | 55,54 | 13,9 | 2,69 | 443,3 | 1,32 |
| | Mín. | <0,25 | 2388,50 | 363,59 | 13,53 | <1,25 | 32,94 | 4,87 | <0,05 | 263,75 | <0,05 |
| | Méd. | 7,61 | 16887,73 | 3038,6 | 32,98 | 1,88 | 43,71 | 10,47 | 1,26 | 160,64 | 0,76 |
| P2 | Máx. | 31,74 | 26281,4 | 5477,6 | 75,05 | 7,57 | 61,84 | 15,3 | 6,08 | 340,15 | 2,79 |
| | Mín. | <0,25 | 3524,05 | 687,06 | 11,16 | <1,25 | 29,03 | 3,67 | <0,05 | 15,28 | <0,05 |
| | Méd. | <0,25 | 933,22 | 334,03 | 47,59 | 3,43 | 38,95 | 2,49 | 0,17 | 376,58 | <0,05 |
| M1 | Máx. | <0,25 | 3325,12 | 803,02 | 165,13 | 8,20 | 77,78 | 20,1 | 1,91 | 785,28 | <0,05 |
| | Mín. | <0,25 | 64,16 | 43,58 | 1,74 | <1,25 | 15,93 | <0,1 | <0,05 | 199,23 | <0,05 |
| | Méd. | 143,44 | 2065,04 | 485,86 | 351,99 | 7,33 | 125,83 | 9,28 | 5,19 | 1780,9 | 0,44 |
| M2 | Máx. | 472,8 | 12350,40 | 1284,4 | 1468,4 | 13,1 | 303,8 | 24,9 | 19,1 | 4143,6 | 3,55 |
| | Mín. | 19,83 | 151,23 | 177,17 | 18,65 | <1,25 | 42,44 | <0,1 | <0,05 | 396,86 | <0,05 |

Valores em mg.Kg⁻¹. P1 – ponto de referencia, P2 – ponto impactado, bacia do rio Doce. M1 - ponto de referencia, M2 – ponto impactado, bacia do rio das Velhas. Valores de referência para os níveis 1 e 2 da resolução 454 – CONAMA encontram-se em itálico.

Entre os pontos amostrados, As apresentou valores abaixo do limite de referência (Res. nº 454/2012 - CONAMA) apenas em M1. Em P1, o valor médio de As esteve próximo aos valores de referencia, com o valor máximo aproximadamente duas vezes maior do que o recomendado para sedimento dragado nível 2, limiar acima do qual prevê-se efeito adverso à biota. Entre os pontos impactados, destacaram-se a média da concentração de Cu e As em M2, respectivamente, duas e oito vezes maior do que aquela de referencia para sedimento dragado nível 2. A concentração média de cádmio em ambos os pontos impactados (M2 e P2) também se mostrou acima do valor de referencia para o nível 1, limiar abaixo do qual prevê-se baixa probabilidade de efeitos adversos à biota. Outros elementos, como Mn foram encontrados em elevada concentração nos pontos impactados, no entanto, estes não possuem valores de referência para sedimento na legislação.

De acordo com a correlação de Spearman, as concentrações de As na água se correlacionam positivamente com a condutividade, alcalinidade e sólidos em suspensão, além de outros metais como Fe e Mn na água e no sedimento. Nas análises de componentes principais, em ambas as bacias houve uma separação das amostras por ponto de amostragem, os quais se encontraram opostos em relação ao componente 1, indicando que o fator impacto

ambiental assume maior importância na diferenciação entre os pontos amostrados (figuras 4 e 5). Na bacia do Rio Doce (figura 4), as variáveis mais associadas ao componente 1, o qual explica (30%) da variação do modelo foram As e Mn na água; e alguns metais no sedimento: Mn, Mg e Fe. Já na área de estudo da bacia do Rio Das Velhas (figura 5), as variáveis mais correlacionadas com o componente 1, que explica 58% da variação, foram as concentrações de As, Mn e Mg na água; e de Cu, Pb, Al e Zn em sedimento.

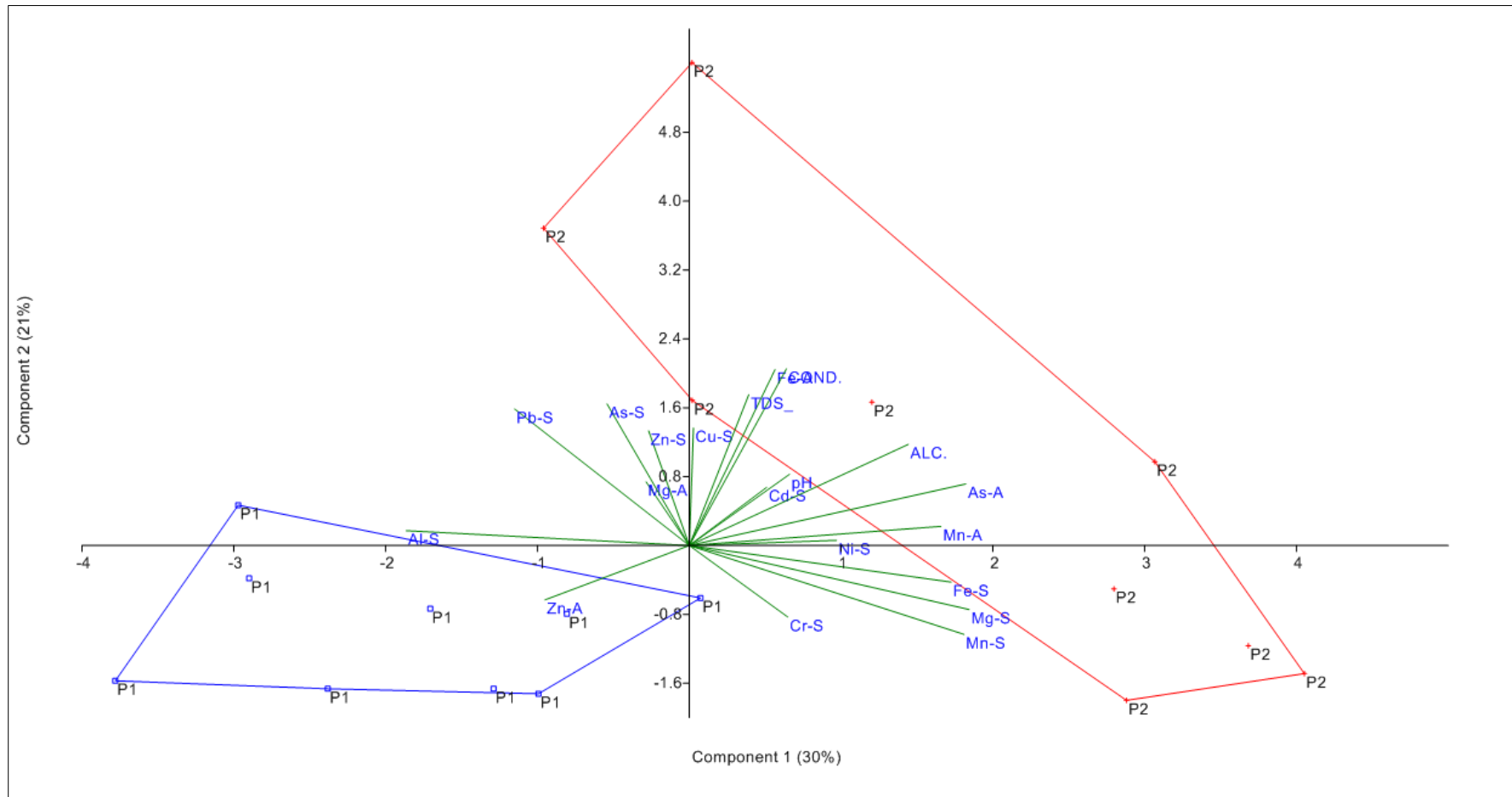


Figura 4: Análise de componentes principais para pontos amostrados na bacia do Rio Doce. P1: ponto de referência, P2: ponto impactado. Metais: As, Fe, Mn, Cu e Zn em água (A); e As, Fe, Mn, Cu, Pb, Zn, Mg, Ni, Cr, Al e Cd no sedimento (S). Variáveis físicas e químicas: pH, alcalinidade, condutividade e sólidos em suspensão (TDS).

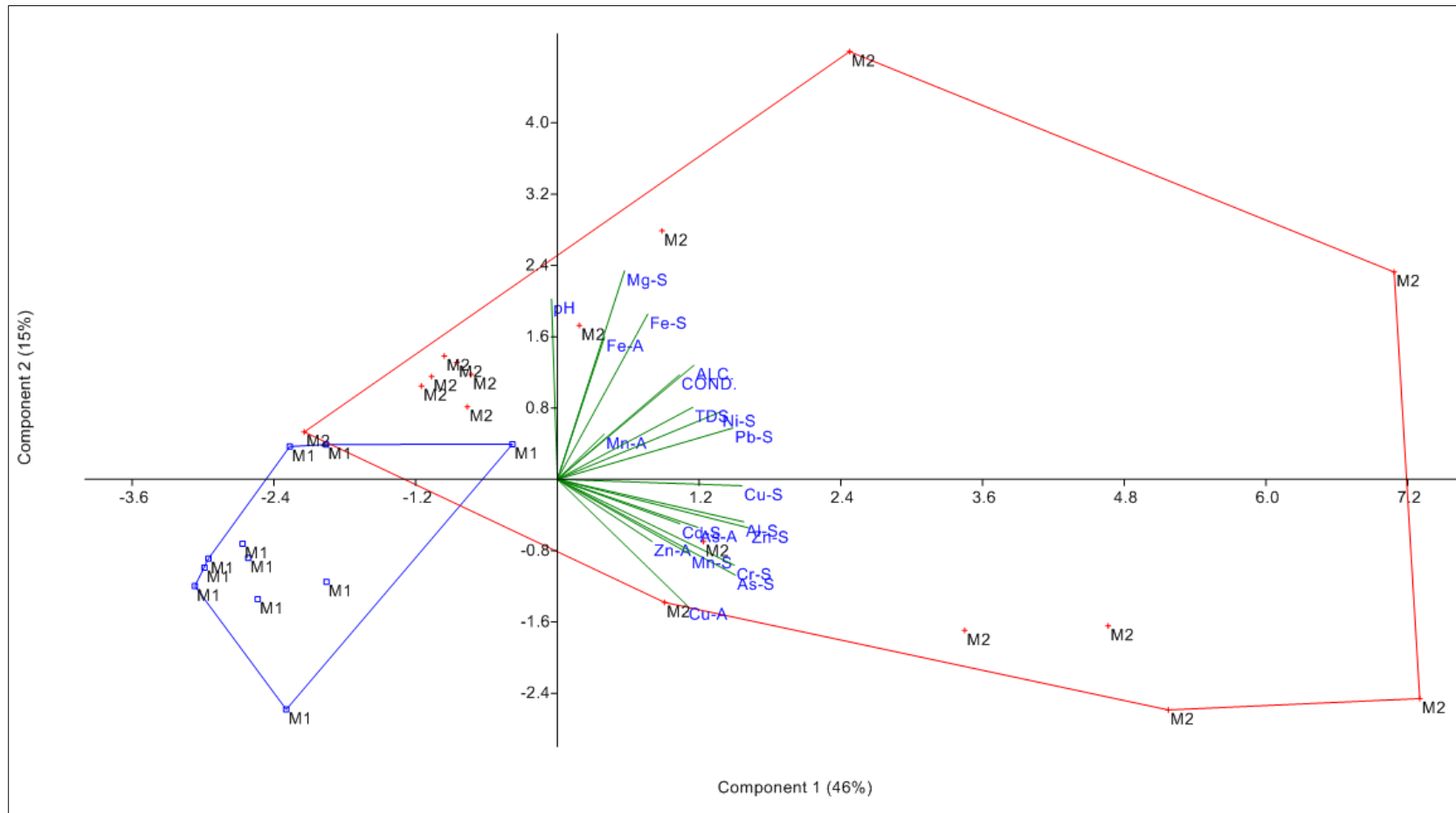


Figura 5: Análise de componentes principais para pontos amostrados na bacia do Rio Das Velhas. M1: ponto de referência, M2: ponto impactado. Metais: As, Fe, Mn, Zn e Mg em água (A) e no sedimento (S): As, Fe, Mn, Cu, Pb, Zn, Ni, Cr, Al, Cd e Mg. Variáveis físicas e químicas: pH, alcalinidade (Alc.), condutividade, total de sólidos dissolvidos (TDS).

De acordo com a ACP realizada para todos os pontos (figura 6), existem diferenças nas variáveis avaliadas entre bacias. Observa-se que na região positiva do componente 1, o qual explica (26%) da variação, encontram-se a maior parte dos pontos referentes à bacia do Rio Das Velhas (M1 e M2), e do lado negativo, a maior parte dos pontos referentes à bacia do Rio Doce (P1 e P2). Destacou-se também a diferenciação entre pontos impactados e de referência, onde a maior parte dos pontos impactados (M2 e P2) se encontram na região positiva do componente 2, com 20% de variação, e os pontos de referencia (M1 e P1) na região negativa. A diferenciação entre bacias foi maior para áreas impactadas e menor para os pontos de referência, o que pode ser visualizado pelo maior distanciamento entre os pontos das áreas impactadas, e maior proximidade entre as amostras de pontos de referencia. A sazonalidade tem efeito significativo sobre as variáveis avaliadas nas amostras, indicado pela proximidade de amostras coletadas em mesmo período hidrológico. Portanto, o fator bacia assume maior importância na diferenciação das amostras, seguido pelo fator impacto ambiental e por último a sazonalidade.

5. Discussão

Nos pontos amostrados no entorno da área de mineração foram encontradas médias mais elevadas de As e outros elementos tóxicos em relação aos pontos de referência, o que demonstra a possível contribuição da atividade de mineração para a contaminação do sedimento e das águas correntes. As principais fontes de As no QF são de origem antropogênica, e relacionados à antiga deposição inadequada de rejeitos de mineração aurífera, bem como a presença de sedimentos ricos em As nos cursos d'água. A contaminação pode ser também de origem natural, pela lixiviação de depósitos de pirita e arsenopirita (Borba et al., 2003). O solo do quadrilátero ferrífero, principalmente nas regiões de Nova Lima e Santa Bárbara é notavelmente enriquecido por As e excede os valores de referência (Deschamps, et al., 2002), podendo atingir até 4.000 mg/kg nas proximidades das minas, enquanto as águas superficiais eventualmente apresentam concentrações a 0,05 mg/l (Figueiredo et al., 2007).

A correlação positiva entre a concentração de As na água e as concentrações Fe pode ocorrer em razão da oxidação de arsenopirita ($AsFeS$) e liberação dos oxianions [(As(III) ou As(V)] e óxido de Fe. Parte do As(V) pode ser retido por precipitação com scorodita ($FeAsO_4 \cdot 2H_2O$) ou por coprecipitação com oxi-hidróxidos de Fe e Mn (Borba et al., 2003). Além do Fe, a presença de As na água esteve correlacionada com Mn. É importante ressaltar que os teores de óxidos de manganês no QF são muito elevados, com a presença de diversos tipos de minerais de Mn (Carvalho-Filho et al., 2011).

O impacto ambiental que ocorre nos pontos amostrados foi claramente demonstrado com a análise de componentes principais, onde variáveis como condutividade, sólidos em suspensão e concentração de metais em sedimento e água assumiram grande importância na distinção entre pontos impactados, indicando menor qualidade ambiental em relação aos pontos de referência. Com a análise envolvendo todos os pontos foi possível verificar diferenças entre bacias, que são resultado de particularidades, como qual elemento tóxico está presente em água e sedimento de cada região. Por exemplo, a contaminação por Cu e As no sedimento foram encontradas em valores elevados em M2 comparados aos demais pontos. À montante desse ponto de coleta funciona uma planta de processamento de minério de ouro, e no Córrego em Barra Feliz (P2), situa-se uma barragem de rejeitos da antiga mina de ouro São Bento, a qual foi reativada recentemente.

Com relação aos valores de referência na legislação brasileira, a área de estudo na bacia do Rio Doce apresentou contaminação por As, Mn e Zn na água e pelos elementos As, Cd e Cu

no sedimento. Resultado semelhante foi observado na bacia do Rio Das Velhas, apresentando contaminação por As, Mn e Cu na água e pelos elementos: As, Cu e Zn e no sedimento.

A contaminação destes ambientes é uma situação preocupante do ponto de vista da saúde pública e ambiental, visto que os pontos amostrados se encontram em distritos com potencial contato direto pela população e utilização doméstica das águas destes córregos. Neste estudo ressalta-se a contaminação da água e/ou do sedimento pelos elementos não essenciais: As e Cd. O fator de maior importância da perspectiva da saúde pública é a biodisponibilidade do As, que é a fração capaz de ser liberada a partir de matrizes ingeridas, como o solo, água e alimentos e entrar no sistema circulatório do organismo onde pode exercer os seus efeitos tóxicos (Caussy, 2003; Baker et al., 2003).

No município de Santa Bárbara, 11.2% dos domicílios utilizam água de poço ou nascente para abastecimento (IBGE 2010). Esta pode ser considerada uma situação de risco de exposição, tendo em vista que a via mais comum de exposição ao As é através do consumo de água contaminada, além da inalação de gases e ingestão de pó (Ng, 2005; Figueiredo et al., 2007). A mobilização do As no tipo de solo do quadrilátero ferrífero é independente de sua concentração e correlaciona-se com outros minérios tais como oxi-hidróxidos de Fe, óxidos de manganês e gibbsita, característicos dessa região (Mello et al., 2006).

O cádmio é tóxico para vários tecidos e sua toxicidade aguda associa-se a edema pulmonar, hemorragias, hepatites fulminantes, injúria testicular e pode levar à morte (Klaassen et. al., 2009), enquanto que a exposição crônica pode causar nefrotoxicidade, osteotoxicidade e imunotoxicidade (Godt et al., 2006; Liu et al., 2009). Os riscos de exposição ambiental de populações humanas ao Cd foi registrado mais tardiamente na história, comparado ao As, quando foi confirmado que a doença conhecida como Itai-itai foi causada pelo consumo de arroz contaminado por cádmio (Kobayashi et al., 2009; Inaba et al., 2005).

Este estudo demonstra contaminação por As nas águas superficiais e no sedimento, além de outros metais de elevada toxicidade, como o Cd em municípios do quadrilátero ferrífero. Um monitoramento ambiental mais efetivo em períodos de tempo menores torna-se necessário visto que há uma grande variação da concentração destes elementos nas águas correntes. É recomendável também o acompanhamento da população local visando a detecção precoce de sintomas de toxicidade. Medidas de prevenção difundidas pelas agências de saúde podem ajudar a reduzir a exposição humana no quadrilátero ferrífero.

6. Referências

- Amado-Filho, G. M., Salgado L. T., Rebelo M. F., Rezende C. E., Karez C. S., Pfeiffer W.C., 2008. Heavy metals in benthic organisms from Todos os Santos Bay, Brazil. *Braz. J. Biol.* 68, 95-100.
- Baker B. J., Banfield, J. F., 2003. Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 139-152.
- Banza, C. L. N., Nawrot, T. S., Haufroid, V., Decrée, S., De Putter, T., Smolders, E., Kabyla, B. I. Luboya O. N., Ilunga A. N., Mutombo A. M., Nemery B., 2009. High human exposure to cobalt and other metals in Katanga, a mining area of the Democratic Republic of Congo. *Environ. Res.*, 109, 745–52.
- Borba R. P., Figueiredo B. R., Matschullat J., 2003. Geochemical distribution of arsenic in waters, sediments and weathered gold mineralized rocks from Iron Quadrangle, Brazil. *Environ. Geol.* 39–52.
- Anuário Mineral Brasileiro 2010. Departamento Nacional de Produção Mineral. Brasília: DNPM, 2010.
- Cabral Junior, M., Suslick, S. B., Obata, O. R., & Sintoni, A., 2008. A mineração no estado de são paulo: situação atual, perspectivas e desafios para o aproveitamento dos recursos minerais. *Geociênc.* 27, 171-192.
- Carvalho Filho, A., Curi, N., Marques, J. J. G. S. M., Shinzato, E., Freitas, D. A. F., Jesus, Elen, A., Massahud, R. T. R., 2011. Óxidos de manganês em solos do quadrilátero ferrífero (MG). *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, 35, 793-804.
- Cesar, R., Egler, S., Polivanov, H., Castilhos, Z., & Rodrigues, A. P., 2011. Mercury , copper and zinc contamination in soils and fluvial sediments from an abandoned gold mining area in southern Minas Gerais State, Brazil. *Environ. Earth Sci.*, 64, 211–222.
- Caussy, D., 2003. Case studies of the impact of understanding bioavailability: arsenic. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 56, 164-173.
- CONAMA, 2012. Resolução No. 454, Conselho nacional do Meio ambiente, Brasília, DF.
- CONAMA, 2005. Resolution No. 357, Conselho nacional do Meio ambiente, Brasília, DF.
- Deschamps, E., Ciminelli V. S.T., Lange F.T., Matschullat, J., Raue B. Schmidt, H., 2002. Solil and Sediment Geochemistry of the Iron Quadrangle, Brazil. *J. Soils Sediments* 2, 216-222.
- Figueiredo, B. R., Borba R. P., Angélica, R. S., 2007. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environ. Geochem. Health* 29, 109-118.
- Godt, J., Scheidig, F., Grosse-siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A., Groneberg, D. A., 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J. Occup. Med.* 6, 1–6.
- Hajalilou, B., Mosaferi, M., Khaleghi, F., Jadidi, S., vosugh, B., Fatehifar, E., 2011. Effects of Abandoned Arsenic Mine on Water Resources Pollution in North West of Iran. *Health Promot. Perspect.*, 1, 62–70.
- Harmer, O., Harper, D. A. T. and Ryan, P. D., 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontol. Elect.* 4: 9 pp.

Hatje, V., Bidone E. D. Maddock, J. L., 1998. Estimation of the Natural and Anthropogenic Components of Heavy Metal Fluxes in Fresh Water Sinos River, Rio Grande Do Sul State, South Brazil. *Environ. Technol.*, 19, 483-487.

Hinwood, A. L., Sim, M. R., Jolley, D., Klerk, N. De, Bastone, E. B., Gerostamoulos, J., Drummer, O. H., 2004. Exposure to inorganic arsenic in soil increases urinary inorganic arsenic concentrations of residents living in old mining areas. *Environ. Geochem. Health*, 27–36.

Inaba, T., Kobayashi, E., Suwazono, Y., Uetani, M., Oishi, M., Nakagawa, H., Nogawa, K., 2005. Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. *Toxicol. Lett.*, 159, 192–201.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística —IBGE. Censo 2010. Cidades.

Järup, L., Åkesson, A., 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Appl. Pharm.* 238, 201–208.

Jordão C. P., Pereira J. C., Brune W., Pereira J. L., Braathen P. C., 1996. Heavy Metal Dispersion from Industrial Wastes in the Vale Do Aço, Minas Gerais, Brazil. *Environ. Technol.*, 17, 489-500.

Klaassen, C. D., Liu, J., Diwan, B. A., 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharm.* 238, 215–220.

Kobayashi, E., Suwazono, Y., Dochi, M., Honda, R., & Kido, T., 2009. Influence of consumption of cadmium-polluted rice or Jinzu River water on occurrence of renal tubular dysfunction and/or Itai-itai disease. *Biol. Trace Elem. Res.*, 127, 257–68.

Liu, J., Qu, W., Kadiiska, M. B. 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 238, 209–214.

Matschullat, Jörg., 2000. Arsenic in the geosphere: a review. *Sci. Total Environ.*, 249, 297-312.

Matschullat, J., Borba, R. P., Deschamps, E., Ribeiro, B., Gabrio, T., Schwenk, M., 2000. Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. *Appl. Geochem.*, 15, 181–190.

Mello, J. W.V., Roy, W. R., Talbott, J. L., Stucki, J. W., 2006. Mineralogy and Arsenic Mobility in Arsenic-rich Brazilian Soils and Sediments. *J. Soil. Sedim* 6, 9-19.

Ng, J. C. 2005. Environmental contamination of Arsenic and its toxicological impacts on Humans. *Environ. Chem.* 2, 146-160.

Parven, N. Bashar M.A. Bioaccumulation of Heavy and essential metals in trophic levels of pond ecosystem. 2009. *J Bang. Acad. Sci.* 33, 131-138.

Smith, A. H., Lopipero, P. A., Bates, M. N., Steinmaus, C. M. 2002. Drinking Water Standards. *Science*, 296, 2145–2146.

Vasconcelos, F. M. ; Tundisi, J. G. ; Matsumuratundisi, T. 2009. Avaliação da Qualidade da Água - Base Tecnológica para a Gestão Ambiental. 1ª. ed. Belo Horizonte: Sociedade Mineira de Engenheiros Agrônomos, 322p.

Zhuang, P., McBride, M. B., Xia, H., Lia, N., Li, Z. 2009. Health risk from heavy metals via consumption of food crops in the vicinity of Dabaoshan mine, South China. *Sci. Total Environ.* 407, 1551-1561.

Capítulo II

A comunidade fitoplanctônica como bioindicadora da qualidade ambiental em riachos de áreas de mineração no quadrilátero ferrífero, Estado de Minas Gerais

A comunidade fitoplanctônica como bioindicadora da qualidade ambiental em riachos de áreas de mineração no quadrilátero ferrífero, Estado de Minas Gerais

Resumo

Métodos ecológicos de avaliação da saúde e integridade dos ecossistemas se tornaram de grande importância diante da crescente contaminação ambiental. Trata-se de métodos susceptíveis a uma grande variedade de agentes estressores, e que fornecerem resultados eficientes. O objetivo deste trabalho foi analisar a composição e estrutura da comunidade fitoplanctônica em áreas de mineração e avaliar o seu potencial de bioindicação da qualidade ambiental. Em pontos impactados e de referência nas bacias dos rios Doce e Rio Das Velhas, amostras de água foram coletadas, e fixadas em solução de lugol acético para análise quantitativa do fitoplâncton. Foram também quantificados os nutrientes nitrogênio e fósforo, e avaliadas a condutividade, alcalinidade e sólidos em suspensão *in situ*. A contagem dos indivíduos foi realizada em microscópio invertido após sedimentação em câmaras de Uthermol de 50 mL. A densidade dos organismos foi expressa em indivíduos por mililitro (ind./mL). Os resultados obtidos para os pontos impactados foram comparados com aqueles de referência da mesma bacia por meio de uma análise de correspondência canônica (ACC). Zygnematophyceae e Bacillariophyceae foram os grupos que mais se diferiram pelo fator de perturbação ambiental, com maiores riqueza e abundância associadas aos pontos de referência e Euglenophyceae associadas a locais com altas concentrações de nutrientes. Com as diferenças em sua composição e estrutura, confirmou-se o potencial da comunidade fitoplanctônica para ser utilizada na bioindicação da qualidade ambiental de corpos d'água em áreas de mineração.

1. Introdução

Nas comunidades aquáticas, a degradação e perda do habitat em consequência do crescimento da população humana mundial são situações cada vez mais frequentes. Os impactos mais comuns são a modificação da bacia de drenagem por atividades diversas, e o aumento da concentração de nutrientes, muitas vezes levando à eutrofização (Prymack e Rodrigues 2001). No entorno de áreas de mineração, ocorrem alterações nos parâmetros físicos e químicos da água, muitas vezes com elevação das concentrações de metais tóxicos. No Brasil, os programas governamentais de monitoramento não abrangem um grande número de pequenos corpos d'água, dificultado a identificação de fontes de contaminação e dispersão de poluentes. Neste contexto, torna-se de grande importância o monitoramento ambiental com amostragens mais frequentes em águas correntes no entorno de minas, para identificar áreas impactadas e subsidiar medidas de recuperação ambiental, e assim, minimizar os danos causados à saúde humana e ao ambiente.

A comunidade fitoplanctônica é constituída por organismos fotossintetizantes que exercem importante papel como produtores primários da zona pelágica em ecossistemas oceânicos ou continentais (Reynolds, 2006). Neste grupo estão presentes diversos microorganismos com grande variedade morfológica pertencentes aos domínios Bacteria (cianobactérias) e Eukarya (microalgas). Além de desempenhar importante papel no ciclo dos elementos (Dodds et al., 2004), a produção primária fornece alimento para os diversos níveis tróficos subsequentes e portanto, as alterações em sua abundância e distribuição podem desencadear alterações em todo o ecossistema. Em razão da contaminação e poluição ambiental terem crescido severamente nas últimas décadas, métodos ecológicos de avaliação de impacto se tornaram de grande importância para avaliação da saúde e integridade do ecossistema (Dokulil, 2003).

Bioindicador pode ser definido como todo parâmetro biológico quali ou quantitativo, medido ao nível de indivíduo, população, guilda ou comunidade, que é efetivamente adequado para indicar condições ambientais particulares que correspondam, por exemplo a um estado estabelecido, uma variação natural ou a uma perturbação do meio (Cairns e Pratt, 1993). As vantagens de se usar indicadores biológicos em relação aos parâmetros físicos e químicos incluem a sua não especificidade, ou seja, são mais susceptíveis a uma grande variedade de estressores, a coleta e identificação são procedimentos de baixo custo econômico e fornecem resultados eficientes (Silva et al., 2008).

As respostas dos organismos aquáticos a poluição por metais ao nível da comunidade (medidas de riqueza, análise multivariada da composição da comunidade) em ecossistemas aquáticos são muito importantes para a avaliação do equilíbrio ecológico na área estudada (Zhou et al., 2008). Entre os organismos fitoplanctônicos, as diatomáceas tem se destacado como bioindicadoras (Fetscher et al., 2014), sendo apropriadas para elaboração de índices de integridade biótica e para a avaliação de riachos afetados por drenagem de minas (Zalack, et al., 2010; Luís et al., 2008).

Do ponto de vista da ecologia aquática, as comunidades bióticas locais devem ser comparadas com comunidades de habitats similares em regiões que não tenham sofrido impactos ambientais, partindo-se do princípio que seja utilizado um local-teste (impactado) em comparação com um local-referência (minimamente impactado ou local-controle) (Moura et al., 2008). Os objetivos deste trabalho foram analisar a composição e estrutura da comunidade fitoplanctônica de corpos d'água em áreas de mineração para verificar seu potencial de bioindicação da qualidade ambiental de riachos, bem como caracterizar as condições físicas e químicas comparando-se áreas impactadas com áreas de referência.

2. Material e métodos

A área de estudo correspondeu a pontos impactados e de referencia situados nas bacias dos rios Doce (P1 e P2), e rio as Velhas (M1 e M2). A descrição desses pontos e a frequência de amostragem foram apresentados no capítulo 1.

Amostras para determinação das concentrações de nitrogênio total (N-total), nitrato (NO_3^-) (Mackereth et al., 1978), nitrito (NO_2^-) (Strickland & Parsons, 1968), amônio (NH_4^+) (Koroleff, 1976), fósforo total (P-total), fosfato (PO_4^-) e silicatos (Golterman & Climo, 1967) foram coletadas diretamente da sub-superfície e armazenadas a -20°C até o momento das análises. Metais tóxicos em amostras de água foram mensurados conforme descrito previamente (capítulo 1).

Para a análise qualitativa da comunidade fitoplanctônica amostras de água foram coletadas posicionando-se a rede de fitoplâncton (abertura de malha de $20 \mu\text{m}$) contra a corrente (Barra Feliz e referência), ou através de arrastes horizontais em área de remanso no Córrego da Mina bem como na região a montante da barragem da captação Mutuca. As amostras foram fixadas *in situ* em formaldeído 8%, na proporção de 1:2 volumes de amostra e armazenadas em frascos de 250 ml. A identificação taxonômica foi realizada, com o auxílio de um microscópio óptico, em nível de gênero/espécie com a utilização de artigos e chaves de identificação. Para análise quantitativa, foram coletados 250 mL de água diretamente da sub-superfície, sendo as amostras fixadas em solução de lugol acético. A contagem dos indivíduos

foi realizada com a utilização de câmera de contagem em microscópio invertido (Zeiss) após sedimentação em câmaras de 50 mL (Utermohl, 1958), no aumento total de 400 X, atingindo-se 400 indivíduos da espécie dominante. A densidade dos organismos foi expressa em indivíduos por mililitro (ind./mL), calculados de acordo com Villafañe & Reid (1995).

2. Análise de dados

As concentrações de amônio e fósforo total foram comparadas com os valores de referência da Res. 357 - CONAMA, para avaliação dos níveis de poluição por nutrientes.

Os taxa de micro-algas e cianobactérias identificados na análise quantitativa foram agrupados conforme o sistema de classes adotado por Bicudo e Meneses, 2006. A riqueza de espécies foi avaliada por meio da curva de acumulação de espécies, utilizando-se o programa PAST, 2.16 (Hammer et al., 2001).

Por meio da análise de correspondência canônica (ACC) verificou-se quais variáveis estão mais associadas à abundância de determinado grupo de algas. Nesta análise, utilizou-se como variáveis ambientais quantitativas a diversidade de espécies (índice de Shannon) e equabilidade (índice J de Pielou), além das concentrações de nutrientes, variáveis físicas e químicas e concentrações de metais tóxicos foram mensurados na água, conforme descrito no capítulo 1.

3. Resultados

As concentrações de nutrientes demonstraram grandes variações semanais. Em P2 (bacia do Rio Doce) durante o período de seca foram encontrados os maiores valores de amônio (figura 1) e fósforo total (figura 2), sendo que os valores de amônio se encontravam dentro do limite para classe 2 (3,7 mg/l). Destacaram-se alguns valores de P-total acima da referência para águas de classe 3 (Resolução 357 – CONAMA).

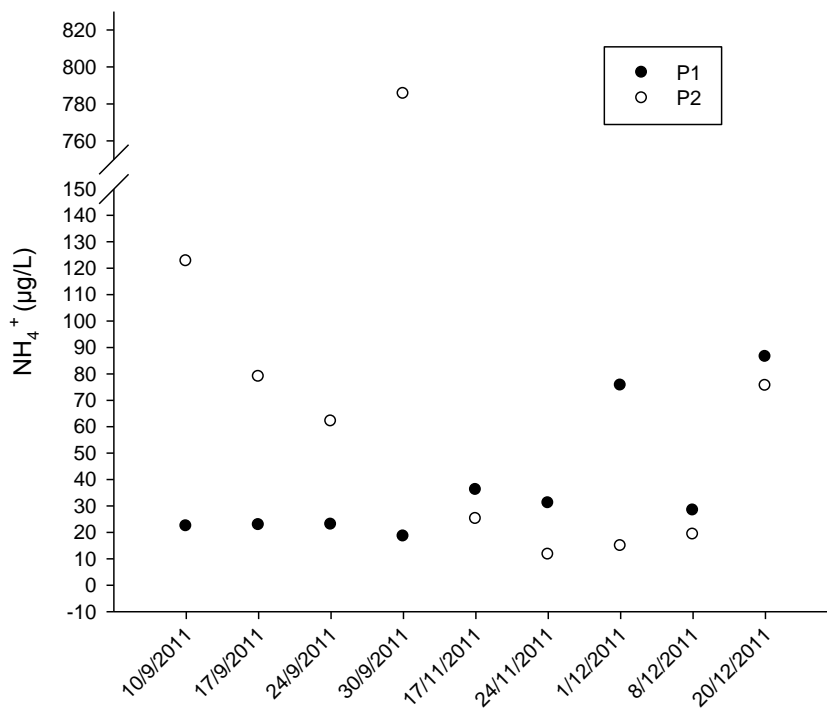


Figura 1. Concentrações do íon amônio nos pontos da bacia do Rio Doce, sub-bacia do Ribeirão Conceição. P1: ponto de referência; P2: Ponto impactado.

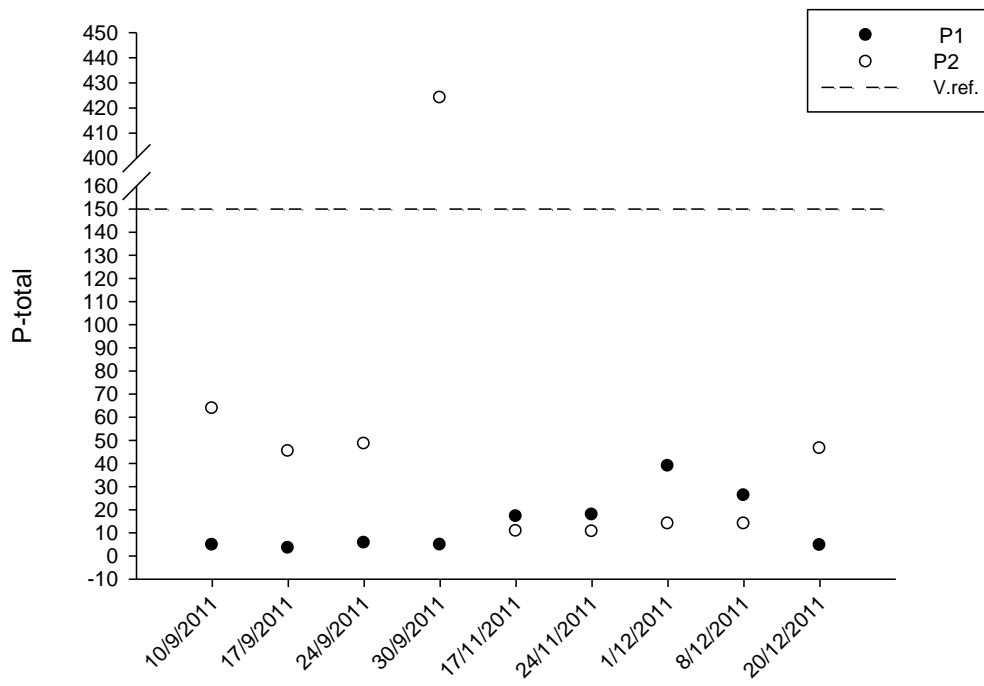


Figura 2. Concentrações de fósforo total na área da bacia do Rio Doce, sub-bacia do Ribeirão Conceição. P1: ponto de referência; P2: Ponto impactado. A linha tracejada representa valor de referência (v. ref.) para classe 3 (Resolução 357 - CONAMA).

Diferentemente, nos pontos da bacia do Rio Das Velhas, os maiores valores foram encontrados durante o período de chuvas para o íon amônio (figura 3) e para fósforo total (figura 4). Nestes pontos os valores encontrados para ambas as variáveis se encontravam abaixo da referência para classe 2 (CONAMA).

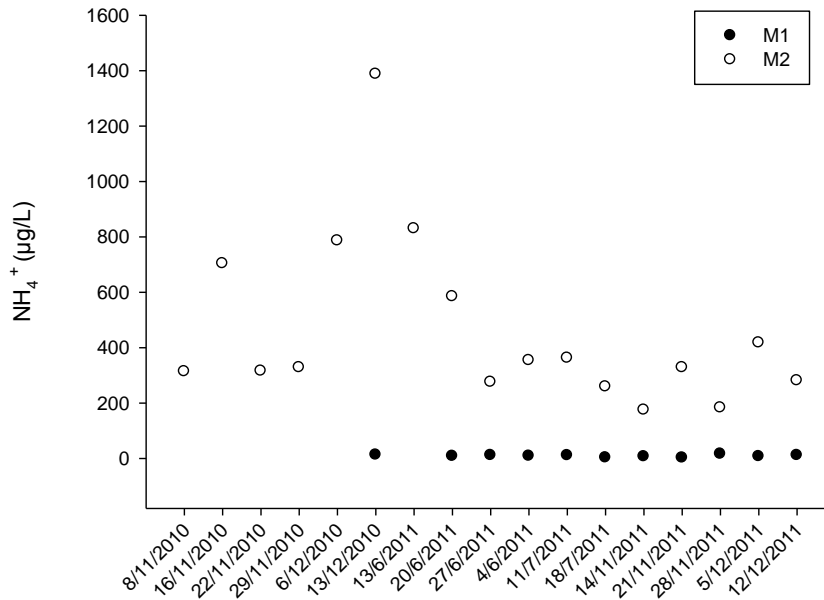


Figura 3. Concentrações de íon amônio para área da bacia do Rio Das Velhas. M1: ponto de referência; M2: ponto impactado.

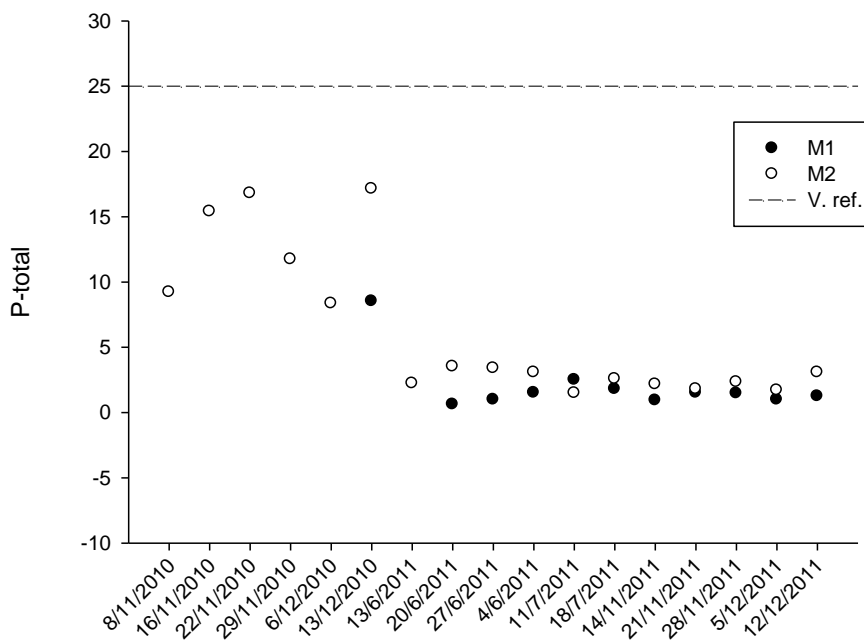


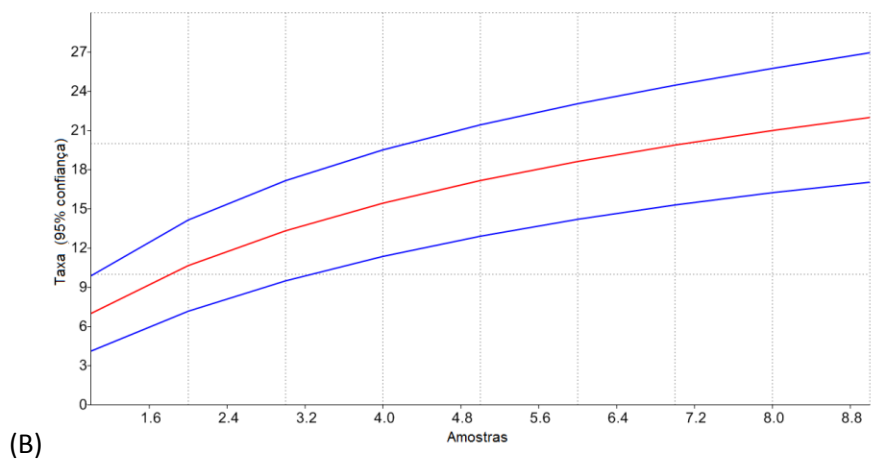
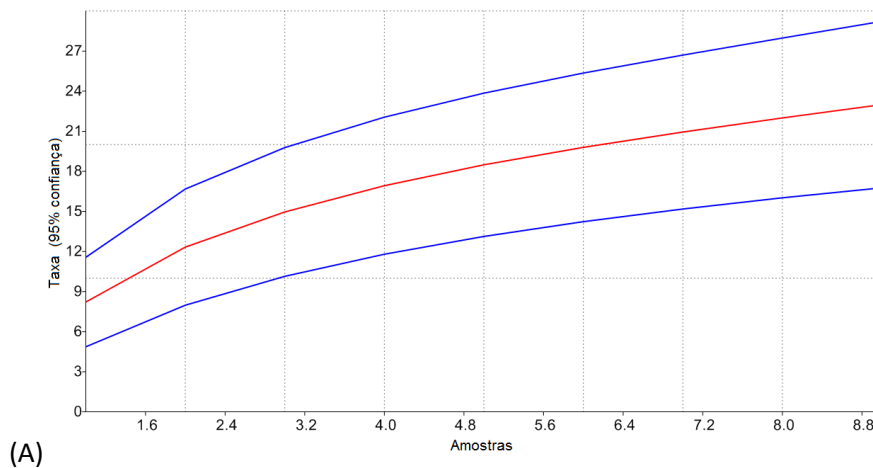
Figura 4. Concentrações de P-total para área da bacia do Rio Das Velhas. M1: ponto de referência; M2: ponto impactado.

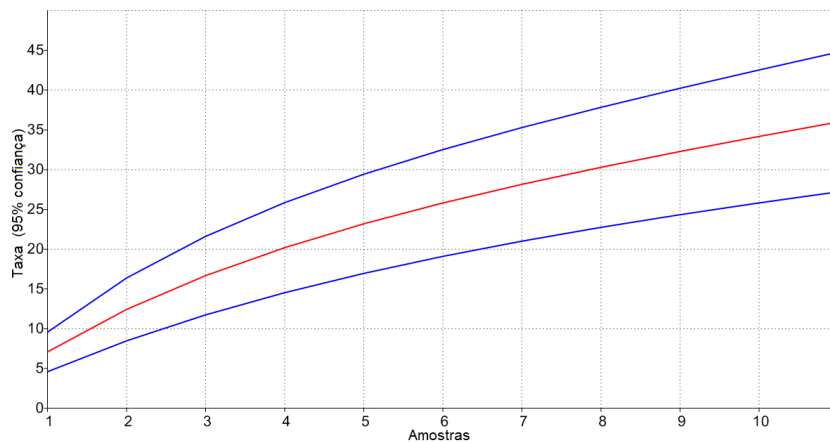
Em termos de número de espécies de fitoplâncton, os pontos de referencia e pontos impactados tiveram valores de riqueza próximos, sendo de 23 e 22, respectivamente em P1 e P2, e 36 e 33 em M1 e M2 (tabela 1).

Tabela 1: Riqueza de espécies nos pontos amostrados.

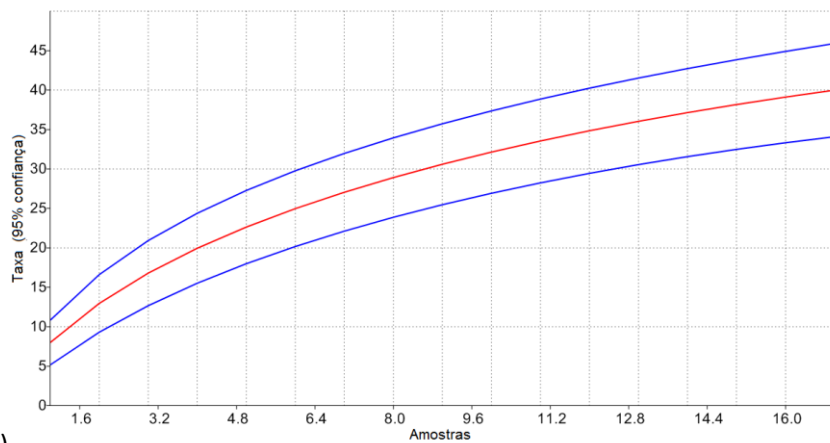
| | Riqueza | Desvio Padrão | Nº de amostras |
|----|---------|---------------|----------------|
| P1 | 23 | 3,2 | 9 |
| P2 | 22 | 2,5 | 9 |
| M1 | 36 | 4,4 | 11 |
| M2 | 33 | 2,7 | 11 |

As curvas de rarefação por amostra indicaram que um número maior de espécies poderia ter sido encontrado aumentando-se o número de amostras em cada ponto (figura 5), tendo em vista que as curvas não se estabilizaram.





(C)



(D)

Figura 5. Curvas de acumulação de espécies em função do número de amostras para cada ponto. A: Ponto de referência da bacia do Rio Doce (P1); B: Ponto impactado na bacia do Rio Doce (P2); C: Ponto de referência da bacia do Rio Das Velhas, captação Mutuca (M1); D: ponto impactado na bacia do Rio Das Velhas, córrego da Mina (M2). As linhas azuis representam o intervalo de confiança a 95%.

A composição e estrutura das comunidades como um todo demonstraram diferenças entre áreas de referência e áreas impactadas ao nível taxonômico de classe. Muitas espécies de Bacillariophyceae ocorreram em comum nos pontos amostrados na bacia do Rio Doce (figura 6A). A maior densidade de indivíduos ocorreu em P1, de 1,67 ind/ml, comparado a P2 com 0,26 ind./ml. Nos ponto da bacia do Rio Das Velhas, de modo similar, foram encontradas muitas espécies em comum entre P1 e P2, sendo que apenas um gênero encontrado somente em M2 (figura 6B). A densidade de diatomáceas foi também maior em M1, com 42,8 ind/ml comparado a M2 com 15,57 ind/ml. Destacou-se a maior abundância de espécies de Zygnematophyceae em P1 (figura 7A), sendo que o pulso de dominância em uma das amostras do período chuvoso foi ocasionado pelo aumento na abundância de *Closterium* sp. A

dominância de clorofíceas, principalmente *Chlorella* sp., destacou-se em ambos os pontos na bacia do Rio Doce, seguida por cianobactérias (*Aphanocapsa* sp e *Chroococcus* sp) e bacilariofíceas (figura 7).

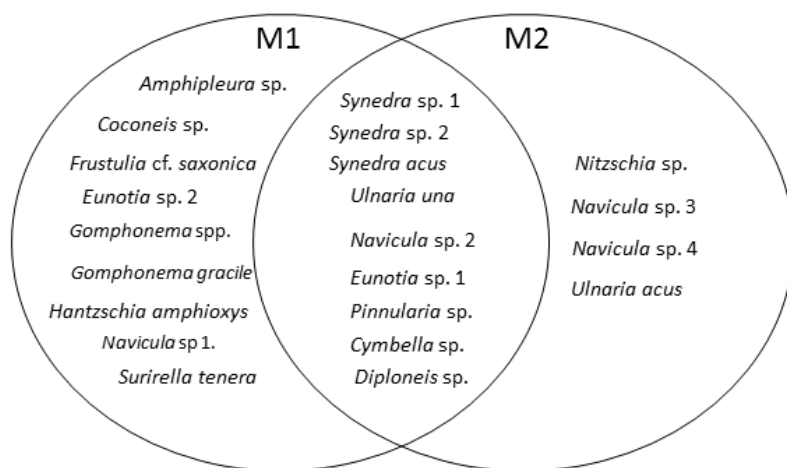
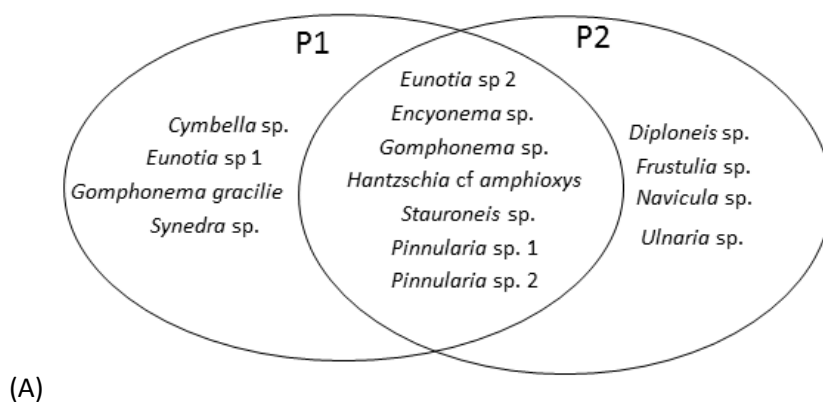


Figura 6: Diagrama de Venn das espécies de Bacillariophyceae. A: pontos no bacia do Rio Doce, P1: ponto de referência, P2: ponto impactado. B: Bacia do Rio Das Velhas, M1: ponto de referencia; M2: ponto impactado.

Na bacia do Rio Das Velhas, as diferenças na estrutura e composição da comunidade foram mais acentuadas (figura 8). Ambos os pontos apresentaram dominância de clorofíceas, principalmente *Chlorella* sp., seguida por cianobactérias. Em M2, destacou-se uma proporção maior de cianobactérias, grupo representado principalmente por *Pseudanabaena* sp. Os grupos Euglenophyceae e Dinophyceae ocorreram em M2 e estiveram ausentes em M1. De modo semelhante aos pontos da bacia do Rio Doce, representantes de Zygnematophyceae foram encontradas com maior frequência no ponto de referência.

De acordo com a ACC, uma semelhança encontrada entre a bacia do Rio Doce (figura 9A) e bacia do Rio Das Velhas (figura 9B) foi a presença de Zygnematophyceae em destaque no

lado oposto às variáveis de alta concentrações de nutrientes, seguida pelo grupo das bacilariofíceas, indicando que estes grupos de organismos ocorrem em maior abundância associados aos pontos de referência com baixas concentrações de nutrientes e de elementos tóxicos, enquanto que Euglenophyceae encontram-se associadas às variáveis de nutrientes, indicando que elevadas concentrações de nutrientes favorecem aumento de sua abundância. Os demais grupos (Chlorophyceae e Cyanophyceae) não tiveram diferenças destacadas na ACC entre os pontos de referência e impactado.

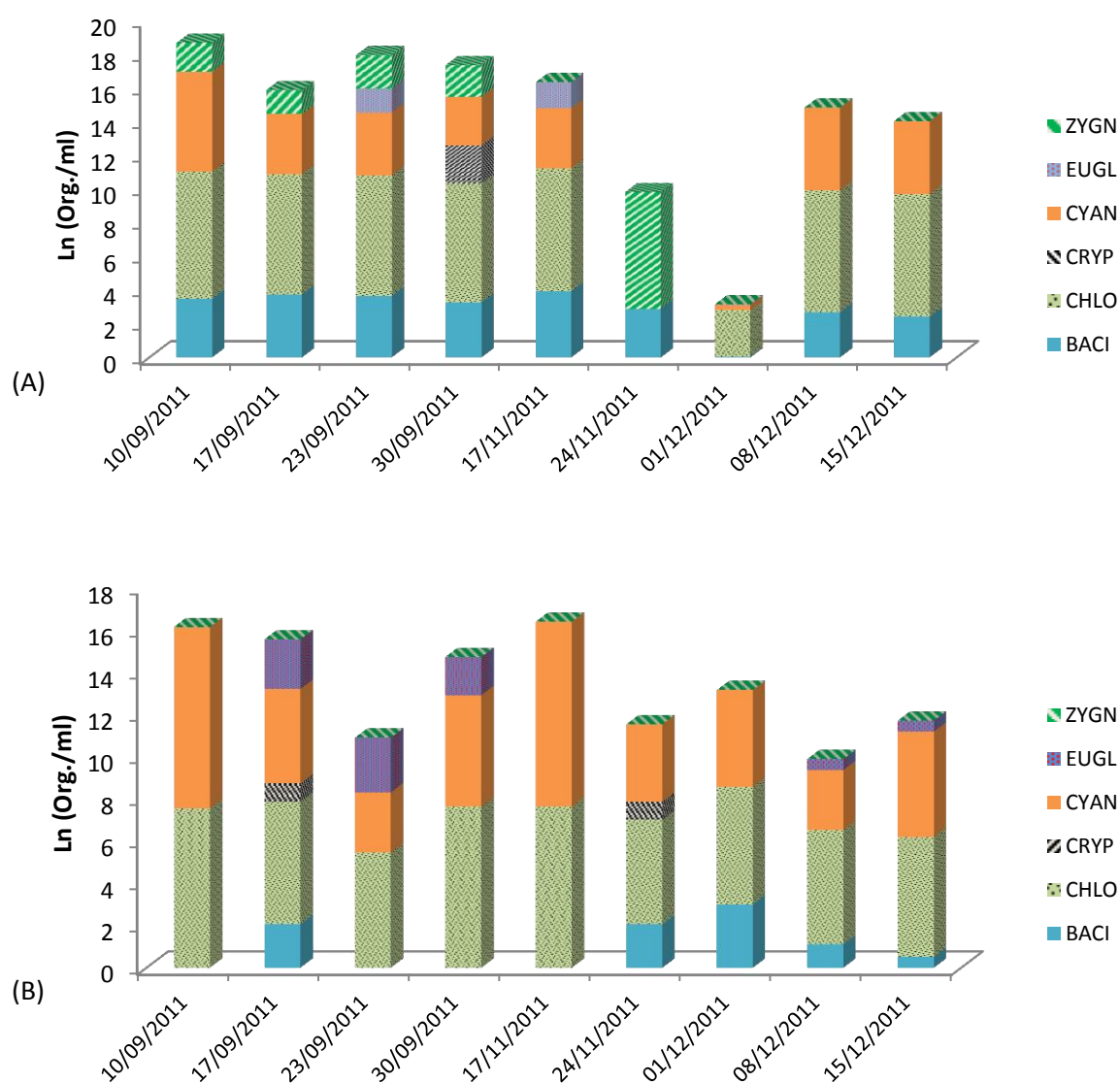


Figura 7. Abundância de grupos de organismos fitoplanctônicos em pontos na bacia do Rio Doce nos períodos de seca (setembro de 2011) e chuvoso (novembro e dezembro de 2011). A: a área de Referência (P1); B: área impactada (P2). Legenda: ZYGN: Zygnematophyceae, EUGL: Euglenophyceae; DINO: Dinophyceae, CYAN: Cyanophyceae, CRYP: Cryptophyceae, CHRY: Chrysophyceae, CHLO: Chlorophyceae, BACI: Bacillariophyceae.

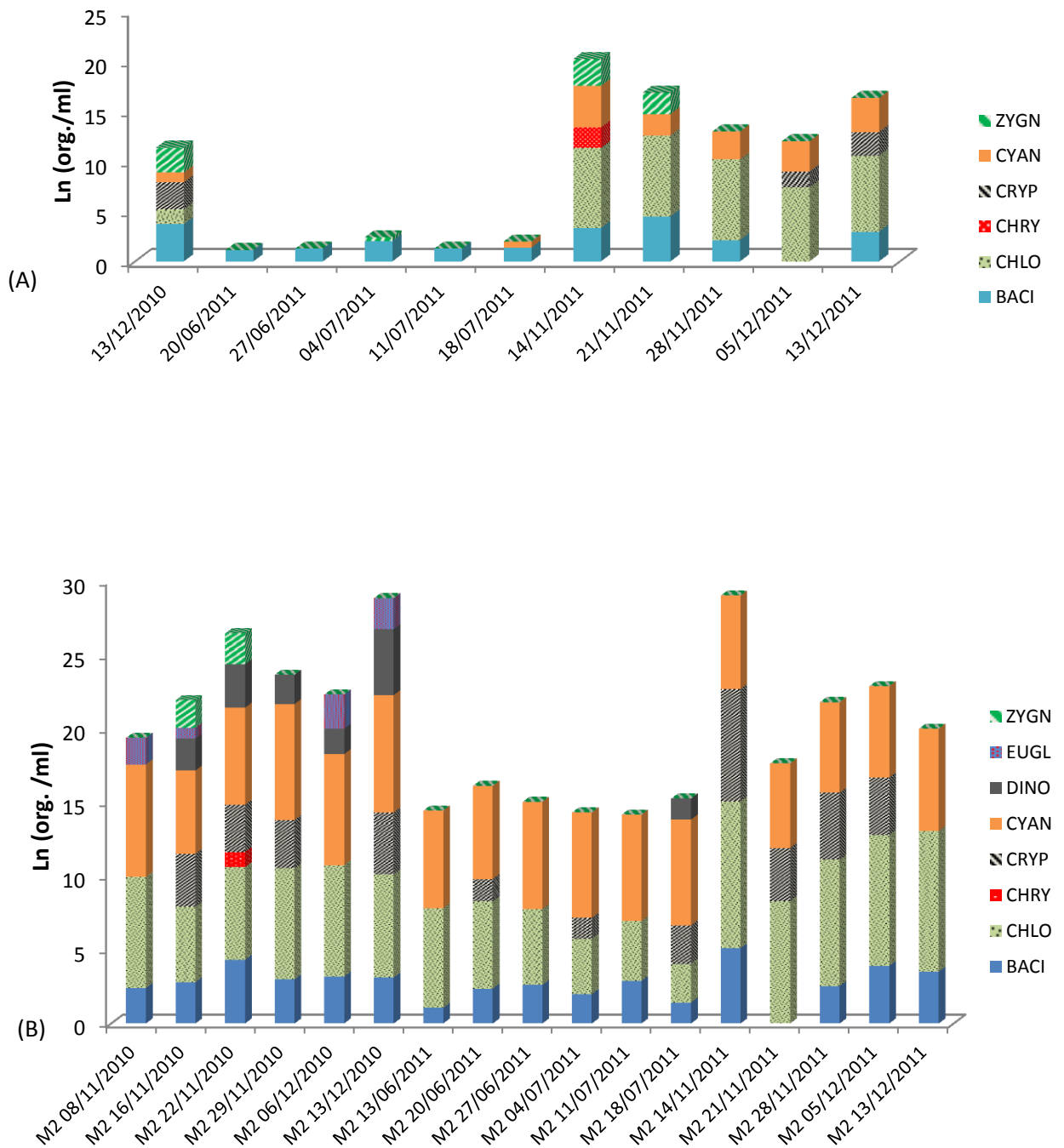
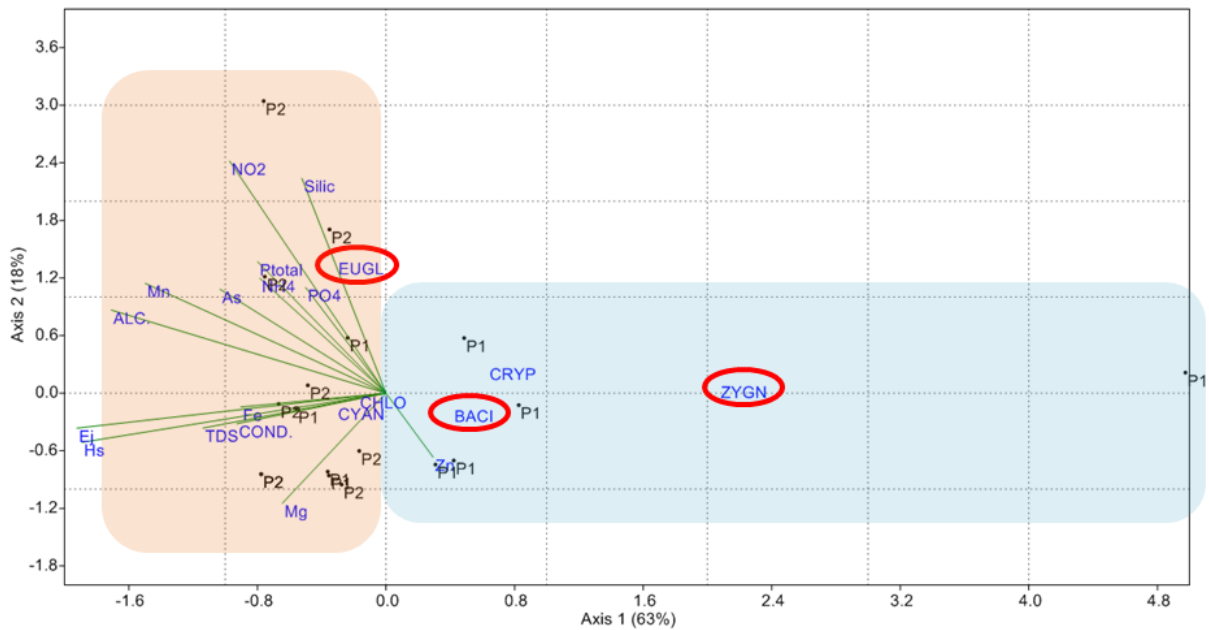


Figura 8. Abundância de grupos de organismos fitoplanctônicos na Bacia do Rio Das Velhas nos períodos de Chuva, (novembro e dezembro de 2010 e 2011), e de seca (junho e julho de 2011).
 Legenda: ZYGN: Zygnematophyceae, EUGL: Euglenophyceae; DINO: Dinophyceae, CYAN: Cyanophyceae, CRYP: Cryptophyceae, CHRY: Chrysophyceae, Chlo: Chlorophyceae, BACI: Bacillariophyceae.

(A)



(B)

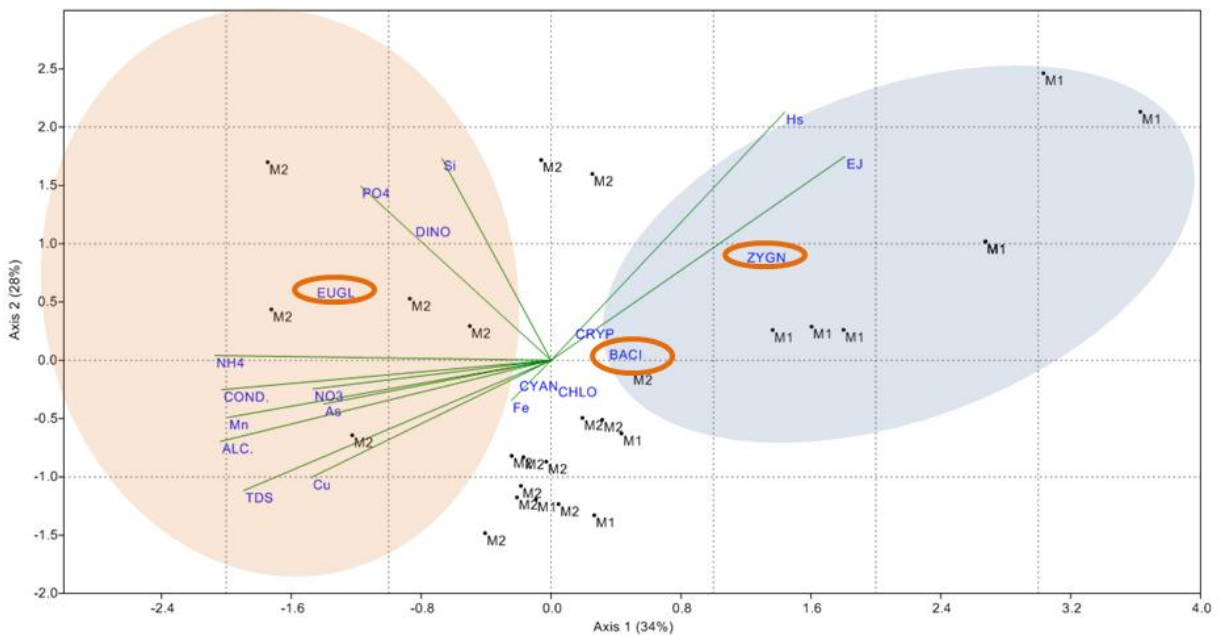


Figura 9. Análise de correspondência canônica nos pontos amostrados. (A) bacia do Rio Doce, P1: ponto de referência, P2: ponto impactado. (B) bacia do Rio Das Velhas, M1: ponto de referência; M2: ponto impactado. Variáveis ambientais: As, Fe, Mn, Zn, Mg dissolvidos em água; COND: condutividade; ALC: alcalinidade; TDS: total de sólidos dissolvidos; NH4: amônio; NO2: nitrito; NO3: nitrato; PO4: fosfato; Hs: índice de diversidade de Shannon; Ej: equabilidade. Grupos fitoplanctônicos: ZYGN: Zygnematophyceae, EUGL: Euglenophyceae; DINO: Dinophyceae, CYAN: Cyanophyceae, CRYP: Cryptophyceae, CHRY: Chrysophyceae, CHLO: Chlorophyceae, BACI: Bacillariophyceae.

Os índices de diversidade de Shannon e equitabilidade tiveram maiores valores associados às amostras do ponto impactado (P2), possivelmente em razão de picos de dominância de *Closterium* sp. em P1. Diferentemente, na ACC para os pontos da bacia do Rio Das Velhas, os maiores valores de diversidade estiveram associados às amostras de M1, área de referência.

4. Discussão

As maiores concentrações de nutrientes e elevados valores de alcalinidade, condutividade e sólidos em suspensão confirmam a menor qualidade ambiental nos pontos impactados, corroborando estudos anteriores. Maillard e Santos, 2008, em uma abordagem espacial estatística para modelar o efeito de poluição na qualidade da água na bacia do rio das Velhas, demonstraram forte relação entre o uso e ocupação do solo e elevados valores de turbidez, nitrogênio e coliformes fecais. De acordo com o esse estudo a presença da mata ciliar é um fator de diminuição dos valores dessas variáveis. Similarmente, em estudo de avaliação da qualidade das águas de afluentes do rio Doce, foi demonstrada a baixa qualidade ambiental em razão de descargas de esgotos domésticos e de atividades de pecuária e suinocultura (Jordão et al., 2007).

Além da contaminação por esgotos domésticos, nos pontos susceptíveis à influencia da atividade de mineração, elementos tóxicos (arsênio e manganês) foram encontrados em concentrações elevadas na água. No córrego da Mina (M2), possivelmente as fontes de contaminação por tais elementos estão associadas a antigos depósitos de rejeitos. Recentemente uma planta de tratamento de minério de ouro foi reativada à montante desse ponto. Já em Barra Feliz, (P2), uma barragem de rejeitos de mineração de ouro em atividade está localizada à montante. Portanto, nestes locais a perturbação ambiental é o resultado de uma combinação de fatores. Em situações como essa, em razão do grande número de variáveis a serem avaliadas, a importância da utilização de organismos locais como bioindicadores é ainda maior.

O uso potencial de micro-algas para bioindicação e biomonitoramento de rios foi reconhecido desde a metade do século XIX (Dokulil, 2003). Apesar de muitas espécies tolerarem variados tipos de condições adversas, como por exemplo elevadas concentrações de metais, não existe uma única espécie que pode ser utilizada como bioindicadora porque as mesmas são reportadas também em locais não poluídos (Gaur e Rai, 2001). Alguns sistemas

de bioindicação agrupam as espécies de fitoplâncton em dezenas de grupos funcionais que compartilham semelhanças em características adaptativas, como o proposto do Reynolds et al., 2002, que leva em conta por exemplo a concentração de nutrientes, estratificação e iluminação em que ocorrem determinadas espécies. No entanto, tais sistemas não levam em conta os níveis de contaminação por metais tóxicos. Vários protocolos de avaliação da integridade biótica tem sido propostos baseados em índices ou em assembleias. Por exemplo, duas assembleias compostas por diferentes gêneros de diatomáceas, entre outras variáveis, foram propostas para avaliação da qualidade ambiental de acordo com a divisão de águas de Kentucky (Kentucky Division of Water, 2008). São os grupos de riqueza de *Cymbella* e *Fragilaria*, agrupados por similaridade com outros gêneros de diatomáceas. No entanto, apenas dois gêneros encontrados em todos os pontos neste trabalho são citados nessa classificação. A distribuição das espécies dificulta a aplicação das assembleias em análises ambientais. Neste estudo, pelas razões apresentadas, utilizou-se a comunidade fitoplanctônica como um todo, ao nível de classificação taxonômica de classe.

Os grupos que mais se diferiram pelo fator de perturbação ambiental foram Bacillariophyceae e Zygnematomyceae com maiores abundâncias associadas aos pontos de referência e Euglenophyceae associada a locais com altas concentrações de nutrientes, como demonstrado pela ACC. As assembleias fitoplanctônicas de rios em condições naturais são na maioria das vezes dominadas por diatomáceas. Por sua sensibilidade a condições ambientais, este grupo tem sido frequentemente pesquisado para avaliação de diferentes tipos de impactos antrópicos em rios, como a elevação das concentrações de nutrientes provenientes de atividades agrícolas (Dam et al., 1994) e também para avaliação de mudanças ambientais ocasionadas pela drenagem ácida de mineração de carvão (Smucker and Vis, 2009). Zignematofíceas são indicadas em avaliações da qualidade ambiental em razão da associação de determinadas espécies ao aporte de nutrientes (Krasznai et al., 2008) e destacam-se com maiores diversidade e abundância em águas continentais de baixas condutividade e concentração de nutrientes. Poucas espécies foram registradas em ambientes com alta concentração iônica (Ngearnpat e Peerapornpaisal, 2007).

Nos pontos em áreas de mineração amostrados neste trabalho, a abundância relativa das diatomáceas foi menor que a de clorofíceas e cianobactérias. Este resultado corrobora estudos que demonstram alterações na abundância de diatomáceas e clorofíceas em relação a um gradiente de deterioração da qualidade da água por diversos tipos de poluição em rio (e.g. Giorgio et al., 1991). Brink et al. (1993) demonstraram que o aporte de nutrientes em ecossistemas lênticos ocasiona aumento na biomassa de algas e mudança na composição do

fitoplâncton de uma comunidade dominados por diatomáceas para uma comunidade dominada por clorófitas e cianobactérias. O grupo Euglenophyceae ocorreu com maior abundância associada aos pontos impactados. Condições de elevadas concentrações de nutrientes favorecem a dominância desse grupo (Danilov et al, 2001), de forma geral, as euglenófitas exibem elevada resistência a metais, como demonstrado em estudos *in vitro* (Halter et al., 2012).

Os resultados obtidos neste estudo alertam para a necessidade urgente de adoção de práticas de conservação dos pequenos cursos d'água no estado de Minas Gerais, que são a principal fonte de recursos hídricos para desenvolvimento econômico e abastecimento humano. Somente nas últimas décadas a política ambiental no Brasil tem se tornado mais criteriosa com relação a conservação de rios, adotando métodos participativos de manejo de bacias (Lemos e Oliveira, 2004). Com as diferenças na composição e estrutura da comunidade fitoplanctônica entre os pontos de referência e impactados confirmou-se o potencial da comunidade fitoplanctônica em ser utilizada para bioindicação da qualidade ambiental. Neste aspecto é necessário enfrentar problemas relacionados principalmente à identificação de determinados grupos de algas (Krasznai et al., 2008) o que demanda treinamento e disponibilidade de equipamentos adequados.

5. Referências

- Bicudo C. E. M., Menezes M. 2006. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. Rima, 489 p.
- Brink, F.W.B., Leeuw, J.P.H.M., Velde, G., Verheggen, G.M., 1993. Impact of hydrology on the chemistry and phytoplankton development in floodplain lakes along the Lower Rhine and Meuse. *Biogeochemistry* 19, 103–128.
- Cairns, J. Jr., Pratt, J.R., 1993. A history of biological monitoring using benthic macroinvertebrates, in: Rosenberg, D.M. e Resh, V.H. (Ed.), *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. Chapman & Hall, New York. pp.10-27
- Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. 2005. Resolução CONAMA nº 357, 2005.
- Dam, H., Mertens, A., Sinkeldam, J., 1994. A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from The Netherlands. *Netherlands J. Aquat. Ecol.* 28, 117–133.
- Danilov R. A. e Ekelund N. G. A., 2001. Phytoplankton communities at different depths in two eutrophic and two oligotrophic temperate lakes at higher latitude during the period of ice cover. *Acta Protozool.*, 40, 197 – 201.
- Dodds, W.K., Martí, E., Tank, J.L., Pontius, J., Hamilton, S.K., Grimm, N.B., Bowden, W.B., McDowell, W.H., Peterson, B.J., Valett, H.M., Webster, J.R., Gregory, S., 2004. Carbon and nitrogen stoichiometry and nitrogen cycling rates in streams. *Oecologia* 140, 458–67.

Dokulil, M.T., 2003. Algae as ecological bio-indicators, in: Bernd A. Markert, Anton M. Breure, Harald G. Zechmeister (Ed.), *Bioindicators & Biomonitors: Principles, Concepts, and Applications*. Elsevier Science. Oxford, UK, pp. 283-325.

Fetscher, A.E., Stancheva, R., Kociolek, J.P., Sheath, R.G., Stein, E.D., Mazor, R.D., Ode, P.R., Busse, L.B., 2014. Development and comparison of stream indices of biotic integrity using diatoms vs. non-diatom algae vs. a combination. *J. Appl. Phycol.* 26, 433-450.

Gaur, J.P. e Rai, L.C., 2001. Heavy metal tolerance in algae. In: Rai, L.C. and Gaur, J.P. (Eds.) *Algal Adaptation to Environmental Stresses*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 363-388.

Giorgio, P.A., Vinocur, A.L., Lombard, R.J., Tell, H.G., 1991. Progressive changes in the structure and dynamics of the phytoplankton community along a pollution gradient in a lowland river - a multivariate approach. *Hydrobiologia* 129–154.

Golterman, H.L. & Clymo, R.S., 1967. *Chemical Environment in the Aquatic Habitat*. Proceedings of an I.B.P. - Symposium Held in Amsterdam and Nieuwersluis 10-16 October 1966. 322 p.

Halter, D., Casiot, C., Heipieper, H.J., Plewniak, F., Marchal, M., Simon, S., Arsène-Ploetze, F., Bertin, P.N., 2012. Surface properties and intracellular speciation revealed an original adaptive mechanism to arsenic in the acid mine drainage bio-indicator *Euglena mutabilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 1735–44.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and P. D. Ryan, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 9 pp.

Jordão C. P., Ribeiro P. R. S., Matos A. T., Bastos. R. K. X. Fernandes R. B. A., Fontes R. L. F. 2007. Environmental assessment of water-courses of the Turvo Limpo River basin at the Minas Gerais State, Brazil. *Environ. Monit. Assess.* 127, 315–326.

Kentucky Division of Water (KDOW), 2008. *Standard Methods for Assessing Biological Integrity of Surface Waters in Kentucky*. Revision 3. Environmental and Public Protection Cabinet, Department for Environmental Protection, Frankfort, KY.

Koroleff, F., 1976. Determination of ammonia, in: Grasshoff, K. (Ed). *Methods of seawater analysis*. VerlagChemie, Weinheim, 126-133 pp.

Krasznai, E., Fehér, G., Borics, G., Várbíró, G., Grigorszky, I., Tóthmérész, B., 2008. Use of desmids to assess the natural conservation value of a Hungarian oxbow (Malom-Tisza, NE-Hungary). *Biologia* 63, 928–935.

Lemos, M.C., de Oliveira, J.L.F., 2004. Can Water Reform Survive Politics? Institutional Change and River Basin Management in Ceará, Northeast Brazil. *World Dev.* 32, 2121–2137.

Luís, A. T., Teixeira, P., Almeida, S.F.P., Ector, L., Matos, J.X., Ferreira Da Silva, E. A., 2008. Impact of acid mine drainage (AMD) on water quality, stream sediments and periphytic diatom communities in the surrounding streams of Aljustrel mining area (Portugal). *Water. Air. Soil Pollut.* 200, 147–167.

Mackereth, F.J.H., Heron, J. and Talling, J.F., 1978. *Water analysis: Some Revised Methods for Limnologists*. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Ambleside, No 36. 120 p.

- Maillarda P., Pinheiro S. N. A. A spatial-statistical approach for modeling the effect of non-point source pollution on different water quality parameters in the Velhas river watershed – Brazil. 2008. *J. Environ. Manage.* 86, 158–170.
- Ngearnpat, N., Peerapornpisal, Y., 2007. Application of desmid diversity in assessing the water quality of 12 freshwater resources in Thailand. *J. Appl. Phycol.* 19, 667–674.
- Primack, R.B. & Rodrigues, E., 2001. *Biologia da Conservação*. Ed. Vida, Londrina, pp. 328
- Reynolds, C. S., Huszar V., Kruk C., Naselli-Flores L., Melo S., 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Jour. Plankton Research*, 417-428.
- Reynolds, C.S. 2006. *The ecology of phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press. 552pp.
- Silva, M.M. S. G., Queiroz, J. F. Trivinho-Strixino, S., 2008. Indicadores biológicos de qualidade, in: Queiroz, J. F., Silva, M.M. S. G., Trivinho-Strixino, S., (Eds), *Organismos bentônicos: biomonitoramento de qualidade de água*. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, pp. 26-34.
- Smucker, N.J., Vis, M.L., 2009. Use of diatoms to assess agricultural and coal mining impacts on streams and a multiassemblage case study. *J. North Am. Benthol. Soc.* 28, 659–675.
- Strickland, J.D.H. and Parsons, T. R. 1968. *A manual for sea water analysis*. Bull. Fish. Res. Bd. Canada, pp. 71-75.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkomnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 9, 1–38.
- Villafañe, V.E. & Reid, F.M.H., 1995. Métodos de microscopia para la cuatificación del fitoplancton. In: Aveal, K., Ferrario, M.E., Oliveira, E.C. & Sar, E. (Eds.) *Manual de métodos ficológicos*. Universidad de Concepción, Chile, pp. 169–185.
- Zalack, J.T., Smucker, N.J., Vis, M.L., 2010. Development of a diatom index of biotic integrity for acid mine drainage impacted streams. *Ecol. Indic.* 10, 287–295.
- Zhou Q., Zhang J., Fu J., Shi J., Jiang G., 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal. Chim. Acta.* 606, 135–150.

Capítulo III

Um estudo de de XAFS das interações do arseniato e arsenito com o tripeptídeo glutatona

Um estudo de XAFS das interações do arseniato e arsenito com o tripeptídeo glutationa

Resumo

As reações químicas entre compostos biológicos e arsênio (As) inorgânico têm sido investigadas na tentativa de melhor compreender os mecanismos pelos quais o arsênio pode ser imobilizado por organismos vivos intracelularmente ou em seu ambiente. Moléculas contendo sulfidrilas como a glutationa (GSH) são considerados moléculas-alvo na bioquímica do As por sua importância na imobilização e redução do As intracelular. No presente estudo, investigou-se em que extensão ocorre a reação entre o As(III) ou As(V) com a GSH utilizando-se a espectroscopia de absorção de raios X (XAFS) para a discriminação de estado de oxidação e coordenação do As. Medidas de XAFS foram realizadas em soluções recentemente preparadas de As(III)+GSH nas proporções molares de 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:4 e As(V)+GSH nas proporções de 1:0.5; 1:2, 1:4 e 1:6. Independentemente se o As é fornecido na forma de As(III) ou As(V), a densidade eletrônica em torno do átomo do As aumenta progressivamente com o aumento da proporção de GSH pela substituição do oxigênio pelo menos eletronegativo átomo de enxofre nos complexos formados. A transformada de Fourier do espectro de EXAFS (espectroscopia da estrutura fina de absorção) da borda K demonstrou mudanças na coordenação do átomo de As(V) com a sua redução a As(III) como uma condição prévia à formação do complexo As(GS)₃. Os ajustes de XANES para as ligações As^V-O; As^{III}-O e As-S nas proporções intermediárias de As(V) ou As(III)+GSH demonstram a presença de uma mistura de complexos de As(GS)₃ e oxianions de As. Este trabalho contribui para a compreensão do comportamento do arsênio em ligação covalente com grupos tiol. O conhecimento sobre os mecanismos moleculares de imobilização do arsênio ajudam a esclarecer a complexa bioquímica deste elemento.

1. Introdução

O arsênio é um semimetal conhecido por sua alta toxicidade e também propriedades terapêuticas (Niu et al., 1999). A contaminação por este elemento tem sido uma preocupação mundial, principalmente em locais de mineração por sua dispersão em águas superficiais (Figueiredo et al., 2007). Em 2011, o arsênio foi o primeiro no ranking de elementos perigosos da Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ASTDR). Este elemento possui uma grande variedade de compostos, sendo atribuído maior interesse nos inorgânicos por sua elevada toxicidade. As formas mais comuns de arsênio inorgânico encontradas no ambiente são aquelas em que este se encontra combinado com o ferro, oxigênio, enxofre ou cloro (Henke e Hutchinson, 2009). As reações químicas entre compostos biológicos e arsênio inorgânico têm sido pesquisadas na tentativa de descrever mecanismos eficientes de imobilização deste elemento intracelularmente ou no meio externo.

Moléculas contendo grupos sulfidrila são importantes nas vias bioquímicas de desintoxicação por arsênio (Bennett et al., 2001). Uma vez absorvido pelas células vivas, este semimetal sofre uma série de reações de redução em que os grupos sulfidrila atuam como doadores de elétrons antes de formar ligações covalentes com um ou mais átomos de carbono para a produção de compostos orgânicos.

O tripeptídeo glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine; GSH) desempenha um papel fundamental na homeostase da célula como um dos agentes redutores mais abundantes em várias vias bioquímicas (Monostori et al., 2009). Por exemplo, atua como doador de elétrons no ciclo ascorbato-glutathione, via que controla o nível de espécies reativas de oxigênio em células vegetais (Mittler et al., 2002). A redutase do arseniato encontrada na cianobactéria *Synechocystis* sp. emprega glutathione e glutaredoxina como a fonte de equivalentes redutores (Li et al., 2003). *Saccharomyces cerevisiae* apresenta um mecanismo de imobilização extracelular em que a GSH é exsudada das células para imobilizar o As e prevenir sua absorção (Thorsen et al., 2012). Assim, a GSH tem papel fisiológico em processos de desintoxicação ocasionado por diversas moléculas, como as espécies reativas de oxigênio, xenobióticos e metais pesados em procariotos e eucariotos (Rouhier et al., 2008).

Tendo em vista a importância da GSH no metabolismo celular, diferentes técnicas têm sido aplicadas no estudo da interação desse tripeptídeo com o arsênio e na avaliação da estabilidade dos complexos formados. Técnicas analíticas de ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C NMR) (Delnomdedieu et al., 1995, Scott et al., 1993) cromatografia de exclusão por tamanho (Gailer et al., 1998), espectrometria de massa com ionização por spray de elétrons

(Park & Butcher, 2010) e microscopia de tunelamento (Han et al., 2007) têm sido utilizadas, trazendo informações dos mecanismos de reações químicas, estequiometria e estrutura dos complexos formados.

A espectroscopia de absorção de raio-X (XAFS) contribui com dados dos compostos em escala atômica, é elemento específica e permite discriminar o estado de oxidação do átomo-alvo em combinação com a estrutura local (coordenação) das espécies químicas presentes na amostra. A técnica é baseada no coeficiente de absorção de raios-X $\mu(E)$ em função da variação da energia do feixe de luz aplicado na amostra (Bunker et al., 2011; Newville 2004). Neste trabalho foi estudado em que medida ocorre a reação entre o As(III) ou As(V) e a GSH utilizando-se a técnica de XAFS. O estado de oxidação e a coordenação do As em concentrações crescentes de GSH foi analisado. Este trabalho contribui para a compreensão do comportamento do arsênio em ligação covalente com grupos tiol.

2. Materiais e Métodos

Água deionizada foi utilizada para a preparação de soluções aquosas padrão de As(III) e As(V) (0,1 M) utilizando-se os sais NaAsO_2 e $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, respectivamente. As soluções de As(III)+GSH foram preparadas nas razões molares de 1:0.5; 1:1; 1:2; 1:4 e As(V)+GSH nas proporções molares de 1:0.5; 1:2, 1:4 e 1:6. A concentração de GSH em todas as amostras foi de 0,16 M e o pH das soluções foi de 4,3. Os reagentes e os produtos químicos utilizados eram de grau analítico (Sigma-Aldrich).

As medidas de XAFS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Os dados foram coletados no valor de absorção (11868 eV) da borda K do As, na linha de luz XAFS-2, geometria de transmissão, usando como monocromador um cristal duplo de Si (111) e detectores de câmara de ionização. A calibração da energia foi monitorada durante a coleta de dados por meio da aquisição de referência de uma folha de ouro para as medições de espectros.

Os programas utilizados nas análises dos dados foram FEFF6 (Zabinsky et al., 1995) para o cálculo dos caminhos de espalhamento e Athena e Artemis (Ravel, 2005) para tratamento e ajuste dos dados. A análise dos dados foi realizada conforme descrito anteriormente (Vasconcelos et al., 2008; Duarte et al, 2012). O ajuste de todas as amostras foi realizado utilizando-se ponderação simultânea K de 1, 2 e 3. O fator de redução de elétron passivo S_0^2 foi calibrado a partir de medidas de compostos padrão de estrutura conhecida, com valor de 0.87

± 0.05 para a borda K do As, obtido a partir de ajustes do padrão cristalino NaAsO₂ e usado em todos os ajustes.

3. Resultados e Discussão

Quando se inicia o efeito fotoelétrico, nota-se um aumento abrupto na energia de absorção para um novo nível eletrônico (Figura 1), que corresponde à região da espectroscopia de alta resolução da borda de absorção (XANES), a qual fornece essencialmente informações sobre a estrutura eletrônica do átomo alvo. Os espectros de XANES para As(III) em proporções molares crescentes de GSH (figura 1A) mostram uma diminuição consistente, de 2.1 eV, na energia da borda K de absorção em função do aumento da proporção de GSH, passando de 11869.4 eV na amostra de As(III) para 11867.3 eV na amostra de As(III)+GSH 1:4, o que é resultado do aumento na densidade eletrônica em torno do átomo de As fornecida pela substituição do oxigênio pelo menos eletronegativo átomo de enxofre nos complexos formados. Um comportamento similar é observado no espectro de XANES de As(V)+GSH (Figura 1B). No entanto, enquanto que a variação total de energia das amostras de As(III)+GSH é de 2.1 eV, a variação nas amostras de As(V)+GSH é de 5 eV. A energia de ionização das camadas internas é sensível ao número de oxidação do átomo na molécula, sua eletronegatividade e ionização de suas ligações (Thomas et al., 1990). Assim, tais variações de energia observadas são atribuídas às mudanças estruturais no átomo de As, sendo progressivamente reduzido em função das concentrações de GSH.

Apesar das diferenças no estado de oxidação do As, em proporções de excesso de GSH os espectros XANES se tornaram sobrepostos (Figura 1C), demonstrando que desde que a GSH esteja em excesso em relação ao As(V), o mesmo complexo As(GS)₃ será formado, independente do estado de oxidação inicial do As. Utilizando a técnica de ¹H ¹³C RMN em atmosfera de nitrogênio, Scott et al. (1993) demonstraram a estequiometria de reação de 1As(III):3GSH e 1As(V):5GSH para formação do complexo.

Uma combinação linear dos dados de XANES foi realizada para investigar a formação dos complexos de As-GSH nas proporções molares em que ambas as ligações As^V-O; As^{III}-O e As-S são encontradas. Para isso utilizou-se padrões experimentais obtidos de soluções aquosas de As(III) ou As(V) e do complexo As(GS)₃, obtido com a amostra de As(III) + GSH 1:4. Desde a proporção mais baixa de GSH (As(III) + GSH 1:0,5), o sinal da ligação As-S foi observado, contribuindo para 39% do sinal obtido. Ao aumentar a proporção de GSH, em 1:2, a contribuição da ligação As-S para o sinal passou a ser de 70% (Figura 2A). Ao mesmo tempo, a percentagem do sinal relativo à ligação As^{III}-O decresceu de 61% para 30%. Diferentemente, na

combinação linear para As(V)+GSH a ligação As-S tornou-se evidente apenas na proporção de 1:2, contribuindo com apenas 20% do sinal, já que parte da GSH foi consumida para reduzir As(V) a As(III).

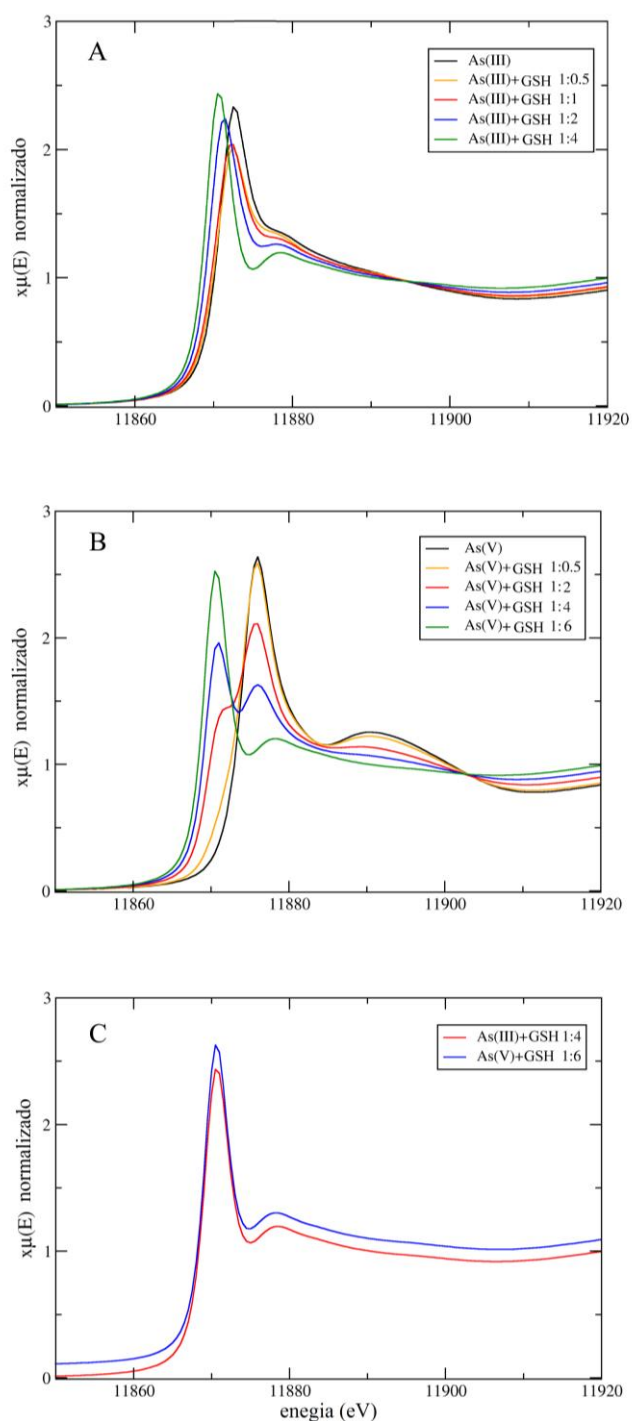


Figura 1. Espectro de XANES normalizado da borda K de espécies inorgânicas de arsênio em concentrações crescentes de GSH. (A) As(III)+GSH em proporções molares de 1:0; 1:0.5; 1:1, 1:2, e 1:4. (B) As(V)+GSH nas proporções molares de 1:0; 1:0.5; 1:2; 1:4; e 1:6. (C) Complexo As(GS)₃ derivado de As(III) ou As(V) nas proporções de 1:4 e 1:6, respectivamente.

A técnica de XAFS fornece a coordenação média dos átomos da amostra que são excitados pela radiação síncrotron, portanto não permite determinar se nas proporções intermediárias existem compostos de As coordenado com três oxigênios com ou três enxofres separadamente, formando-se uma mistura de As(III) e As(GS)₃, ou se complexos de As com uma coordenação combinada com átomos de oxigênio e enxofre são formados.

A redução e imobilização do As pela GSH é um mecanismo de desintoxicação comum presente em procariontes e eucariontes (Mittler et al., 2002; Levy et al., 2005; Srivastava et al., 2009). No entanto, o processo de desintoxicação em células expostas ao arseniato envolve um maior dispêndio de energia para a redução de As(V) a As(III) e subsequente formação do complexo.

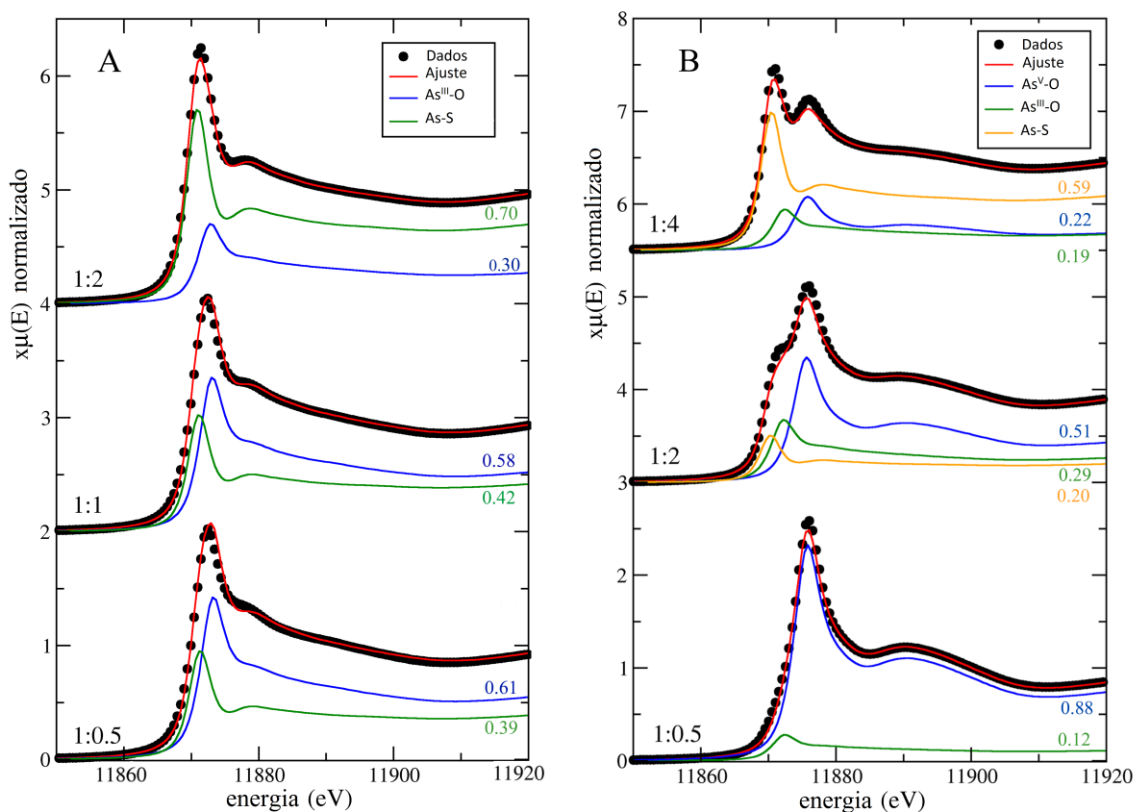


Figura 2. Ajuste dos dados dos espectros de XANES obtidos para espécies inorgânicas de As em concentrações crescentes de GSH. (A) As(III)+GSH nas proporções molares de 1:0.5, 1:1,1:2. (B) As(V)+GSH nas proporções molares de 1:0.5, 1:2,1:4. A percentagem de cada uma das espécies químicas de arsênio é dada na cor correspondente com a legenda.

A região do espectro de EXAFS proporciona informações sobre a coordenação do elemento analisado. Os ajustes obtidos (tabela 1) são consistentes com estudos prévios de caracterização de compostos de As(III) (Ramírez-Solís et al., 2004) e As(GS)₃ (Smith et al., 2005).

Este trabalho contribui com informações das propriedades do átomo de arsênio ao interagir com a GSH, sob o ponto de vista da técnica de XAFS.

É visível a mudança de fase nas oscilações EXAFS (Figura 3) quando a coordenação do As(III) ou As(V) (em preto), formada respectivamente por três ou quatro átomos de oxigênio, é substituída por três átomos de enxofre (em azul) como resultado do aumento gradual na proporção de GSH e formação dos complexos a partir de As(III) (figura 3A) ou As(V) (figura 3B). Nas concentrações mais elevadas, de As(III)+GSH 1:4 e As(V)+GSH 1:6, apenas o sinal da ligação As-S é detectado devido à formação de $\text{As}(\text{GS})_3$ com elevada afinidade do grupo sulfidril pelo As.

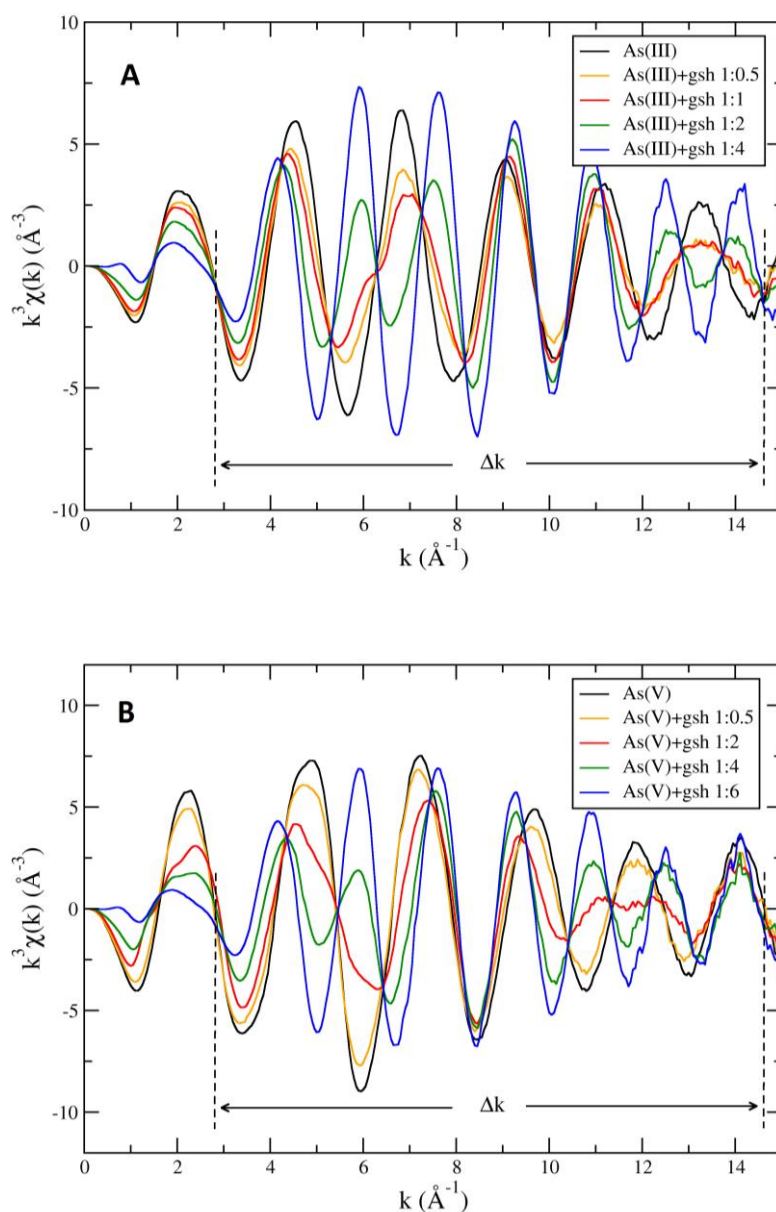


Figura 3. Espectro de EXAFS da borda K do As em concentrações crescentes de GSH. (A) As(III)+GSH nas proporções molares de 1:0, 1:0.5; 1:1, 1:2; 1:4; (B) As(V)+GSH nas proporções molares de 1:0, 1:0.5; 1:2, 1:4; 1:6.

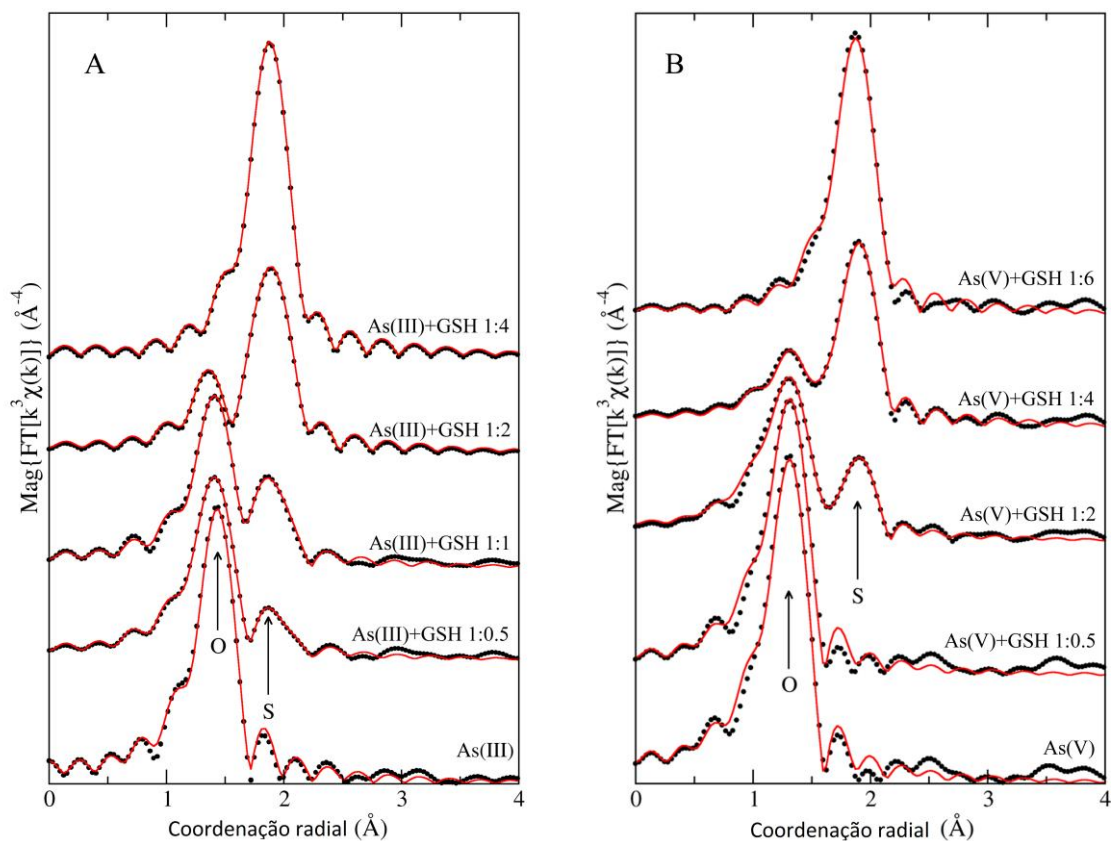


Figura 4: Transformada de Fourier (FT) da região de EXAFS do espectro da borda K do As em concentrações crescentes de GSH. (A) As(III) nas proporções molares de 1:0; 1:0.5, 1:1, 1:2, e 1:4. (B) As(V) nas proporções molares de 1:0, 1:0.5, 1:2, 1:4 e 1:6.

A Transformada de Fourier (FT) da região de EXAFS do espectro da borda K do As (figura 4A) mostra o sinal da ligação As-S desde a concentração mais baixa de As(III)+GSH e gradual diminuição da amplitude do sinal As-O, o qual desaparece totalmente na proporção de As(III)+GSH 1:4, quando a coordenação do As passa a ser formada por três átomos de enxofre derivados da GSH (Tabela 1). Uma proporção maior de GSH sobre o As(V) é necessária para formar-se a ligação As-S (figura 4B). Juntamente com os dados de XANES, a transformada de Fourier do EXAFS confirma a oxidação de GSH, com a concomitante redução de arseniato a arsenito previamente à formação do complexo $\text{As}(\text{GS})_3$. Esta reação foi observada também por meio da técnica de ressonância magnética nuclear (Scott et al. 1993).

Tabela 1: ajuste dos dados de EXAFS para amostras de As(III) ou As(V) em concentrações crescentes de GSH.

| | As-O | | | As-S | | |
|--------------------|-----------|---------------|-----------------------------------|-----------|---------------|-----------------------------------|
| | N | R(Å) | $\sigma^2(10^{-3} \text{ \AA}^2)$ | N | R(Å) | $\sigma^2(10^{-3} \text{ \AA}^2)$ |
| As (III) aq | 3.1 (0.1) | 1.791 (0.007) | 2.1 (0.4) | - | - | - |
| As (III)+GSH 1:0.5 | 2.4 (0.1) | 1.789 (0.002) | 2.9 (0.2) | 0.3 (0.1) | 2.282 (0.011) | 2.3 (1.2) |
| As (III)+GSH 1:1 | 2.0 (0.1) | 1.785 (0.004) | 1.7 (0.4) | 0.7 (0.1) | 2.272 (0.007) | 2.2 (0.9) |
| As (III)+GSH 1:2 | 0.8 (0.1) | 1.790 (0.012) | 1.5 (0.9) | 1.9 (0.2) | 2.266 (0.008) | 2.7 (0.8) |
| As (III)+GSH 1:4 | - | - | - | 3.1 (0.2) | 2.254 (0.007) | 2.8 (0.7) |
| As (V) aq | 4.2 (0.3) | 1.691 (0.006) | 3.4 (0.7) | - | - | - |
| As (V)+GSH 1:0.5 | 3.9 (0.3) | 1.695 (0.005) | 3.6 (0.8) | - | - | - |
| As (V)+GSH 1:2 | 3.3 (0.2) | 1.713 (0.006) | 6.0 (0.8) | 1.2 (0.2) | 2.244 (0.009) | 4.4 (1.3) |
| As (V)+GSH 1:4 | 1.4 (0.2) | 1.728 (0.010) | 4.9 (1.5) | 2.1 (0.2) | 2.258 (0.005) | 3.1 (0.6) |
| As (V)+GSH 1:6 | - | - | - | 3.2 (0.2) | 2.254 (0.006) | 3.1 (0.7) |

N: número de átomos vizinhos; R: distancia interatômica; σ^2 : desordem na distancia do átomo vizinho. Valores de incerteza entre parênteses.

Neste trabalho demonstrou-se a complexação de arsênio inorgânico pela GSH do ponto de vista da técnica de XAFS. Com a prévia redução do As(V) a As(III) em soluções recentemente preparadas, o complexo As(GS)₃ se forma com maior densidade eletrônica em torno do átomo de As comparado aos oxianions de As(III) e As(V). Os ajustes do espectro de XANES da borda K do As obtido das concentrações intermediárias de As+GSH, para as ligações As^V-O; As^{III}-O e As-S, indicam a possibilidade do As com a coordenação formada por oxigênio e enxofre, ou uma mistura de As(III) e As(GS)₃ em solução. Informações sobre os mecanismos moleculares de imobilização do As podem ajudar a esclarecer a complexa bioquímica desse elemento.

3. Referências

ATSDR, 2011. www.atsdr.cdc.gov/spl/resources/ATSDR_2011_SPL_Detailed_Data_Table.pdf

Bennett M.S., Guan Z., Laurberg M., Su X.D., 2001. *Bacillus subtilis* arsenate reductase is structurally and functionally similar to low molecular weight protein tyrosine phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 13577–1382.

Bunker G., 2011. *Introduction to XAFS: a practical guide to x-ray absorption fine structure spectroscopy*, Cambridge University Press, New York.

Delnomdedieu M., Basti M.M., Otvos J.D., Thomas D.J., 1994. Reduction and binding of arsenate and dimethylarsinate by glutathione: a magnetic resonance study. *Chem. Biol. Interact*, 90, 139–55.

Duarte G., Ciminelli V.S.T., Dantas M.S.S., Duarte H. A., Vasconcelos I.F., Oliveira A.F., 2012. As(III) immobilization on gibbsite: Investigation of the complexation mechanism by combining EXAFS analyses and DFT calculations. *Geochim Cosmochim Acta*, 83, 205–216.

Figueiredo B. R., Borba R. P. Angélica R. S., 2007. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environ. Geochem. Health*, 29, 109-118.

- Gailer J., Lindner W., 1998. On-column formation of arsenic-glutathione species detected by size exclusion chromatography in conjunction with arsenic-specific detectors. *J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.*, 716, 83–93.
- Han, M. J., Meng, X., Lippincott, L. 2007. Determination of configuration of arsenite-glutathione complexes using ECSTM. *Toxicol. Let.*, 175, 57–63.
- Henke k. R., Hutchison A., 2009. Arsenic Chemistry, in: Kevin Henke (Ed.), *Arsenic: Environmental Chemistry, Health Threats and Waste Treatment*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester pp. 9-68.
- Levy J.L., Stauber J.L., Adams M.S., Maher W.A., Kirby J.K., Jolley D.F., 2005. Toxicity, biotransformation, and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella* sp. and *Monoraphidium arcuatum*). *Environ. Toxicol. Chem* 24, 2630–9.
- Li R., Haile J.D., Kennelly P.J., 2003. An arsenate reductase from *Synechocystis* sp . Strain PCC 6803 exhibits a novel combination of catalytic characteristics. *J. Bacteriol.* 185, 6780–6789.
- Mittler R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7, 405-410.
- Monostori P., Wittmann G., Karg E., Túri S., 2009. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review. *J chromatogr B*, 877, 3331–46.
- Newville M., 2004. *Fundamentals of XAFS, Revision 1*, Consortium fo Advanced Radiation Sources, Chicago.
- Niu C., Yan H., Yu T., Sun H. P., Liu J. X., Li X. S., Chen S. J. 1999. Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Blood*, 94, 3315–24.
- Park, S., & Butcher, D. J., 2010. Investigation of the interaction between arsenic species and thiols via electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Microchem. J.*, 95, 57-66.
- Ramírez-Solís A., Mukopadhyay R., Rosen B.P., Stemmler T.L., 2004. Experimental and theoretical characterization of arsenite in water: insights into the coordination environment of As-O, *Inorg. Chem.*, 43, 2954–9.
- Ravel B., Newville M., 2005. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT, *J. Synchrotron Radiat.*, 12, 537–41.
- Rouhier N., Lemaire S.D., Jacquot J. P., 2008. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *An. Rev. Plant Biol.*, 59, 143–66.
- Scott N., Hatlelid K.M., MacKenzie N.E., Carter D.E. 1993. Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione. *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 102–6.
- Smith, P. G., Koch, I., Gordon, R. a, Mandoli, D. F., Chapman, B. D., Reimer, K. J., 2005. X-ray absorption near-edge structure analysis of arsenic species for application to biological environmental samples. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 248–54.

Srivastava A.K., Bhargava P., Thapar R., Rai L.C., 2009. Differential response of antioxidative defense system of *Anabaena doliolum* under arsenite and arsenate stress, *J Basic Microb.*, 49, 63–72.

Thomas, T. D., Siggel, M., & SAETHRE, L. J., 1990. Core-ionization energies and chemical properties. *J Electron Spectrosc.*, 51, 417–438.

Thorsen M., Jacobson T., Vooijs R., Navarrete C., Blik T., Schat H., 2012. Glutathione serves an extracellular defence function to decrease arsenite accumulation and toxicity in yeast, *Mol. Microbiol.* 84, 1177–88.

Vasconcelos I.F., Haack E. A., Maurice P. A., Bunker B. A., 2008. EXAFS analysis of cadmium (II) adsorption to kaolinite, *Chem. Geol.* 249, 237–249.

Zabinsky S.I., Rehr J.J., Ankudinov A., Albers R.C., Eller M.J., 1995. Multiple Scattering Calculations of X-ray Absorption Spectra, *Phys. Rev. B.*, 52, 2995–3009.

Capítulo IV

Efeito bacteriostático e biotransformação de espécies inorgânicas de arsênio em *Synechococcus nidulans* (Cyanobacteria)

Efeito bacteriostático e biotransformação de espécies inorgânicas de arsênio em *Synechococcus nidulans* (Cyanobacteria)

Resumo

A prospecção de espécies de cianobactérias resistentes a oxianions de arsênio (As) e capazes de biotransformá-los em formas orgânicas é uma etapa crucial para a indicação de organismos com potencial para a descontaminação de ambientes aquáticos. Uma cepa de *Synechococcus nidulans*, obtida de um córrego contaminado por arsênio, foi exposta a concentrações de As(III) ou As(V) em séries geométricas para determinação da CE₅₀. A produção de espécies orgânicas de arsênio sob exposição ao As(III) (6 mg/L) e As(V) (400 mg/L) por 30 dias foi avaliada utilizando-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Hifenada a Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (HPLC-ICP-MS) e Espectroscopia de Estrutura Fina de Absorção de Raio-X (XAFS). *S. nidulans* demonstrou maior sensibilidade ao As(III) com valor de EC_{50,96h} (6,64 mg/l) menor em c. 400 comparado ao As(V). Mesmo com a concentração de As(V) sendo 67 vezes maior que a de As(III), os níveis de As intracelular (60,0 µg/g) foram os mesmos. A espécie As(V) predominou sobre o As(III) intracelular. Monometil e dimetilarsênio, bem como e outras espécies orgânicas intracelulares foram observados em maiores proporções sob exposição ao As(III), possivelmente por ser este o segundo intermediário na via de biometilação. A proporção de espécies orgânicas intracelulares encoraja a continuidade dos estudos com *S. nidulans* em condições similares às ambientais para avaliação do seu potencial como agente de biotransformação e descontaminação por As.

1. Introdução

A contaminação por As é um problema de proporções mundiais. Atividades industriais como a mineração ou construção de poços artesianos em formações geológicas arseníferas são fontes conhecidas de dispersão deste metalóide no ambiente. Suas concentrações típicas são menores que 10 µg/l, (Smedley e Kinniburgh, 2002) níveis mais elevados podem ser encontrados em águas subterrâneas (Borba et al., 2003). A biogeoquímica do arsênio é complexa e envolve sua transformação em diversas espécies. É esperado que em condições aeróbicas o arseniato (H_2AsO_4^- e/ou HAsO_4^{2-}) seja predominante, e o arsenito [$\text{As}(\text{OH})_3$] predomine em condições redutoras. No entanto, a atividade microbiana exerce forte influencia sobre a disponibilidade e especiação do As. Por exemplo, em lagos, são registrados eventos de predominância do As(III) no epilímnio, atribuídos à absorção, redução e excreção do As pelas florações fitoplanctônicas (Kuhn e Sigg, 1993; Hellweger e Lall 2004). Assim, ambas as formas As(III) e As(V) podem tornar-se disponíveis mesmo em ambientes aeróbicos, e representam uma ameaça à saúde ambiental, por sua elevada toxicidade.

Elementos tóxicos, ao contrário de compostos orgânicos, não podem ser destruídos. Assim, os processos envolvendo sua remediação objetivam sua imobilização na forma de resíduos não-biodisponíveis, ou a sua biotransformação em formas menos danosas ao ambiente (Valls and Lorenzo, 2002). A possibilidade de utilização de micro-organismos em tecnologias limpas de descontaminação ambiental tem impulsionando a prospecção de espécies resistentes, capazes de realizar a biotransformação do As. Nessa área de pesquisa, as cianobactérias foram um interessante grupo de organismos devido à sua posição dominante em ambientes aquáticos impactados por diferentes tipos de poluentes (Tlili et al, 2011;. Su et al, 2012.). Estudos recentes tem demonstrado o papel de diversas espécies de cianobactérias como agente de biotransformação dos oxianions As(III) e As(V) em formas orgânicas (Guo et al., 2011, Yin et al., 2011).

Os mecanismos de desintoxicação por arseniato [As(V)] incluem a absorção, redução e efluxo na forma de arsenito [As(III)] ou formas metiladas, como monometilarsênio (MMA) e dimetilarsênio (DMA) (Rosen, 2002). Outros compostos como arsenoaçúcares são também produzidos em cianobactérias (Miyashita et al., 2012). O primeiro passo da via de biotransformação do As é a sua redução a As(III) pela arseniato redutase (Li et al., 2003; Pandey et al., 2013). Posteriormente, a metiltransferase catalisa a transferência do grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) para o As(III) (Shen et al., 2013). Tanto em organismos eucariontes ou procariontes a metilação é reconhecida como um mecanismo de desintoxicação já que formas menos tóxicas de As são produzidas nesse processo. Em conjunto

com a metilação, outro mecanismo de desintoxicação realizado por cianobactérias é a imobilização do As intracelular (Ybarra e Web, 1998). Moléculas contendo resíduos de cisteína, como o tripeptídeo glutationa (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine), são compostos-chave nesse processo em razão da elevada afinidade do As(III) por grupos sulfidríla (Shen et al., 2013).

A maioria dos estudos de interação do As com cianobactérias trabalham espécies formadoras de blooms provenientes de lagos eutrofizados (Guo, 2011; Wang et al., 2013, Huang et al., 2014). Para todos os metais e metalóides encontrados no ambiente existem transportadores e genes específicos que coordenam sua movimentação, já que os microorganismos passaram por períodos de exposição a tais elementos desde a origem da vida (Silver, 1996). Mais recentemente, a mobilização antropogênica de metais resultou na criação de novos nichos enriquecidos por metais com elevada pressão seletiva para organismos resistentes a essa condição (Valls e Lorenzo, 2002).

Considerando-se a hipótese de que cepas de cianobactérias provenientes de locais contaminados sejam mais resistentes ao As e possuem diversos mecanismos de desintoxicação/biotransformação desse metalóide, esse trabalho teve por objetivo analisar quais os compostos de As são formados como produto do metabolismo de *Synechococcus nidulans* (Pringsheim) Komárek, proveniente de um curso d'água em área de mineração contaminado por As. Para isto, foram utilizadas a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Hifenada a Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (HPLC-ICP-MS) e a Espectroscopia de Estrutura Fina de Absorção de Raio-X (XAFS). A última é uma técnica elemento-específica e fornece informações principalmente sobre o estado de oxidação do elemento alvo por meio da Espectroscopia de Alta Resolução da Borda de Absorção (XANES) e ambiente de coordenação através da Espectroscopia da Estrutura Fina de Absorção (EXAFS).

2. Materiais e Métodos

2.1 . Obtenção da cultura

Synechococcus nidulans foi isolada a partir de amostras de água coletadas em um córrego localizado a jusante de uma planta de tratamento de ouro no município de Nova Lima (19° 58' 74.8" S; 43° 49' 25,9" L), estado de Minas Gerais. Utilizaram-se os métodos de micropipetagem e plaqueamento para obtenção de culturas unialgais (Allen, 1973), mantidas no banco de cultura de algas do Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática,

em meio líquido BG-11. A identificação taxonômica foi realizada com base em características morfológicas (Santa'Anna et al., 2007).

2.2 Inibição do crescimento

Testes de inibição do crescimento foram conduzidos de acordo com o guia para testes de inibição de crescimento em cianobactérias e algas da OCDE (Organization for Economic Cooperation and Development, protocolo 201). O crescimento celular foi medido diariamente por meio da densidade de células e densidade óptica (OD) a 631 nm, definido em uma varredura de 400 a 700 nm.

Culturas de *S. nidulans* (150 ml) foram preparadas em erlenmeyers, mantidas sob luz e agitação constantes. Ao atingir o crescimento exponencial as culturas, em triplicatas, foram expostas a As(V) e As(III) nas séries de concentrações: 500; 900; 1620; 2916 mg/l As(V), e 4,8; 5,5; 6,3; 7,3, e 8,4 mg/l. Os sais $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e NaAsO_2 foram utilizados como fonte de As. As concentrações para a faixa de toxicidade foram estabelecidas em teses prévios. As taxas de crescimento foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{dia}^{-1})$$

Onde:

μ é a média da taxa específica de crescimento do tempo i ao tempo j em dias

X_i é a biomassa em n° de células ml no tempo i

X_j é a biomassa em n° de células ml no tempo j

O cálculo para a percentagem de inibição no crescimento para cada réplica foi realizado a partir da equação:

$$\%I_r = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times (100)$$

Onde:

$\% I_r$ é percentagem de inibição da taxa específica de crescimento média;

μ_c é a média da taxa de crescimento no grupo controle;

μ_t é a média da taxa de crescimento nas réplicas dos tratamentos;

As taxas de crescimento em cada teste foram comparadas com o controle, utilizando-se a análise de covariância ($p < 0.05$). As concentrações inicial e final de arsênio no meio de cultivo foram determinadas por ICP-OES e comparadas utilizando-se o teste t para médias pareadas ($p < 0.05$). A $EC_{50;96h}$ foi calculada por regressão não linear usando uma equação com

quatro parâmetros logísticos restrita ao intervalo (0, 1). As concentrações foram log-transformadas. Os erros padrão foram estimados por bootstrap não paramétrico e o intervalo de confiança de 95% foi calculado usando o método bootstrap de percentual ajustado (Efron & Tibshirani, 1986; Nyholm, 1992).

2.3. Experimentação

Meio de cultivo BG-11 (pH 7.5) foi preparado e distribuído em volumes de 1500 ml em erlenmeyers. Após a autoclavagem foi adicionada solução de arseniato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) recém preparada para obtenção da concentração final de 400 mg/l de As(V). O mesmo procedimento foi realizado adicionando-se arsenito de sódio (NaAsO_2) para a obtenção da concentração final de 6 mg/L de As(III). Os tratamentos consistiram de culturas de células em triplicata expostas ao As(III) ou As(V). Os controles consistiram de duplicatas contendo o meio de cultivo nas mesmas concentrações de As(III) ou A(V), sem inoculação, para avaliação da oxido-redução das espécies químicas por outros fatores que não o metabolismo da cianobactéria.

Para inoculação dos meios, culturas foram centrifugadas e adicionadas, obtendo-se a concentração final de células de 7×10^7 . Todas as unidades experimentais foram constantemente aeradas e homogeneizadas com ar filtrado ($0,47\mu\text{m}$) e mantido sob iluminação constante proveniente de lâmpadas frias.

Amostras do sobrenadante foram coletadas no tempo inicial e final para determinação do As total no meio de cultivo, as médias foram comparadas pelo teste t para médias pareadas. Para análise na biomassa do arsênio total e especiação química após 30 dias (tempo final) a biomassa foi centrifugada e armazenada à temperatura de -80° . Posteriormente foram liofilizadas (L101, Liobras). Para determinação de As total, amostras de 25 mg de biomassa liofilizada foram mineralizadas pela adição de 3 ml de HNO_3 (96%) e 1 ml de H_2O_2 (30%) seguida da digestão em microondas (ETHOS One model, Milestone Microwave Systems, Shelton, USA) a 200°C por 30 min a 45 bar. O volume final foi ajustado para 25 ml (Truus, et al. 2007). As concentrações de arsênio total foram determinadas em ICP-OES (Perkin Elmer Optima 4300 DV), no laboratório de Análises Químicas do Departamento de Metalurgia – UFMG.

2.4. Especificação química

Amostras de 50 mg de pellet liofilizado foram adicionadas a 10 ml do extrator composto por HNO₃ a 2% e metanol a 2%, e ficaram sob agitação rotacional (Tecnal TE 165, Brasil) por 16 h seguido de banho-maria a 60°C por 2.5 h (Batista et al., 2011). As amostras foram filtradas em filtro de celulose (0,20 µm). O sobrenadante dos tratamentos foi filtrado e diluído também na solução extratora. As medidas foram realizadas em um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS) (Elan DRC II PerkinElmer, Norwalk, CT), utilizando-se coluna de troca aniônica (PRP X-100, Hamilton, Reno, NV, USA). A fase móvel consistiu de 10 mM HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻ (98% V:V) + metanol 2% (v/v), pH 8,5. As análises foram realizadas no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

2.5. Análise da coordenação do As.

As medidas de XAFS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS; Campinas/SP) para as amostras de biomassa, previamente lavada com água destilada e liofilizada. Os padrões de arsênio utilizados foram o As(V) (Na₂HAsO₄·7H₂O) e arsenito As(III) (NaAsO₂) respectivamente para as ligações As^v-O e As^{III}-O, enquanto que DMA [(CH₃)₂AsO₂H] foi utilizado para ligação As-C. Estes foram preparados em solução aquosa na concentração de 0.1 M, ou padrão cristalino preparando-se uma pastilha com 0.4 g do composto de arsênio adicionado a 0.6 g de nitreto de boro. Como padrão da ligação As-S utilizou-se o complexo As(GS)₃ recém preparado utilizando GSH e As(III) na proporção molar de 1:4.

Os dados de XAFS para a borda K do As (11 868 eV) foram coletados na linha de luz XAFS 2, monocromador duplo-cristal Si (111) e detector de câmara de ionização. As medidas foram realizadas no modo de transmissão para amostras de padrões ou no modo de fluorescência para a amostra de biomassa à temperatura de 5 K utilizando-se dedo frio. A energia de calibração foi monitorada durante a coleta de dados por aquisição de referencia de uma folha de ouro para as medidas do espectro do As. Para subtração de fundo, transformada de Fourier e ajuste dos dados, foi utilizado o programa Athena (Ravel e Newville, 2005).

Resultados

4.1. Inibição do crescimento

As taxas de crescimento decresceram gradualmente com aumento da concentração do As ($p < 0,05$) (figura 1). Sob exposição ao As(V) (figura 1 A) houve diminuição do crescimento em concentrações maiores em duas ordens de grandeza comparado ao As(III) (figura 1B), demonstrando maior sensibilidade ao As(III) ($p < 0,05$).

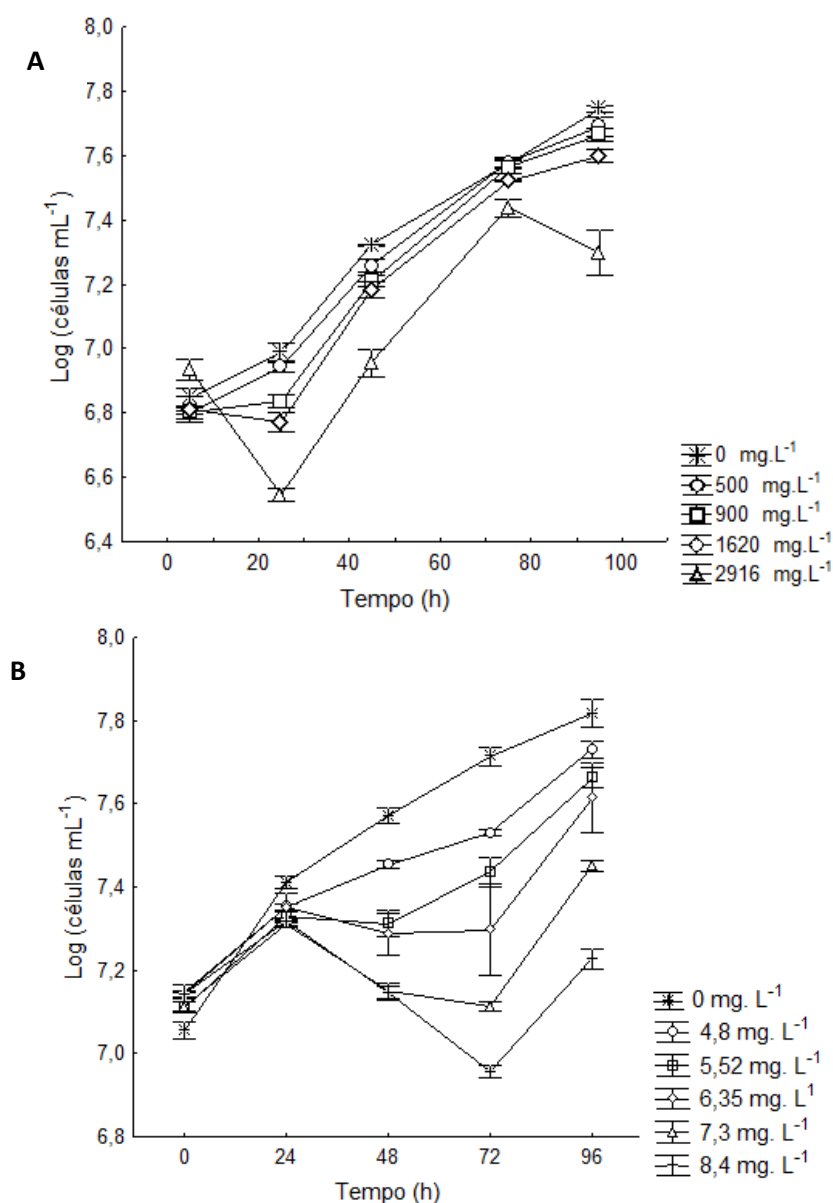


Figura 1. Curvas de crescimento de *S. nidulans* sob concentrações crescentes de (A) As(V); (B) As(III), por 96 h. Controle: n=4, testes: n=3, $p < 0,05$, análise de co-variância.

As concentrações que reduzem efetivamente o crescimento de *S. nidulans* em 50% ($EC_{50;96h}$) foram determinadas, sendo de 2642,97 mg/l As(V), com limite de confiança (95%) entre 2372,7 e 2840,9. Para As(III) foi de 6,64 mg/l com limite de confiança entre 6,30 e 7,14 mg/l. As curvas dose-resposta são apresentadas na figura 2.

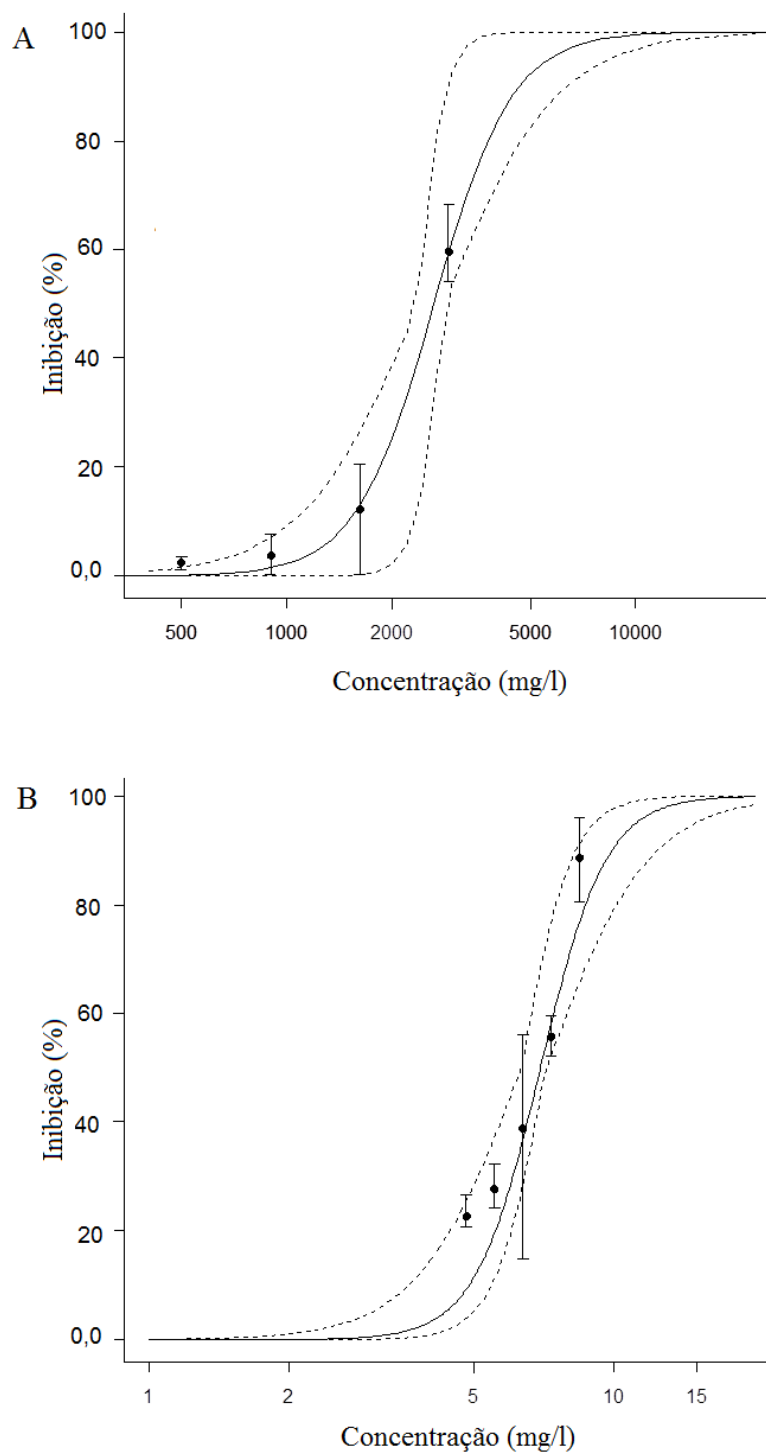


Figura 2. Percentagem de inibição do crescimento de *S. nidulans* sob exposição ao arsênio, 96 h. (A) As(V) (B) As(III).

As concentrações de As no meio de cultivo (tabela 1) permaneceram constantes ($p > 0,05$, teste t para médias pareadas) após 96 h.

Tabela 1. Concentrações de As inicial e após 96 h no meio de cultivo em teste de toxicidade.

| | Testes (mg/l) | [As] inicial no meio (mg/l) | [As] final no meio de cultivo (mg/l) |
|---------|------------------|--------------------------------|---|
| As(V) | 500 | 589,86 ± 17,14 | 545,97 ± 4.35 |
| | 900 | 990,49 ± 12,83 | 946,63 ± 6.06 |
| | 1620 | 1861,58 ± 25,52 | 1824,98 ± 33.99 |
| | 2916 | 3228,12 ± 53,12 | 3274,88 ± 50.6 |
| As(III) | 4,80 | 4,51 ± 0.05 | 4,53 ± 0.14 |
| | 5,52 | 5,13 ± 0.18 | 5,52 ± 0.36 |
| | 6,35 | 5,86 ± 0.20 | 6,08 ± 0.11 |
| | 7,29 | 7,11 ± 0.19 | 6,95 ± 0.10 |

Valores médios ± erro padrão.

4.2. Especificação química

Nos controles da especificação de As(III) foi encontrada somente a espécie As(V) (figura 3), demonstrando oxidação do As(III) em 30 dias. Como esperado, somente As(V) foi encontrado no controle da especificação dessa espécie química.

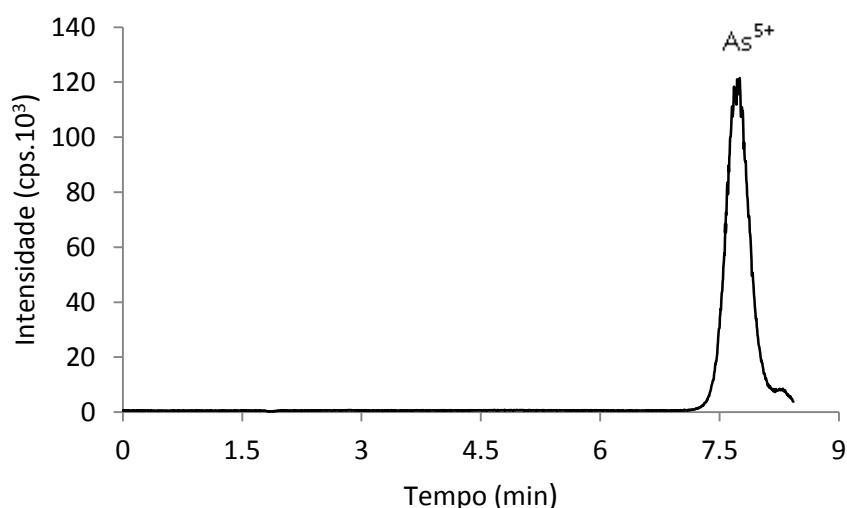


Figura 3: Cromatograma obtido em HPLC-ICP-MS, para controle da especificação de As(III).

Em exposição a As(V), foram encontradas diferentes espécies de As na biomassa (figura 4), sendo a maior parte de As(V), seguida de As(III). A espécie AsB teve o mesmo tempo de retenção da arsenobetaina, possivelmente trata-se de uma espécie orgânica, a qual

necessita mais estudos para identificação. As espécies metiladas (mono e dimetilarsênio) foram detectadas em menores proporções.

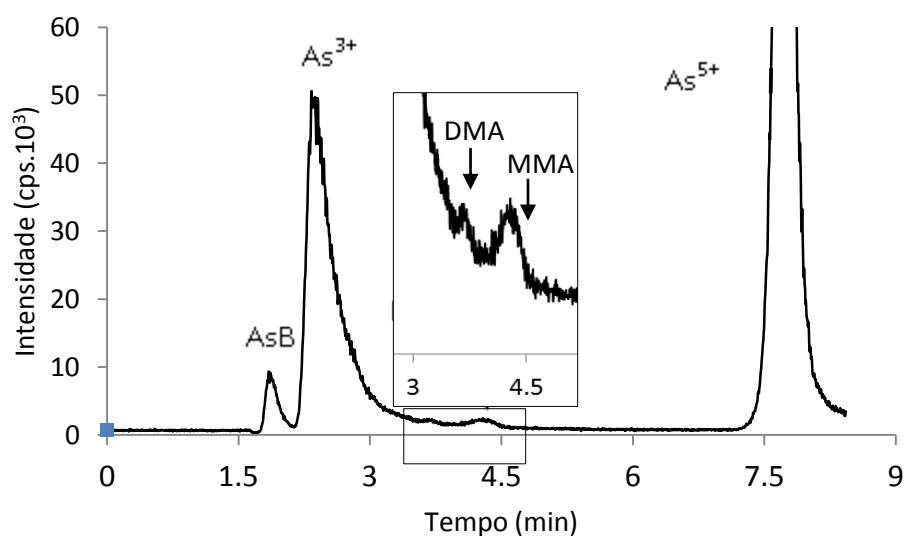


Figura 4: Cromatograma obtido em HPLC-ICP-MS, para biomassa de *S. nidulans* exposta ao As(V), com a expansão para as espécies que aparecem entre os tempos de 3 e 4.5 min.

Similarmente em exposição ao As(III), As(V) foi a espécie dominante intracelularmente (figura 5). Destacou-se a maior intensidade do sinal referente à AsB e dimetilarsênio. Outras espécies tais como o monometilarsênio e espécies orgânicas não identificadas (X) foram detectadas. As percentagens das espécies de As do total extraído encontram-se na tabela 3.

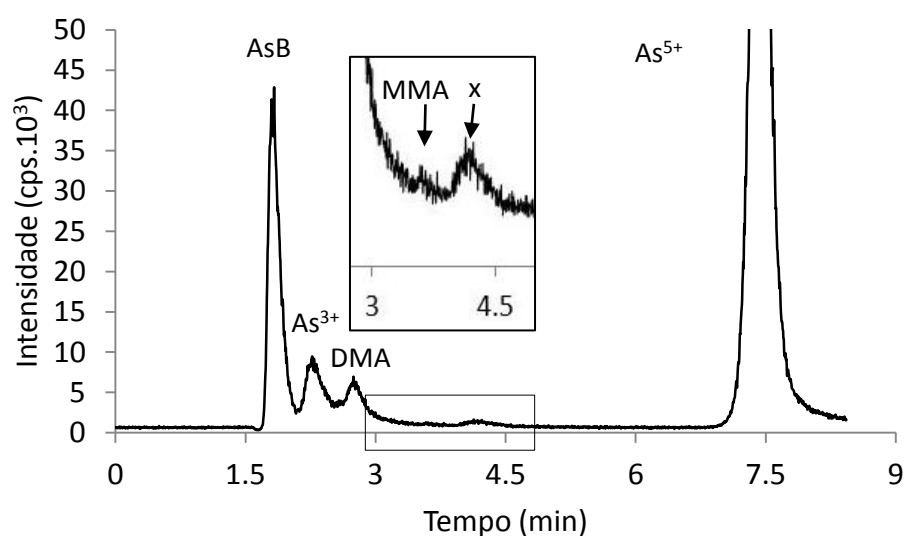


Figura 5: Cromatograma obtido em HPLC-ICP-MS, para biomassa de *S. nidulans* exposta ao As(III), com a expansão para as espécies que aparecem entre os tempos de 3 e 4,5 min.

Tabela 2: Percentagem das espécies de As do total extraído encontradas na biomassa, sobrenadante (SN) e controle.

| | AsB | As(III) | DMA | MMA | Espécie X | As(V) |
|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|---------------|
| As(III) biomassa | 12,11 ± 2,84 | 6,28 ± 1,79 | 3,49 ± 0,62 | 1,01 ± 0,13 | 0,86 ± 0,15 | 76,21 ± 4,83 |
| As(III) SN | 0,14 ± 0,003 | - | 0,14 ± 0,003 | 0,42 ± 0,08 | 0,38 ± 0,24 | 98,82 ± 0,14 |
| As(III) controle | - | - | - | - | - | 100 |
| As(V) biomassa | 2,62 ± 0,35 | 34,97 ± 1,99 | - | 2,20 ± 0,058 | - | 60 ± 2,28 |
| As(V) SN | - | - | 0,13 ± 0,068 | - | - | 99,86 ± 0,067 |
| As(V) controle | - | - | - | - | - | 100 |

Valores em percentagem do total extraído

Embora uma fração do As tenha sido absorvida, a produção de biomassa no decorrer de 30 dias (0,4 mg/l) foi insuficiente para produzir variações significativas nas concentrações de As total no meio de cultivo (Teste t para médias pareadas, $p > 0,05$) (tabela 4).

Tabela 3. Determinação das concentrações de As total por ICP-OES.

| Tratamentos | [As] Nominal (mg/L) | [As] inicial (mg/L) | [As] final (mg/L) | [As] biomassa (µg/g) |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|----------------------|
| As(III)+ <i>S. nidulans</i> | 6 | 5,83 ± 0,048 | 5,78 ± 0,014 | 61,61 ± 8,43 |
| As(III) controle | 6 | 6,09 ± 0,007 | 5,87 ± 0,023 | - |
| As(V) + <i>S. nidulans</i> | 400 | 416,3 ± 4,75 | 421,46 ± 19,91 | 60,11 ± 1,37 |
| As(V) controle | 400 | 404,86 ± 1,42 | 402,72 ± 4,19 | - |

Médias ± SE.

2.4. Análise da coordenação do As

O espectro de XANES dos padrões cristalinos e aquosos de As(III) e As(V) não apresentaram diferenças, indicando que a estrutura do arsênio em solução permanece preservada como no padrão cristalino (figura 6).

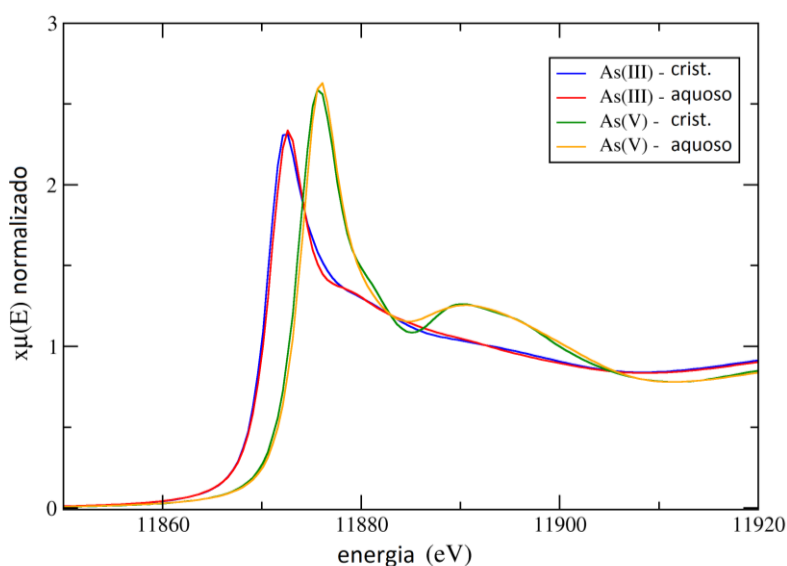


Figura 6. espectro de XANES da borda K do As para os padrões aquosos e cristalinos (crist.) do As(III) e As(V).

A transformada de Fourier (TF) da região do EXAFS do espectro de absorção da borda K do As obtido para o sobrenadante da cultura exposta ao As(V) mostra que a espécie química predominante é o As(V), $[\text{HAsO}_4^{2-}]$ ou $[\text{H}_2\text{AsO}_4^-]$, coordenado com quatro átomos de oxigênio, apresentando o mesmo padrão da TF das oscilações do padrão As(V) aquoso (figura 7). Outras espécies detectadas por HPLC-ICP-MS estiveram em concentrações insuficientes para produzir variações nas oscilações EXAFS.

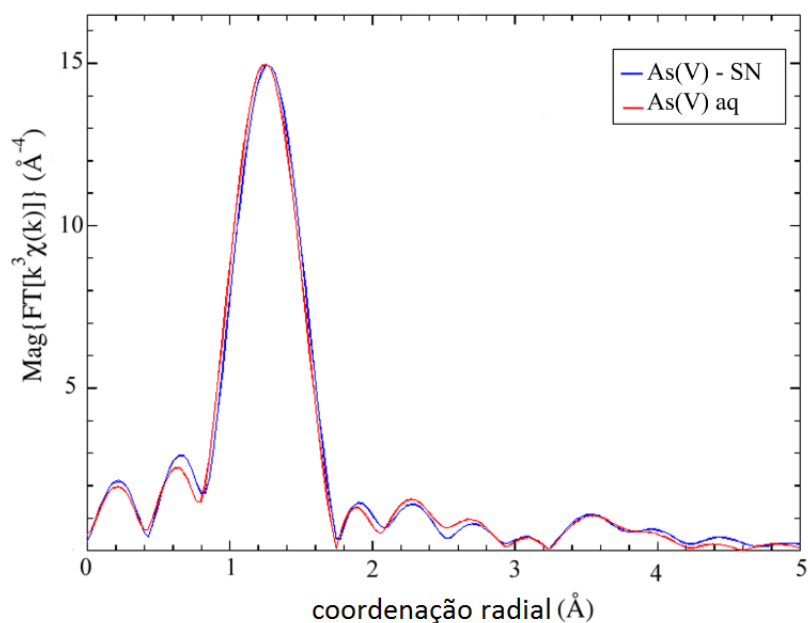


Figura 7. Transformada de Fourier das oscilações de EXAFS para o padrão de As(V) aquoso [As(V)aq] e o sobrenadante das culturas tratadas com As(V) [As(V)-SN] após 30 dias.

O espectro de XANES para a borda K do As intracelular foi comparado com os padrões de As ligado covalentemente ao oxigênio, carbono e enxofre, que são as prováveis ligações resistentes nos compostos de As intracelular (Figura 8).

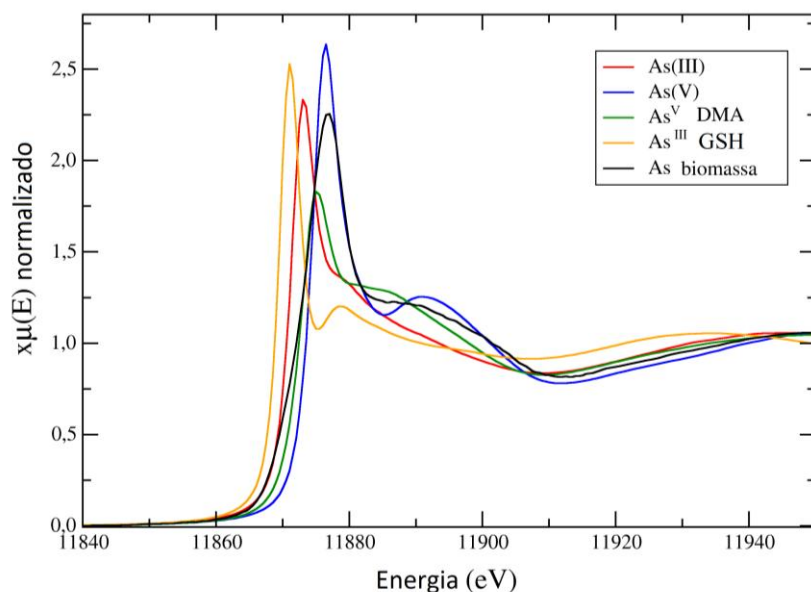


Figura 8. espectro de XANES da borda K do As na biomassa e dos padrões de As(III), As(V), DMA, As(GS)₃, para as ligações de As⁵⁺-O; As³⁺-O; As-C; e As-S.

O ajuste do espectro de XANES da borda K do As obtido da amostra de biomassa sob exposição ao As(V) mostra que uma fração de 34% do As na biomassa possui $n_{ox} + 3$ e 66% possui $n_{ox} + 5$ (Figura 9).

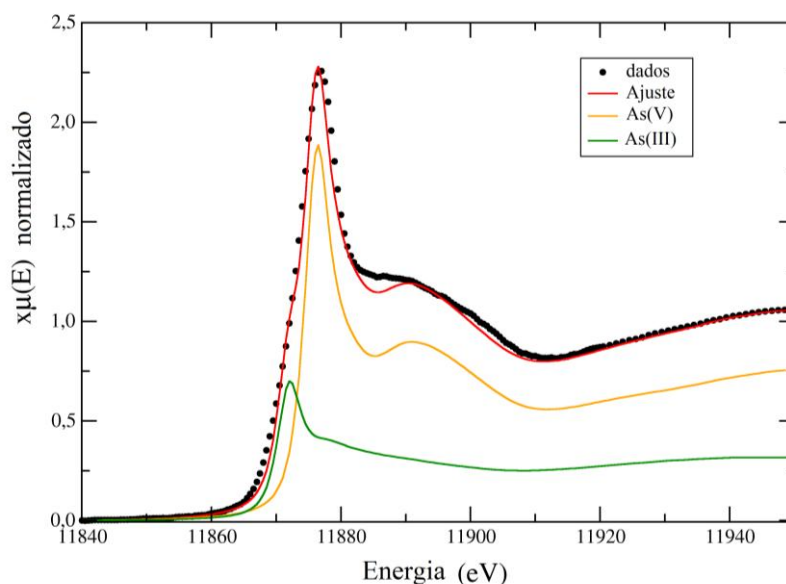


Figura 9. Ajuste do espectro de XANES da borda K do As para a biomassa de *S. nidulans* exposta ao As(V) (em vermelho), e os padrões de As(V) em amarelo e As(III) em verde. O ajuste realizado para o espectro de As intracelular indicou 66% de As com $n_{ox} + 5$ e 34% com $n_{ox} + 3$.

3. Discussão

Os valores de EC_{50} obtidos neste estudo confirmam que a toxicidade do arsênio está fortemente relacionada com seu estado de oxidação, sendo o As(III) c. 400 vezes mais tóxico que o As(V). Em cianobactérias parece haver um padrão com As(III) mais tóxico em pelo menos cinco vezes comparado ao As(V). *M. aeruginosa* apresentou queda na taxa de crescimento em concentrações de As(III) maiores que 0.75 mg/l e para As(V) não houve inibição em concentrações elevadas em duas ordens de grandeza (Gong, et al. 2011). *Anabaena doliolum* apresentou CE_{50} de 4345 mg/l para As(V) e de 824 mg/l para As(III) (Srivastava et al. (2009). *S. nidulans* foi consideravelmente mais sensível ao As(III), demonstrando que a toxicidade do As varia fortemente com a espécie de cianobactéria. As diferenças químicas e estruturais entre os oxidânicos de As(III) e As(V) se refletem nos valores de CE_{50} e efeitos intracelulares. A toxicidade do As(V) está relacionada à bioquímica do fosfato, por exemplo, competindo pelos transportadores de transmembrana, desacoplando a fosforilação oxidativa (Gresser, 1981) e substituindo os grupos fosfato dos lipídios de membrana (Tuan et al., 2008), enquanto que para As(III), a via de entrada são as aquagliceroporinas, uma família de proteínas presente também em cianobactérias responsáveis pelo transporte de moléculas neutras como o glicerol (Liu et al., 2002). Intracelularmente, um dos principais mecanismo de toxicidade do As(III) é a desnaturação de proteínas por ligação aos grupos sulfidríla (Shen et al., 2013).

O crescimento de *S. nidulans* sob exposição a ambas as espécies de As, decresceu nos estágios preliminares e foi retomado, respectivamente, a partir de 24 e 72h (figura 1). Esse comportamento demonstra um efeito inicial bacteriostático o qual pode ser compensado por mecanismos celulares de resistência como mudanças na expressão gênica e na atividade de enzimas como a Redutase do Arseniato (Pandey et al., 2012), que resultam na retomada do crescimento. Comportamento similar a *S. nidulans* sob exposição ao As(III) foi observado em *Microcystis aeruginosa*, retomando o crescimento a partir do 7º dia de exposição a 3,8 mg/l As(III) (Wang et al., 2013). Enquanto sob exposição ao As(V), *S. nidulans* apresentou comportamento similar ao de *Anabaena* sp. cultivada na CE_{50} de 3000 mg/l As(V), retomando o crescimento a partir de 24 h (Pandey et al., 2012).

Quando o As(III) é adicionado ao meio a absorção é facilitada por suas características físicas e químicas. Neste estudo, o mesmo nível de absorção de As intracelular foi encontrado mesmo com as concentrações de As(III) sendo menores em c. 67 vezes comparado ao As(V). A maior parte do As intracelular foi encontrado na forma de As(V). Mecanismos de redução e formação de As(III) ocorreram com mais frequência sob exposição ao As(V), enquanto que a metilação e produção de outras espécies orgânicas se destacaram sob exposição ao As(III), em

que foi detectada intracelularmente uma espécie orgânica com o mesmo tempo de retenção da arsenobetaina ($C_5H_{11}AsO_2$), um zwitterion com uma carga positiva no átomo de arsênio e uma carga negativa no grupo carboxila. A separação cromatográfica depende do pH. A coluna de troca aniônica é adequada para separação de espécies presentes como ânions tais como As(V), MMA, e DMA, e a espécie neutra As(III). Espécies de natureza catiônica tais como arsenocolina, oxido de trimetilarsina e arsenobetaina são separadas de forma mais apropriada em uma coluna de troca catiônica (Leermakers et al., 2006). Portanto técnicas mais específicas, tais como cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por “eletrospray” (HPLC-ESI-MS/MS), são necessárias para identificação das demais espécies de arsênio encontradas intracelularmente.

S. nidulans mostrou-se capaz de biotransformar espécies inorgânicas de As em espécies orgânicas intracelularmente em proporções elevadas comparadas a outras espécies de cianobactérias (tabela 5). A extrusão do oxiânion As(III) e espécies metiladas podem ocorrer em cianobactérias sob exposição ao As(V) (Guo et al., 2011). No entanto, nas condições oxidantes adotadas estudo, ainda que o As(III) esteja sendo excretado, a possibilidade de oxidação deve ser considerada. A oxidação das espécies de As pode demorar semanas ou até meses. Em condições oxidantes (Eh +200 mV), temperatura ambiente, pH=8.4, a oxidação de 80% do As(III) em concentração de 10 µg/L ocorreu em 8 dias (Samanta and Clifford, 2005). Em água destilada e desmineralizada, o As(III) e As(V) permaneceram em proporções constantes por três semanas sem a realização de procedimentos para excluir oxigênio da amostra (Tallman and Shaikh, 1980). Moléculas orgânicas do arsênio (MMA e DMA) são estáveis em água durante 5 a 6 meses (Jókai et al., 1998).

Tabela 4: Espécies de As intracelulares em algumas espécies de cianobactérias.

| Espécie de cianobactéria | tempo (dias) | Espécie adicionada ao meio | As(V) | As(III) | DMA + MMA | AsB | Referencia |
|---|--------------|----------------------------|---------|---------|-----------|------|-------------------|
| <i>Synechococcus</i> | 30 | As(III) | 76 | 6,2 | 4,5 | 12,1 | Este trabalho |
| | 30 | As(V) | 60 | 34,9 | 2,2 | 2,5 | |
| <i>Microcystis</i> sp. <i>Nostoc</i> sp. <i>Synechocystis</i> sp. | 14 | As(III) | 81 a 84 | 10 a 15 | 2 a 5 | ---- | Yin et al., 2011 |
| <i>M. aeruginosa</i> | 15 | As(III) ou As(V) | 78 a 93 | 6 a 21 | < 1 | ---- | Wang et al., 2013 |

Valores em percentagem.

A soma das frações de diferentes espécies de As nos sobrenadantes e controles resultou em uma média de $104\% \pm 13\%$ do total de As determinado por ICP-OES, enquanto que para o total de As intracelular, a extração foi de 5%. Apesar desse baixo rendimento, os limites de detecção (40 fg/g) não limitaram a análise da especiação. É provável que a abertura das células não tenha ocorrido eficientemente e que uma fração do As possa ter permanecido no espaço das membranas dos tilacóides, densamente organizados em *S. nidulans* (Šmarda et al., 2002). Rendimento da extração de 10% foi observada em *E. gracilis* e atribuído aos compostos de As presentes nas membranas e organelas (Halter et al., 2012).

Técnicas baseadas em radiação síncrotron tem se mostrado eficientes em estudos de especiação em amostras biológicas (Perez et al., 2014, Miot et al., 2008) por não ser necessário realizar a extração do As, o que contribui enormemente para a preservação das espécies químicas. A proporção das diferentes espécies de As na biomassa obtida pela espectrometria de massas foi consistente com o ajuste dos espectros XANES para a borda K do As. No entanto a análise da coordenação pela técnica de EXAFS ainda possui limitações tais como a concentração de As na amostra, e a energia do feixe de luz, o que dificulta a determinação da coordenação do átomo-alvo.

Nesse estudo foram determinadas as EC_{50} de As(III) e As(V) para a espécie *S. nidulans*, em que o As(III) mostrou-se mais tóxico em c. 400 vezes. Portanto, quantificar apenas o As total não permite avaliar os riscos de toxicidade no ambiente aquático, sendo fundamental avaliar também o estado redox deste semimetal. *S. nidulans* é capaz de absorver e biotransformar arsênio inorgânico em espécies metiladas e outras espécies orgânicas em proporções elevadas comparadas a outras espécies de cianobactérias, o que encoraja a continuidade dos estudos com este modelo biológico em condições similares às ambientais, para avaliar o seu potencial de agente de descontaminação de águas residuárias de atividade de mineração.

4. Referências

Allen, M. M., 1973. Methods for cyanophyceae, in: Stein J.K. (Ed.), Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press Inc., New York, pp. 127-138.

Borba, R. P., Figueiredo, B. R., & Matschullat J. A. 2003. Geochemical distribution of arsenic in waters, sediments and weathered gold mineralized rocks from Iron Quadrangle, Brazil. Environ. Geol. 44, 39–52.

Batista B. L., Souza J. M. O., De Souza S., Barbosa Jr. F. Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption. *J. Hazard. Materials*, 191, 342–348.

Efron, B & Tibshirani, R. 1986. Bootstrap Methods for Standard Errors, Condence Intervals, and Other Measures of Statistical Accuracy. *Statistical Science*, 54-77.

Gong, Y., Ao, H., Liu, B., Wen, S., Wang, Z., Hu, D., Liu, J. 2011. Effects of inorganic arsenic on growth and microcystin production of a *Microcystis* strain isolated from an algal bloom in Dianchi Lake, China. *Chin. Sci. Bulletin*, 56, 2337–2342.

Gresser, M. J., 1981. ADP-Arsenate formation by submitochondrial particles under phosphorylating conditions. *The journal of biological chemistry*. (25), 5981–5983.

Guo, P., Gong, Y., Wang, C., Liu, X., & Liu, J. 2011. Arsenic speciation and effect of arsenate inhibition in a *Microcystis aeruginosa* culture medium under different phosphate regimes. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1754–1759.

Kuhn A & Sigg L. 1993. Arsenic cycling in eutrophic Lake Greifen, Switzerland. *Limnol. Oceanogr.* 39, 1993, 1052-1059.

Halter, D., Casiot, C., Heipieper, H.J., Plewniak, F., Marchal, M., Simon, S., Arsène-Ploetze, F., Bertin, P.N., 2012. Surface properties and intracellular speciation revealed an original adaptive mechanism to arsenic in the acid mine drainage bio-indicator *Euglena mutabilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 1735–44.

Hellweger, F.L., Lall, U., 2004. Modeling the effect of algal dynamics on arsenic speciation in Lake Biwa. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6716–6723.

Huang, W. J., Wu, C. C., Chang, W. C. (2014). Bioaccumulation and toxicity of arsenic in cyanobacteria cultures separated from a eutrophic reservoir. *Environ. Monit. Assess.* 186, 805–14.

Jókai, Z., Hegoczki, J., Fodor, P., 1998. Stability and optimization of extraction of four arsenic species. *Microchem. J.* 59, 117–124.

Leermakers, M., Baeyens, W., De Gieter, M., Smedts, B., Meert, C., De Bisschop, H.C., Morabito, R., Quevauviller, P., 2006. Toxic arsenic compounds in environmental samples: speciation and validation. *Trends Anal. Chem.* 25, 1–10.

Li, R., Haile, J. D., & Kennelly, P. J. 2003. An Arsenate Reductase from *Synechocystis* sp . strain PCC 6803 exhibits a novel combination of catalytic characteristics, 185, 6780–6789.

Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J. M., Mukhopadhyay, R., Agre, P., Rosen, B. P., 2002. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (9), 6053-6058.

Miot, J., Morin, G., Skouri-Panet, F., Férard, C., Aubry, E., Briand, J., Wang, Y., Ona-Nguema, G., Guyot, F., Brown, G.E., 2008. XAS study of arsenic coordination in *Euglena gracilis* exposed to arsenite. *Environ. Sci. Technol.* 2, 5342–5347.

- Miyashita S, Fujiwara S., Tsuzuki, M., Kaise T. 2012. Cyanobacteria produce arsenosugars. *Environ. Chem.*, 9, 474–484.
- Nyholm, N; Sørensen,PS; Kusk,KO & Christensen,ER. 1992. Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11, 157–167.
- Oecd Guideline 201. 2006. Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris.
- Pandey, S., Rai, R., Rai, L.C., 2012. Proteomics combines morphological, physiological and biochemical attributes to unravel the survival strategy of *Anabaena* sp. PCC7120 under arsenic stress. *J. Proteomics* 75, 921–37.
- Pandey, S., Shrivastava, a K., Singh, V.K., Rai, R., Singh, P.K., Rai, S., Rai, L.C., 2013. A new arsenate reductase involved in arsenic detoxification in *Anabaena* sp. PCC7120. *Funct. Integr. Genomics* 13, 43–55.
- Pérez C. A.; E. X. Miqueles, Pérez R. D. Bongiovanni G. A. Synchrotron-based x-ray spectroscopy and x-ray imaging applied to the study of accumulated arsenic in living systems. In: *One Century of the Discovery of Arsenicosis in Latin America (1914-2014)*. Ed.: Litter M. I., Nicoli H. B., Meichtry J. M., Quici N., Bundschuh J., Bhattacharya P. & Naidu R. 2014. Taylor & Francis group, London.
- Ravel, B., Newville, M., 2005. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J. Synchrotron Radiat.* 12, 537–41.
- Rosen, B.P., 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* 529, 86–92.
- Samanta, G., Clifford, D.A., 2005. Preservation of inorganic arsenic species in groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8877–8882.
- Santa'Anna, C. L., Melcher, S. S., Carvalho, M. C., Gemelgo, M. P., & Azevedo, M. T. P. 2007. Planktic Cyanobacteria from upper Tietê basin reservoirs , SP, Brazil. *Bras. J. Botany*, 1, 1-17.
- Shen S., Li X., Cullen W. R., Weinfeld M. & Le X. C. 2013. Arsenic Binding to Proteins. *Chem. Rev.*, 113, 7769–7792.
- Silver S 1996. Genes for all metals—a bacterial view of the Periodic Table. The 1996 Thom Award Lecture. *J Ind. Microbiol. & Biotechnol.*, 20, 1–12.
- Šmarda, J., Šmajš, D., Komrska, J., Krzyžánek, V., 2002. S-layers on cell walls of cyanobacteria. *Micron* 33, 257–277.
- Smedley, P., Kinniburgh, D., 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem.* 17, 517-568.
- Srivastava, A. K., Bhargava, P., Thapar, R., & Rai, L. C., 2009. Differential response of antioxidative defense system of *Anabaena doliolum* under arsenite and arsenate stress. *J. Basic Microbiol.* 49, S63-S72.

Su, Y., Liu, H., & Yang, J., 2012. Metals and metalloids in the water-bloom-forming cyanobacteria and ambient water from Nanquan coast of Taihu Lake, China. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89, 439-43.

Tallman, D.E., Shaikh, A.U., 1980. Redox Stability of Inorganic Arsenic (III) and Arsenic (V) in Aqueous Solution. *Anal. Chem.* 52, 196–199.

Tlili, A., Corcoll, N., Bonet, B., Morin, S., Montuelle, B., Bérard, A., & Guasch, H., 2011. In situ spatio-temporal changes in pollution-induced community tolerance to zinc in autotrophic and heterotrophic biofilm communities. *Ecotoxicol.* 20, 1823-1839.

Truus, K., Viitak, A., Vaher, M., Muinasmaa, U., Paasrand K., Tuvikene R., Levandi, T., 2007. Comparative determination of microelements in Baltic seawater and brown algae samples by atomic absorption spectrometric and inductively coupled plasma methods. *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.* 122-133.

Tuan, L.Q., Huong, T.T.T., Hong, P.T.A., Kawakami, T., Shimanouchi, T., Umakoshi, H., Kuboi, R., 2008. Arsenic (V) induces a fluidization of algal cell and liposome membranes. *Toxicol. In Vitro.* 22, 1632-1638.

Valls M. & Lorenzo V., 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *Microbiol. Rev.* 26, 327- 338.

Wang Z., Luo Z. & Yan C. 2013. Accumulation, transformation, and release of inorganic arsenic by the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Environ. Sci. Pollut. Res* 20, 7286–7295.

Ybarra, G.R., Webb, R., 1998. Differential responses of groel and metallothionein genes to divalent metal cations and the oxyanions of arsenic in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. STRAIN PCC7942. *Proc. 1998 Conf. Hazard. Waste Res.* 76–86.

Zabinsky, S.I., Rehr, J.J., Ankudinov, A., Albers, R.C., Eller, M.J., 1995. Multiple Scattering Calculations of X-ray Absorption Spectra. *Phys. Rev. B* 52, 2995–3009.

Yin, X.X., Chen, J., Qin, J., Sun, G.X., Rosen, B.P., & Zhu, Y.G., 2011. Biotransformation and volatilization of arsenic by three photosynthetic cyanobacteria. *Plant physiol.* 156 (3), 1631-1638.

DISCUSSÃO GERAL

Neste estudo foram amostrados pontos em Nova Lima e Santa Bárbara, no Quadrilátero Ferrífero, estado de Minas Gerais, Brasil, onde confirmou-se o potencial risco de contaminação da população humana por arsênio (As) pela utilização de águas superficiais em atividades domésticas. Não foi possível realizar amostragens dentro do território de empresas de mineração, mas apenas no entorno de livre acesso. O risco de contaminação ambiental por As é um problema de proporções mundiais, particularmente em áreas de mineração. Tendo em vista a posição do Brasil nesse setor, como um dos grandes produtores/exportadores de minério, existe uma grande carência em investimentos na recuperação da saúde ambiental. Ressalta-se a importância do trabalho conjunto dos setores universitário, político e empresarial no sentido de buscar soluções para minimizar as fontes de dispersão de metais tóxicos no ambiente.

A comunidade fitoplanctônica dos pontos impactados no entorno de empreendimento de mineração demonstrou clara diferença com a degradação ambiental e poluição por metais tóxicos comparada às áreas de referência. A classe Bacillariophyceae, uma das mais utilizadas para a bioindicação, apresentou diferenças em termos de composição e abundância. Outros grupos, como Zignematophyceae se destacou por estar associado a locais de baixa perturbação ambiental, e o grupo das euglenofíceas esteve associado a locais com elevadas concentrações de nutrientes. Essas diferenças indicaram a possibilidade de utilização da comunidade fitoplanctônica como bioindicadora da qualidade ambiental em áreas de mineração.

A cepa de *S. nidulans*, escolhida entre outras cianobactérias isoladas a partir de amostras de água coletadas em área de mineração (anexo 1), foi utilizada como modelo para a investigação da interação com o As. Em laboratório, foi demonstrada a sua elevada resistência a concentrações maiores em várias ordens de grandeza do que aquelas encontradas em seu ambiente. As diferenças quantitativas de toxicidade, expressas como EC_{50} , entre As(V) e As(III) para essa cianobactéria, foram c. 400 vezes menores para o As(III) comparado ao As(V), o que demonstra a importância de avaliação da espécie química do As no ambiente e não apenas a quantificação do As total.

Para identificar os possíveis sítios celulares de ligação e moléculas que participam da imobilização do As, utilizou-se a técnica de XAFS (Espectroscopia de fina estrutura de absorção de raio X), onde foram estudadas as interações moleculares do As(III) e As(V) com a glutatona (GSH). Foi demonstrado o importante papel dos grupamentos sulfidríla para a redução do As(V) a As(III) e imobilização do As, com a formação do complexo $As(GS)_3$. Utilizando-se a

mesma técnica, por meio de testes com padrões de acetato e adsorção de As em células vivas, verificou-se que o As não interage com grupos carboxila, que são predominantes na parede celular, de forma que a adsorção deste elemento na parede celular não é significativa. No entanto, ao expor a cianobactéria ao As(III) a 6 mg/l e As(V) a 400 mg/l pelo período de trinta dias, a bioacumulação intracelular foi observada. Embora a concentração de As(III) fosse sessenta e sete vezes menor que a de As(V), e o mesmo nível de absorção intracelular (60 µg/l) foi observado, confirmando a maior facilidade de absorção e bioconcentração do As(III).

Independentemente da espécie de As adicionada ao meio de cultivo, o As(V) foi a espécie de As predominante intracelularmente. Em exposição ao As(V), a redução de As(V) a As(III) ocorreu em maior proporção comparado à produção de espécies orgânicas, enquanto que sob exposição ao As(III), maiores proporções de espécies orgânicas foram encontradas intracelularmente. Em *S. nidulans*, a produção de espécies orgânicas pode ser considerada um mecanismo de desintoxicação, assim como é observado em outras espécies dos reinos animal (Zhang et al., 2013) e vegetal (Ruiz-Chancho et al., 2008). A capacidade de biotransformação indica a participação das cianobactérias na biogeoquímica do As. Todas essas observações representam contribuições para esclarecer dinâmica de absorção e do comportamento intracelular do arsênio em uma cepa de cianobactéria proveniente de um local contaminado.

O As e suas interações com células vivas de cianobactérias tem características muito peculiares, por sua condição como semimetal: apresenta-se em solução na forma de oxiânion, diferente de outros metais que se apresentam na forma de cátions. Além disso, a espécie As(III) oxida-se em meio de cultivo e ocorre a competição com fosfato para absorção do As(V). Estas características dificultam a utilização de células vivas para a remoção do As do meio de cultivo. A quantidade de As absorvido e o rendimento da produção de biomassa ainda são fatores limitantes para aplicação de técnicas de descontaminação utilizando-se células vivas. No entanto, a biotransformação do As em espécies orgânicas, menos tóxicas, é um fator que estimula a continuidade das pesquisas em condições de concentrações similares às ambientais, objetivando-se encontrar métodos de aumentar a absorção e metabolização do As.

Referências:

Ruiz-Chancho M. J., Lopez-Sánchez J. F., Schmeisser E., Goessler W., Francesconi K. A., Rubio R. 2008. Arsenic speciation in plants growing in arsenic-contaminated sites. *Chemosphere* 71, 1522–1530.

Zhang W., Wen-Xiong W., Zhang L. 2013. Arsenic speciation and spatial and interspecies differences of metal concentrations in mollusks and crustaceans from a South China estuary. *Ecotoxicology*, 22, 671–682.

Anexo: Micrografias de cianobactérias e microalgas isoladas de pontos de mineração

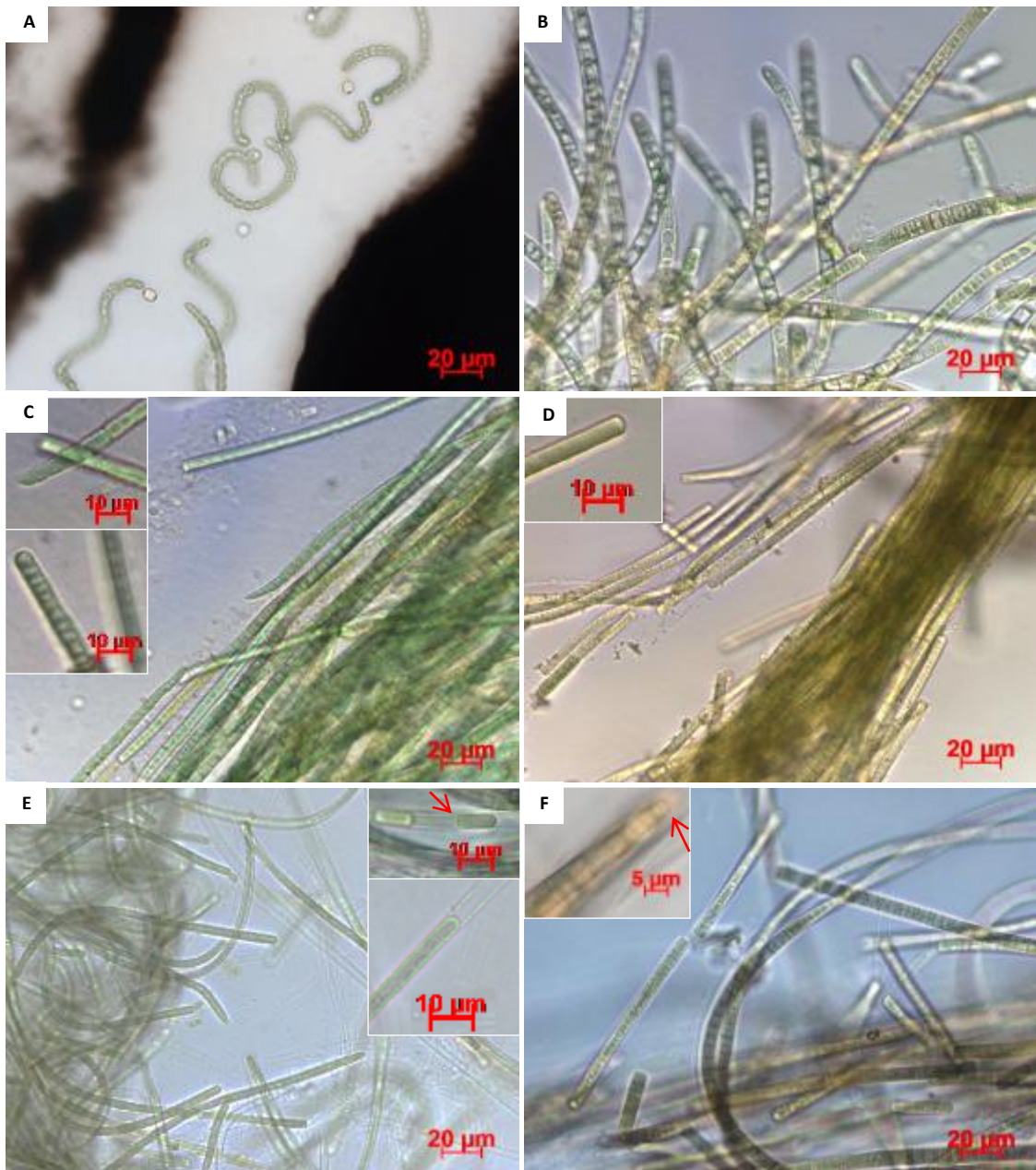


Figura 1: Micrografias dos isolados obtidos a partir de coletas de água no córrego da Mina (cepas A, B, C, E, F) e sub-bacia do rio Conceição (cepa D). Cianobactérias representantes da ordem Nostocales: A- *Nostoc* sp. evidenciando-se a bainha mucilaginosa em teste com nanquim e B- *Scytonema* sp. Representantes da ordem Oscillatoriales: C- *Phormidium* cf *tergestinum* destacando-se os diferentes tipos de terminação do filamento, D- *Phormidium ambiguum*, E- *Phormidium* cf *inundatum* evidenciando-se hormogônios indicados por seta no interior de firme bainha mucilaginosa, F- *Phormidium autumnale* evidenciando-se a presença de calyptra na célula apical. As escalas estão indicadas em vermelho em cada figura.

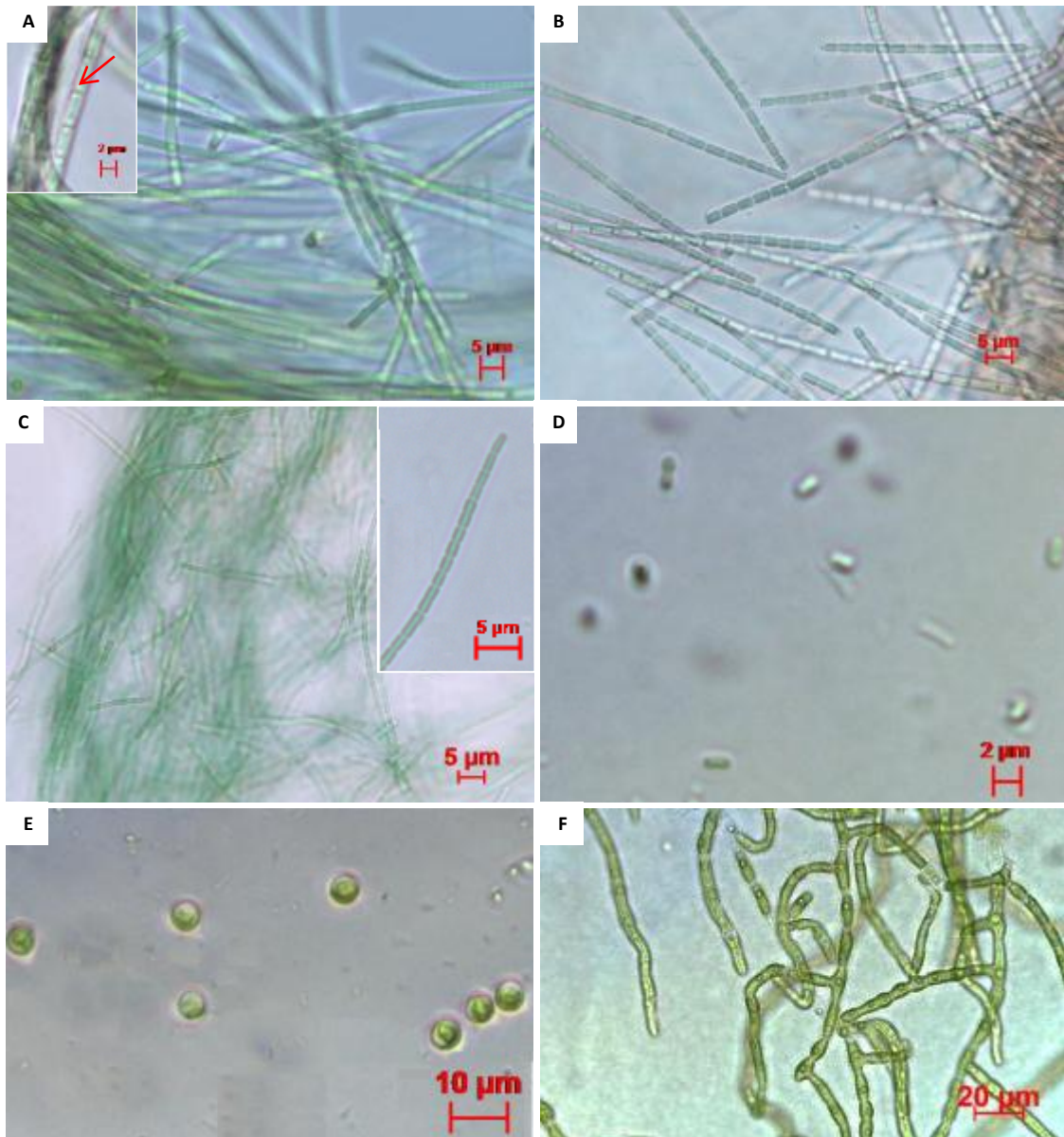


Figura 2: Micrografias dos isolados obtidos a partir de amostras de água coletas no córrego da Mina. Cianobactérias representantes das ordens Oscillatoriales: A- *Pseudanabaena minima* evidenciando-se a presença de grânulos indicados pela seta, B- *Pseudanabaena limnetica*, C: *Geitlerinema cf amphibium* evidenciando-se a terminação do filamento e Chroococcales: D- *Synechococcus nidulans*, cepa utilizada neste estudo. Microalgas representantes do filo Chlorophyta: E: *Chlorella vulgaris* e F: *Stigeoclonium tenue*. As escalas estão indicadas em vermelho em cada figura.

Apêndice:

A Espectroscopia de absorção de raios X

A técnica de XAFS (Espectroscopia de Estrutura Fina de Absorção de Raio-X) fundamenta-se no estudo detalhado de como o raio-x é absorvido por um átomo. Um espectro de absorção em um comprimento específico fornece informações a respeito das transições eletrônicas nos níveis mais internos de um átomo na excitação dos elétrons localizados em níveis 1s ou 2p. O termo “XAFS” engloba várias técnicas que podem ser aplicadas em diferentes materiais como cristais, filmes, membranas, soluções, metaloproteínas, biomassa celular ou mesmo gases. Portanto pode ser utilizada em uma grande variedade de disciplinas (Newville, 2004). Neste apêndice serão apresentados de modo resumido os fundamentos básicos das técnicas de EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) e XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure).

1. Funcionamento da radiação síncrotron

As fontes de radiação síncrotron foram desenvolvidas a partir de experimentos envolvendo alta intensidade de energia. Posteriormente, estas fontes foram adaptadas a produzir radiação eletromagnética como os raios-X com características espectrais desejáveis (Bunker 2011). O síncrotron produz luz intensa utilizando frequências eletromagnéticas e ondas de radiofrequência (RF). Os elétrons são extraídos de tungstênio aquecido em vácuo, em alta temperatura e imediatamente acelerados até atingirem a energia aproximada 80 keV. Estes elétrons entram em um acelerador linear (*Linac*) e são novamente acelerados até 100 MeV. Do *Linac*, os elétrons passam para o anel de aceleração (*booster ring*), onde atingem a energia máxima projetada. No LNLS é de 1.37 GeV (Fabbris, 2009). Depois disso, são transferidos para um anel externo, conhecido como anel de armazenamento (*storage ring*). Nas linhas de luz, situadas no entorno do anel, diferentes tipos de eletroímãs e lentes magnéticas são dispostos para providenciar o movimento circular e concentrar o feixe eletrônico. Todas as linhas de luz têm um monocromador no ponto de extração da luz síncrotron para selecionar o comprimento de onda apropriado para seus experimentos. Cada elemento possui um comprimento de onda específico de absorção necessário para induzir o efeito fotoelétrico, por isso, o desenvolvimento das fontes de luz síncrotron deram grande contribuição para a utilização da técnica, pela facilidade de obtenção de espectros com boa relação sinal/ruído (Manazali, 2003).

As amostras são colocadas em células para suporte de material líquido (figura 1) ou quando em pó são feitas pastilhas em uma prensa e presas na célula utilizando-se fita kapton. Todos os procedimentos de preparação são realizados no laboratório de apoio ao usuário. Nas linhas de luz, os experimentos para obtenção dos espectros de absorção das amostras são realizados em cabines adequadas para que o usuário não seja exposto à radiação.



Figura 1: célula de 3 mm para suporte de material líquido, utilizada nos experimentos.

2. A absorção do raio-X

A física envolvida nesta técnica é um fenômeno da mecânica quântica, baseado no efeito fotoelétrico do raio-X. Para cada camada atômica (K, L, M) existe um limiar de energia do fóton incidente para que o efeito fotoelétrico seja possível. Essa energia é igual à energia de ligação ou de ionização.

O efeito fotoelétrico se inicia quando um fóton incidente em uma amostra é absorvido pelo elétron de uma camada mais interna, e ao ser excitado, passa para um orbital mais externo, o que corresponde à elevação deste elétron ao contínuo. O excesso de energia absorvida é levada pelo fotoelétron na forma de energia cinética, deixando o átomo ionizado, (figura 2) (Newville, 2004).

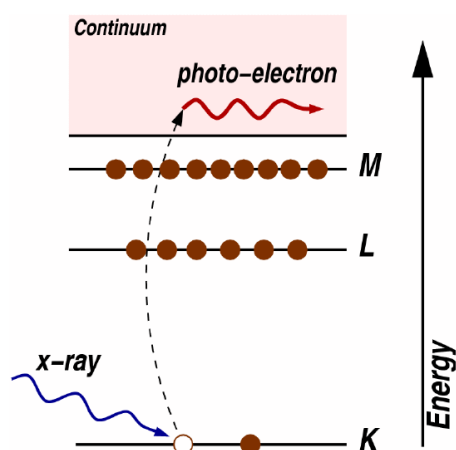


Figura 2: Efeito fotoelétrico em que um raio X é absorvido por um elétron que é elevado ao estado contínuo, fora o átomo. Fonte: Newville, 2004.

A técnica consiste em medir o coeficiente de absorção de raio-X de um elemento em uma matriz em função da energia do feixe monocromático incidente. O coeficiente de absorção pode ser medido através de experimentos em transmissão, onde o feixe incidente atravessa a amostra, sendo calculado pela lei de Lambert-Beer:

$$I = I_0 e^{-\mu Z}$$

Onde:

I é a intensidade de fótons transmitida

I_0 é a intensidade de fótons incidentes

μ é o coeficiente de absorção

Z é a espessura da amostra

e = Logaritmo Natural de Euler

A onda fotoelétrica, produzida pela absorção do fóton, se espalha e os átomos vizinhos criam interferências no padrão de espalhamento da onda. Este efeito de interferência ocasiona uma variação na probabilidade de absorção da energia, que é proporcional ao coeficiente de absorção (μ). Um átomo sozinho não produz este sinal, como mostrado na figura 3 (Mazali, 2003).

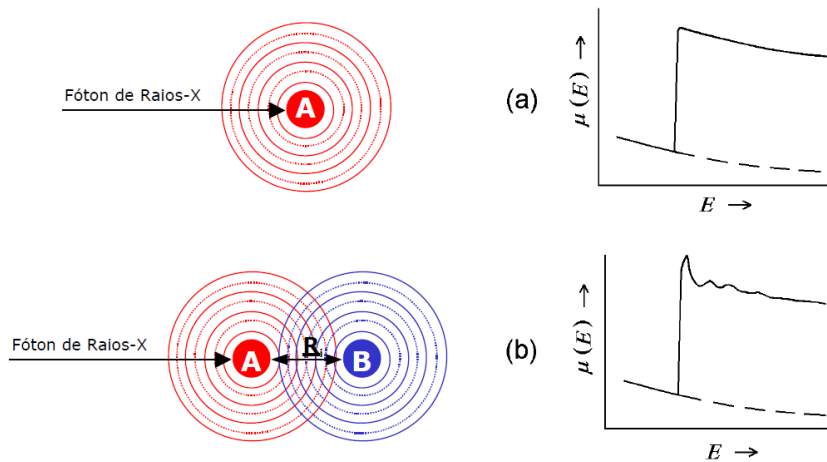


Figura 3: Espectro de absorção (a) de um átomo isolado A e (b) de uma molécula diatômica AB. Fonte: Manazali, 2003.

O coeficiente de absorção é uma função sensível da energia, com valor que depende da densidade do material (ρ), o número atômico (Z), a massa atômica (A), e a energia do raio-X (Newville, 2003). Assim,

$$\mu \approx \frac{\rho Z^4}{A E^3}$$

O espectro de XAFS pode ser dividido em três regiões principais, como apresentado na figura 2:

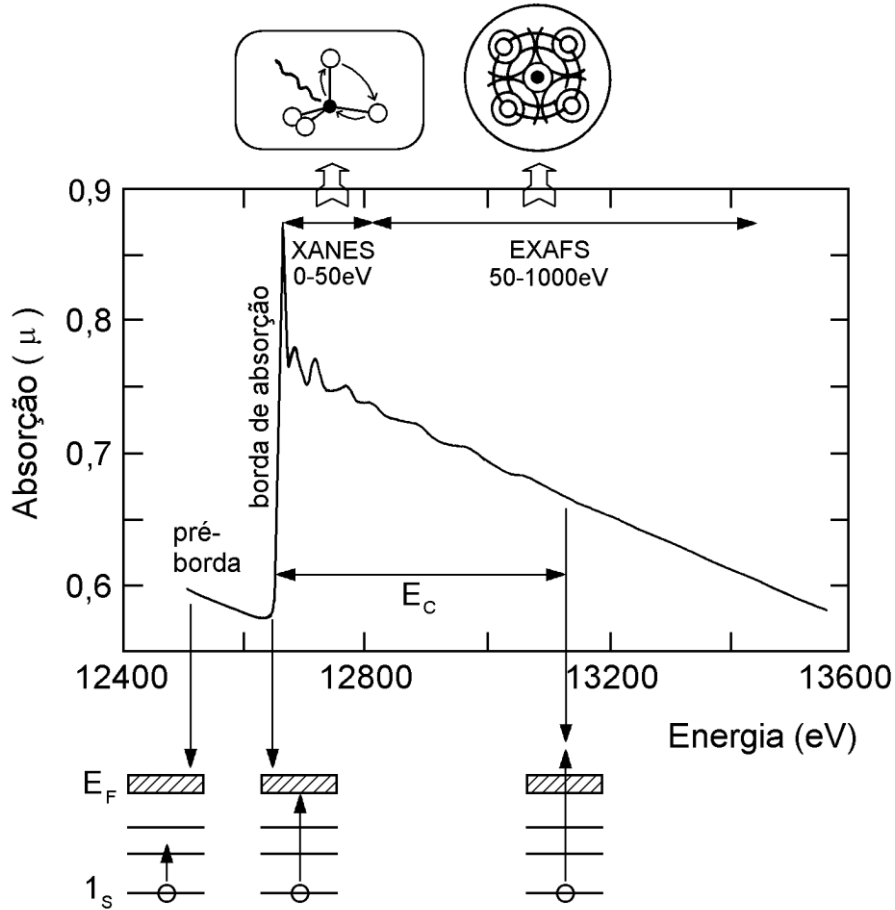


Figura 2: Representação esquemática de um espectro de absorção de raios X (borda K do Se) e das transições eletrônicas que correspondem às características básicas do espectro. Onde E_f corresponde à energia do fóton. E_c corresponde à energia cinética do elétron. Fonte: Manazali, 2003.

- I. **Região de pré-borda (*pre-edge*):** refere-se a transições eletrônicas com absorção de energia menor que a energia de ligação. Tais transições têm poucas probabilidades e, portanto, produzem somente pequenas oscilações no espectro de absorção. A posição exata do pico depende de detalhes de estado de oxidação, sítio de simetria e da natureza da ligação.
- II. **Borda de absorção (*egde*):** região caracterizada pelo aumento abrupto da absorção, quando a energia absorvida é suficiente para retirar elétrons do átomo absorvedor;

III. **Transições para o estado do contínuo:** corresponde a absorção de energias maiores que a energia de ligação, ocorrendo transições para o estado do contínuo. Está subdividida em:

- **Região de XANES** (espectroscopia de alta resolução da borda de absorção): está compreendida na faixa de até 50 eV acima da borda de absorção. Nesta região, o espectro apresenta variações estreitas e intensas da absorção. O espectro XANES trabalha na região onde o comprimento de onda do fotoelétron é da ordem das distâncias interatômicas e, portanto, o seu livre caminho médio é longo o suficiente para que possam ocorrer espalhamentos múltiplos antes que ele retorne ao átomo central. Dessa maneira, o espectro XANES envolve espalhamentos múltiplos e transições para níveis de menor energia, sendo rico em informações cristaloquímicas do átomo absorvedor, como o estado de oxidação e a estrutura cristalina em que o átomo está inserido.
- **Região de EXAFS** (Extended X-ray absorption fine structure): a absorção de energia ocorre na faixa de 50 a 1000 eV acima da borda de absorção e apresenta oscilações mais suaves. No espectro EXAFS estão envolvidos dois átomos, um absorvedor e outro retro-espalhador, sendo possível obter informações a respeito da distância e do número de vizinhos ao redor do átomo central. Basicamente, o processo físico que envolve as oscilações de absorção na região de EXAFS é a interferência entre a onda emitida pelo átomo emissor e a onda retroespalhada pelo átomo vizinho. (Manzali, 2003).

A questão chave para o entendimento da técnica de XAFS é observar que oscilações no espectro de absorção resultam da interferência (construtiva e destrutiva) entre a onda emitida e a onda retroespalhada, medida na energia da borda do átomo emissor. As oscilações (k) produzidas pelas diferentes camadas atômicas em torno do átomo absorvedor somam-se para produzir o sinal total de EXAFS. O fotoelétron emitido pode ser considerado como uma onda esférica de comprimento de onda:

$$\lambda = 2\pi/k$$

onde k é o vetor de onda do fotoelétron e é dado por:

$$k = \sqrt{\frac{2 \cdot m}{\hbar^2} \cdot (E - E_0)}$$

Onde,

m: massa do elétron

h: constante de Planck.

E_0 : origem da energia cinética do elétron

E: energia do fóton incidente.

Quando apropriadamente decodificadas, as modulações produzidas fornecem informações sobre a estrutura, número atômico, desordem estrutural e movimentação térmica dos átomos vizinhos. Portanto, o espectro de XAFS é especialmente sensível ao número de oxidação, coordenação química e distância dos átomos imediatamente próximos ao elemento selecionado (Bunker, 2011).

A expressão geral para a borda K de absorção é dada por:

$$\chi(k) = \frac{\mu - \mu_0}{\mu_0} = -\sum_i \frac{N_i}{kR_i^2} |f_i(\pi, k)| \text{sen}(2kR_i + \psi) \cdot e^{-2\sigma_i^2 \cdot k^2} \cdot e^{-\frac{2R_i}{\lambda_i(k)}}$$

Onde:

μ_0 : absorção do átomo absorvedor isolado;

μ : coeficiente de absorção atômico para uma energia E;

k : vetor de onda do fotoelétron;

ψ : defasagem total produzida no processo de retro-espalhamento: $\psi = 2\delta(k) + \theta(k)$, sendo δ a defasagem devida ao átomo absorvedor e θ a defasagem devida ao átomo vizinho;

R: é a distância do átomo absorvedor ao átomo retroespalhador;

$f(\pi, k)$: amplitude do retroespalhamento;

N: número de átomos vizinhos.

σ : fator de Debye-Waller, que indica a variação média da posição relativa entre o átomo absorvedor e o átomo retroespalhador. Essa variação tem origem na desordem estrutural e nas vibrações térmicas do material.

O tratamento dos dados envolve a eliminação do sinal da linha de base para obtenção das oscilações EXAFS em termos de $\chi(k)$. As oscilações são multiplicadas por uma potência de K, normalmente k^3 , com o objetivo de ponderar as oscilações de EXAFS mais uniformemente

evitando que as oscilações de maior amplitude prevaleçam sobre as menores na determinação das distâncias. Em seguida, o $\chi(k)$ correspondente à parte de EXAFS do espectro é isolado. A transformada de Fourier (TF) desse sinal fornece uma função de distribuição radial efetiva em torno do átomo estudado (Bernardi, 2010), e possibilita obter informações quantitativas sobre a estrutura local do átomo absorvedor (coordenação). Para obtenção dos parâmetros de ajuste geralmente, compara-se a função experimental com padrões de estrutura conhecida. Modelos teóricos também podem ser utilizados.

A coleta de dados é realizada por dois modos principais: transmissão e fluorescência. Um dos fatores de escolha é a concentração do elemento alvo na amostra e a possibilidade de se obter filmes finos. O modo de transmissão é mais utilizado para amostras concentradas enquanto a fluorescência, para amostras diluídas ou extremamente finas.

Referências:

Bernardi F. 2010. Estudo das propriedades eletrônicas e estruturais de catalizadores avançados. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Bunker G. 2010. Introduction to XAFS: A Practical Guide to X-ray Absorption Fine Structure Spectroscopy. Cambridge University Press. Cambridge, UK.

Fabbris G. F. L. 2009. Estudo da estrutura local da família $RMnO_5$ (R=Bi, Tb, Gb, Pr). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MAZALI, I.O. 2003. EXAFS como técnica de caracterização estrutural de materiais: fundamentos teóricos e aplicações. Campinas: Homepage do Laboratório de Química do Estado Sólido do Instituto de Química da Unicamp, (Texto na Internet).

Newville M. 2004. Fundamentals of XAFS. Consortium for Advanced Radiation Sources. University of Chicago, Chicago.