UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

LUIZ HENRIQUE VIEIRA LIMA

AGROMINERAÇÃO NO BRASIL: BUSCA POR HIPERACUMULADORAS TROPICAIS, ESTRATÉGIAS DE MANEJO E RISCOS ECOSSISTÊMICOS POR EXPOSIÇÃO A SOLOS ULTRAMÁFICOS

RECIFE 2023

Luiz Henrique Vieira Lima Engenheiro Agrônomo

Agromineração no Brasil: busca por hiperacumuladoras tropicais, estratégias de manejo e riscos ecossistêmicos por exposição a solos ultramáficos

> Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo.

> Orientador: Prof. Dr. Clístenes Williams Araújo do Nascimento

Coorientadores: Prof. Dr. Antony van der Ent; Dr. Fernando Bruno Vieira da Silva Prof. Dr. Guillaume Fernandes Echevarria Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na PublicaçãoUniversidade Federal Rural de Pernambuco Sistema Integrado de Bibliotecas Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L732a Lima, Luiz Henrique Vieira

Agromineração no Brasil: busca por hiperacumuladoras tropicais, estratégias de manejo e riscos ecossistêmicos porexposição a solos ultramáficos / Luiz Henrique Vieira Lima. - 2023. 149 f. : il.

Orientador: Clistenes Williams Araujo do Nascimento.Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo,Recife, 2023.

1. Fitomineração. 2. Hiperacumulação. 3. Metal pesado. 4. Níquel. 5. Solos metalíferos. I. Nascimento, ClistenesWilliams Araujo do, orient. II. Título

CDD 631.4

LUIZ HENRIQUE VIEIRA LIMA

Agromineração no Brasil: busca por hiperacumuladoras tropicais, estratégias de manejo e riscos ecossistêmicos por exposição a solos ultramáficos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo.

Aprovada em 24 de julho de 2023

Prof. Dr. Clístenes Williams Araújo do Nascimento Orientador Universidade Federal Rural de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Guillaume Fernandes Echevarria National Research Institute for Agriculture, Food and the Environment

> Dr. Fábio Perlatti Agência Nacional de Mineração

Dra. Paula Renata Muniz Araújo Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Ygor Jacques Agra Bezerra da Silva Universidade Federal Rural de Pernambuco

DEDICO

À minha sobrinha Cecília (in memorian). Desculpe-me por estar longe. Te amarei sempre!

AGRADECIMENTOS

A todo brasileiro que acredita na educação e ciência como pilares da sociedade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Clístenes Williams Araújo do Nascimento, por todos os ensinamentos, respeito, confiança e oportunidades que permitiram a evolução e demonstração do meu potencial durante os nossos anos de convívio e parceria. Tenho orgulho de ter sido seu orientado.

Ao meu amigo e grande mentor, Dr. Fernando Bruno Vieira da Silva, um dos principais responsáveis pelo meu crescimento profissional e intelectual. Obrigado por acreditar em mim há 11 anos.

Aos professores Guillaume Echevarria, Christophe Schwartz e Antony Van der Ent por toda contribuição científica durante o meu estágio de doutorado sanduíche na Universidade de Lorraine – França.

Aos doutores Sarah Nicholas e Ryan Tappero, pelas análises realizadas no Laboratório Nacional Brookhaven – Estados Unidos da América.

Ao Dr. Alfredo Montero Alvarez, uma das pessoas mais inteligentes que pude conhecer.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, por me proporcionar um ensino superior público de qualidade.

À FACEPE e à CAPES, pelas concessões das bolsas imprescindíveis para a execução do trabalho.

Aos integrantes do Grupo de Pesquisa em Química Ambiental de Solos, pelos bons momentos de convívio e aprendizado, em especial aos meus amigos Frank, Valdo e Venâncio, por toda lealdade, ajuda e risadas.

Às Dras. Josângela Araújo e Simone Lins, pelo apoio diário.

Aos professores e colaboradores do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo por todos os ensinamentos, em especial, ao Prof. Dr. Jean Cheyson, por ser meu referencial de conduta em sala de aula.

Às funcionárias do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Socorro e Vânia, por todas as nossas conversas leves em dias pesados.

À Dra. Paula Araújo, meu referencial de ética, capricho e trabalho duro.

Ao Prof. Dr. Ygor Jacques por toda a parceria durante minha trajetória acadêmica.

Ao Prof. Dr. Valdomiro Severino pela parceria nas análises mineralógicas.

À Prof. Dra. Cláudia Ulisses e a doutoranda Larisse Bianca por toda ajuda nas análises histológicas.

À Prof. Dra. Giselle Fracetto e aos doutores Felipe Fracetto e Felipe Martins pela parceria nas análises microbiológicas.

Aos amigos do GNAF Amanda Lima, Crissogno Mesquita e Joel Andrade. Obrigado por tornarem os nossos "terceiros turnos" mais fáceis e alegres.

Aos amigos de Pós-graduação, em especial a Bueno, Nara, Jaciane, Cintia e Vitória. Vocês são especiais para mim!

À toda minha família, em especial aos meus pais Luiza e Edgar e a minha avó Julieta (*in memorian*), por todo amor, carinho, compreensão e esforços diários que me auxiliaram a chegar até aqui. Sempre lembrarei e serei grato por tudo que foi abdicado pela minha educação.

À minha irmã Maria Eduarda e ao meu sobrinho Arthur por serem meus exemplos de força e resiliência. Vocês me inspiram!

À Marilya Sousa, por ter me ressignificado tanto. Me sinto privilegiado em ter você por perto. Sou muito grato por toda torcida, companheirismo e conexão. Te amo.

Aos amigos do Charmois, Yan, Victor, Nicolle e João. Vocês tornaram a saudade de casa mais fácil de enfrentar.

Aos colegas do Laboratório de Solos e Meio Ambiente (LSE-ENSAIA), Serigne, Serge, Julien, Romane, Gabrielle, Céline, Emmeline, Lucie, Caroline, Laetitia, Romuald, Lucas, Alain e Mohammad por toda ajuda, convívio e ensinamentos.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento profissional e realização deste trabalho!

"Non est ad astra mollis e terris via" Sêneca Agromineração no Brasil: busca por hiperacumuladoras tropicais, estratégias de manejo e riscos ecossistêmicos por exposição a solos ultramáficos

RESUMO GERAL

Solos ultramáficos são ambientes anômalos quanto a teores de metais pesados (principalmente, Ni, Co e Cr) e podem gerar retorno econômico por extração de minérios. Porém, técnicas extrativistas convencionais são responsáveis por fortes impactos ambientais. Nesse cenário, plantas hiperacumuladoras podem remover altas quantidades de metais de substratos enriquecidos, de forma econômica, ecológica e lucrativa, por meio da agromineração. Embora promissora, essa abordagem requer prospecção de espécies, estratégias de manejo do solo e avaliação de riscos para garantir a sustentabilidade ambiental. Dessa forma, este trabalho objetivou desenvolver método de monitoramento dos teores de Ni em plantas por fluorescência de raios X portátil (FRXp) e avaliar a acumulação natural e induzida do metal em hiperacumuladoras tropicais e seus respectivos potenciais para a agromineração no Brasil. Também foram investigados os riscos ambientais, ecológicos e à saúde humana por exposição a partículas de solo e consumo de vegetais cultivados nesse cenário. Para isso, 14 espécies de plantas com diferentes padrões de acúmulo de Ni foram utilizadas na calibração do uso do FRXp. Espécies brasileiras (Pfaffia sarcophylla, Lippia lupulina e Justicia lanstyakii), mexicana (Blepharidium guatemalense) e africana (Berkheya coddii) cultivadas em solos ultramáficos foram avaliadas quanto aos teores de Ni e à distribuição espacial de metais nas folhas por microfluorescência de raios-X baseada em luz síncrotron (µFRX-SR). Análises petrográficas foram realizadas nos materiais de origem e os solos ultramáficos foram caracterizados química, física e mineralogicamente. Os teores disponíveis, ambientalmente disponíveis, totais, sequenciais e bioacessíveis de Ni, Co e Cr foram determinados. Os riscos carcinogênicos e não carcinogênico à saúde humana, a comunidade bacteriana dos solos e o efeito de doses de ácido cítrico na disponibilidade de metais também foram avaliados. Nossos resultados mostraram que o modelo de calibração para o FRXp foi eficiente na predição de Ni em plantas ($R^2 = 0.94$). As hiperacumuladoras brasileiras apresentaram baixo potencial para a agromineração comercial. O alto acúmulo de Ni de B. guatemalense e B. coddii (> 1,0 %) torna essas espécies candidatas à agromineração tropical. Além disso, a aplicação de ácido cítrico $(40,0 \text{ mmol kg}^{-1})$ no solo ultramáfico aumentou em 25,0 % o acúmulo foliar de Ni por B. guatemalense e em 60,0 % o teor do metal no bio-minério. As espécies avaliadas apresentaram padrão similar de distribuição espacial dos metais, e acúmulo preferencial de Ni no floema e epiderme, sugerindo mecanismos de defesa contra herbivoria. No solo, os teores totais dos metais (mg kg⁻¹) para os municípios de Niquelândia e Buenos Aires, respectivamente, foram Co (373,5 e 349,2), Cr (1844,5 e 2485,5) e Ni (9597,5 e 1428,5). Riscos ambientais e à saúde humana foram estimados e considerados aceitáveis devido à maior retenção dos metais em óxidos de Fe e na fração residual. Entretanto, foram descritos riscos ecológicos elevados para os dois solos e risco de câncer inaceitável por consumo de vegetais cultivados nesses ambientes. A maior tolerância a metais foi observada nos filos Proteobacteria, Bacteroidota e Firmicutes. Portanto, nossos resultados indicam monitoramento eficiente de Ni por FRXp e alto potencial de agromineração natural e induzida de Ni por B. guatemalense no Brasil. Além disso, manejos que intensifiquem a erosão e mobilidade dos metais e cultivos alimentícios nestes solos devem ser evitados para garantia da segurança alimentar e sustentabilidade ambiental.

Palavras-chave: Fitomineração. Hiperacumulação. Metal pesado. Níquel. Solos metalíferos.

Agromining in Brazil: search for tropical hyperaccumulators, management strategies, and ecosystem risks from exposure to ultramafic soil

GENERAL ABSTRACT

Ultramafic soils are anomalous environments in terms of heavy metal content (mainly Ni, Co, and Cr) and can generate economic returns through mineral extraction. However, conventional extraction techniques are responsible for strong environmental impacts. In this scenario, hyperaccumulator plants can remove high amounts of metals from enriched substrates in an economical, ecological, and profitable way through agromining. Although promising, this approach requires species prospecting, soil management strategies, and risk assessment to ensure environmental sustainability. Thus, this work aimed to develop a method to monitor Ni levels in plants by portable X-ray fluorescence (XRFp) and to evaluate the natural and induced accumulation of the metal in tropical hyperaccumulators and their respective potentials for agromining in Brazil. Additionally, to investigate the environmental, ecological, and human health risks by exposure to soil particles and consumption of vegetables grown in this setting. To this end, 14 species with different Ni accumulation patterns were used for calibration using FRXp. Brazilian (Pfaffia sarcophylla, Lippia lupulina and Justicia lanstyakii), Mexican (Blepharidium guatemalense) and African (Berkheya coddii) species grown on ultramafic soils were evaluated for Ni contents and spatial distribution of metals in leaves by synchrotron lightbased X-ray microfluorescence (µFRX-SR). Petrographic analyses were performed on the source materials and the ultramafic soils were characterized chemically, physically and mineralogically. The available, pseudo-total, total, sequential and bioaccessible Ni, Co and Cr contents were determined. The carcinogenic and non-carcinogenic risks to human health, the bacterial community of the soils, and the effect of citric acid doses on metal availability were also evaluated. Our results showed that calibration model for FRXp was efficient in predicting Ni in plants ($R^2 = 0.94$). Brazilian hyperaccumulators showed low potential for commercial agromining However, the high Ni accumulation of B. guatemalense and B. coddii (> 1.0 %) makes these species candidates for tropical agromining. Furthermore, the application of citric acid (40.0 mmol kg⁻¹) to ultramafic soil increased by 25.0 % the foliar Ni accumulation by B. guatemalense and by 60.0 % the metal content in the bio-ore. The species evaluated showed a similar pattern of spatial distribution of metals, and preferential accumulation of Ni in the phloem and epidermis, suggesting defense mechanisms against herbivory. In the soil, the total metal contents (mg kg⁻¹) for the districts of Niquelândia and Buenos Aires, respectively, were Co (373.5 and 349.2), Cr (1844.5 and 2485.5) and Ni (9597.5 and 1428.5). Environmental and human health risks were estimated and considered acceptable due to higher retention of metals in Fe oxides and in the residual fraction. However, high ecological risks were described for both soils and unacceptable cancer risk from consumption of vegetables grown in these environments. The highest metal tolerance was observed in the phyla Proteobacteria, Bacteroidota and Firmicutes. Therefore, our results indicate efficient Ni monitoring by FRXp and high potential for natural and induced Ni agromining in Brazil. Furthermore, management that intensifies erosion and mobility of metals and food crops on these soils should be avoided to ensure food security and environmental sustainability.

Keywords: Heavy metal. Hyperaccumulation. Metalliferous soils. Nickel. Phytomining.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição global de ambientes geológicos ultramáficos serpentiníticos (adaptado
de GWENZI, 2020)
Figura 2 – Áreas tropicais com presença de solos ultramáficos e espécies hiperacumuladoras (adaptado de GARNICA-DÍAZ et al., 2022)
Figura 3 – Representação da agromineração de níquel
Figura 4 – Fluxograma do processamento de hiperacumuladoras para obtenção de Ni e compostos de Ni (adaptado de SIMONNOT et al., 2018)
Figura 5 – Representação esquemática do síncrotron brasileiro de 4ª geração "Sirius"35
Figura 6 – Faixa do espectro eletromagnético abrangida pela luz síncrotron
Figura 7 – Aplicação de microtomografia computadorizada de raios X e microscopia crioeletrônica para estudos na agricultura, meio ambiente e saúde humana e animal
Figura 8 – Distribuição espacial de metais em folhas de espécies hiperacumuladoras brasileiras analisadas por microfluorescência de raios-x baseada em luz síncrotron
Figura 9 – Riscos ecossistêmicos por ações antrópicas e naturais em solos ultramáficos40
Figura 10 – Modelo esquemático da metodologia desenvolvida para determinação de Ni em plantas por FRXp
Figura 11 – Efeitos do tempo (A) e da massa das amostras (B) na determinação de Ni por FRXp

Figura 12 – Correlação entre os teores de Ni determinados por ICP-OES e FRXp (n = 240)....62

Figura 20 – Acúmulo de Ni foliar das hiperacumuladoras estudadas......83

Figura 22 - Mapeamento elementar de Ni em seções transversais de folhas de P. sarcophylla
(A), L. lupulina (B), J. lanstyakii (C) e B. guatemalense (D)
Figura 23 – Mapeamento elementar de Co em seções transversais de folhas de <i>P. sarcophylla</i>
(A), L. lupulina (B), J. lanstyakii (C) e B. guatemalense (D)
Figura 24 – Mapeamento elementar de Cr em seções transversais de folhas de <i>P. sarcophylla</i>
(A), L. lupulina (B), J. lanstyakii (C) e B. guatemalense (D)
Figura 25 – Mapeamento elementar de K em seções transversais de folhas de P. sarcophylla
(A), L. lupulina (B), J. lanstyakii (C) e B. guatemalense (D)90
Figura 26 – Mapeamento elementar de Ca em seções transversais de folhas de <i>P. sarcophylla</i>
(A), L. lupulina (B), J. lanstyakii (C) e B. guatemalense (D)91
Figura 27 – Mapeamento elementar de Mn em seções transversais de folhas de <i>P. sarcophylla</i> (A), <i>L. lupulina</i> (B), <i>J. lanstyakii</i> (C) e <i>B. guatemalense</i> (D)92
Figura 28 – Teste histoquímico com Dimetilglioxima (DMG) em folha de <i>B. guatemalense</i> para visualização da distribuição celular de níquel
Figura 29 – Áreas de estudo e amostragem de solos ultramáficos no Brasil (Niquelândia – GO e Buenos Aires – PE)
Figura 30 – Petrografias dos serpentinitos de Buenos Aires – PE (A-B) e Niquelândia - GO (C-
D). (B) Detalhes em cristais de piroxênio (Px), anfibólios euédricos (Anf) e passagens de Px
para Anf (Px-Anf). (D) Serpentinita com textura de alteração em forma de fibras que atravessam
o mineral original, formando um padrão em rede121
Figura 31 – (A) Drx na forma de microagregados orientados sobre lâmina de vidro da argila

Figura 32 – Teores totais e disponíveis de Co (A), Cr (B) e Ni (C) nos solos estudados. Gráficos de violino indicando a distribuição média dos teores totais (D-F) e disponíveis (G-I) de Co, Cr e Ni em solos ultramáficos ao redor do mundo (VITHANAGE et al., 2019). As linhas tracejadas representam os teores totais (vermelho) e disponíveis (azul) de metais para Niquelândia - GO Aires -PE (BA) comparação (Niq) e Buenos em com а mediana

Figura 33 – Extração sequencial de Co, Cr e Ni nos solos ultramáficos.....127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teores médios totais de Ni, Cr e Co em solos ultramáficos no

mundo27
Tabela 2 – Importantes espécies hiperacumuladoras de metais e metalóides estudadas no mundo (adapatado de SHEORAN et al., 2009; VAN DER ENT et al., 2012; REEVES et al., 2017; BERNARDINO et al., 2018; NAVARRETE-GUTIÉRREZ et al., 2021)
Tabela 3 – Efeitos deletérios à saúde humana por exposição a Ni, Cr e Co41
Tabela 4 – Especificações do FRXp S1 TITAN modelo 800
Tabela 5 – Estatística descritiva e faixa das concentrações de Ni nas espécies determinadas por ICP-OES
Tabela 6 – Atributos químicos dos solos ultramáficos de Buenos Aires – PE (BA) e Niquelândia-GO (NIQ) utilizados no experimento em casa de vegetação75
Tabela 7 – Procedimentos da extração sequencial seletiva109
Tabela 8 – Valores médios de parâmetros toxicológicos e de exposição usados na avaliação de risco à saúde humana por ingestão, inalação e contato dermal com solos ultramáficos
Tabela 9 – Parâmetros toxicológicos e de exposição usados na avaliação de risco à saúdehumana por consumo de vegetais cultivados em solos ultramáficos117
Tabela 10 – (i) Parâmetros instrumentais do ICP-OES para a análise de Co, Cr e Ni em solo e planta; (ii) parâmetros analíticos do ICP-OES para Co, Cr e Ni em solo e planta; (iii) Resultados

Tabela 11 – Atributos químicos e físicos dos solos ultramáficos da Niquelândia (Cambissolo)
e Buenos Aires (Neossolo)
Tabela 12 – Composição representativa (%) dos elementos maiores e traços das amostras de rochas máficas ocorrentes nas regiões estudadas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL2
1.1 Hipóteses
1.2 Objetivos
1.2.1 Objetivo Geral24
1.2.2 Objetivos Específicos24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA2
2.1 Solos ultramáficos: origem e distribuição global2
2.2 Plantas hiperacumuladoras de metais24
2.3 Níquel e agromineração3
2.4 Luz síncrotron na hiperacumulação de metais
2.5 Riscos ambientais e à saúde humana em solos ultramáficos
Referências bibliográficas4
3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE FLUORESCÊNCIA DI
RAIOS X PORTÁTIL PARA O MONITORAMENTO DE NÍQUEL EM PLANTAS5
RAIOS X PORTÁTIL PARA O MONITORAMENTO DE NÍQUEL EM PLANTAS5 Resumo
RAIOS X PORTÁTIL PARA O MONITORAMENTO DE NÍQUEL EM PLANTAS5 Resumo
RAIOS X PORTÁTIL PARA O MONITORAMENTO DE NÍQUEL EM PLANTAS5 Resumo
RAIOS X PORTÁTIL PARA O MONITORAMENTO DE NÍQUEL EM PLANTAS5 Resumo
RAIOS X PORTÁTIL PARA O MONITORAMENTO DE NÍQUEL EM PLANTAS5 Resumo
RAIOS X PORTÁTIL PARA O MONITORAMENTO DE NÍQUEL EM PLANTAS5 Resumo
RAIOS X PORTÁTIL PARA O MONITORAMENTO DE NÍQUEL EM PLANTAS5 Resumo
RAIOS X PORTÁTIL PARA O MONITORAMENTO DE NÍQUEL EM PLANTAS5 Resumo 5 Abstract 5 3.1 Introdução 5 3.2 Material e métodos 5 3.2.1 Seleção das espécies e amostragem 5 3.2.2 Preparo das amostras, análises químicas e controle de qualidade 5 3.2.3 Aparelho FRXp 5 3.2.4 Protocolo experimental para FRXp 5
RAIOS X PORTÁTIL PARA O MONITORAMENTO DE NÍQUEL EM PLANTAS5 Resumo 5 Abstract 5 3.1 Introdução 5 3.2 Material e métodos 5 3.2.1 Seleção das espécies e amostragem 5 3.2.2 Preparo das amostras, análises químicas e controle de qualidade 5 3.2.3 Aparelho FRXp 5 3.2.4 Protocolo experimental para FRXp 5 3.2.5 Análise de dados 5
RAIOS X PORTÁTIL PARA O MONITORAMENTO DE NÍQUEL EM PLANTAS5 Resumo 5 Abstract 5 3.1 Introdução 5 3.2 Material e métodos 5 3.2.1 Seleção das espécies e amostragem 5 3.2.2 Preparo das amostras, análises químicas e controle de qualidade 5 3.2.3 Aparelho FRXp 5 3.2.4 Protocolo experimental para FRXp 5 3.2.5 Análise de dados 5 3.3 Resultados e discussão 5
RAIOS X PORTÁTIL PARA O MONITORAMENTO DE NÍQUEL EM PLANTAS5. Resumo

3.3.3 Predição dos teores de Ni e validação dos modelos61
3.4 Conclusão
Referências bibliográficas64
4 POTENCIAL PARA AGROMINERAÇÃO NATURAL E INDUZIDA DE NÍQUEL E
DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE METAIS AVALIADOS POR µFRX-SR EM CINCO
HIPERACUMULADORAS TROPICAIS
Resumo
Abstract
4.1 Introdução 69
4.2 Material e métodos
4.2.1 Obtenção e descrição das espécies70
4.2.2 Caracterização química e mineralógica dos solos e teste com ácido cítrico73
4.2.3 Experimento de agromineração74
4.2.4 Análises químicas das plantas e potencial de fitoextração de metais
4.2.5 Obtenção do bio-minério75
4.2.6 Microfluorescência de raios X baseada em luz síncrotron
4.2.7 Análises anatômicas77
4.2.8 Determinação dos metais e controle de qualidade77
4.2.9 Análises estatísticas77
4.3 Resultados e discussão78
4.3.1 Disponibilidade natural e induzida de Co, Cr e Ni em solos ultramáficos
4.3.2 Fitoextração natural e induzida de Ni por hiperacumuladoras tropicais81
4.3.3 Recuperação de Ni no bio-minério83
4.3.4 Distribuição espacial de metais nas hiperacumuladoras
4.3.5 Distribuição celular de Ni em <i>B. guatemalense</i> 92
4.4 Conclusão
Referências bibliográficas

5 AVALIAÇÃO DE RISCOS ECOLÓGICO, AMBIENTAL E À SAÚDE HUMANA
POR CONSUMO DE VEGETAIS E EXPOSIÇÃO A SOLOS ULTRAMÁFICOS NO
BRASIL102
Resumo102
Abstract103
5.1 Introdução104
5.2 Material e métodos105
5.2.1 Áreas de estudo e coletas dos solos105
5.2.2 Análises químicas, físicas e mineralógicas107
5.2.2.1 Características químicas, físicas e teores de Cr, Co e Ni nos solos107
5.2.2.2 Análises nas rochas e mineralogia dos solos107
5.2.3.2 Código de Avaliação de Risco (RAC)109
5.2.4 Estimativa do potencial risco ecológico110
5.2.5 Análise da comunidade de bactérias110
5.2.6 Bioacessibilidade humana de Co, Cr e Ni: métodos de testes in vitro111
5.2.7 Análise química das plantas113
5.2.8 Avaliação de risco à saúde113
5.2.8.1 Risco à saúde por exposição aos solos ultramáficos113
5.2.8.2 Risco à saúde por consumo de hortaliças115
5.2.8.3 Fator de bioconcentração e translocação de metais117
5.2.9 Determinação dos metais e controle de qualidade118
5.2.10 Análises estatísticas119
5.3 Resultados e discussão119
5.3.1 Atributos químicos, físicos, petrográficos e mineralógicos119
5.3.2 Teores totais e disponíveis de Co, Cr e Ni nos solos ultramáficos124
5.3.3 Riscos ambientais126
5.3.3.1 Geoquímica de Co, Cr e Ni em solos ultramáficos126
5.3.3.2 Código de Avaliação de Risco (RAC)128

5.3.4 Riscos ecológicos	
5.3.4.1 Avaliação do risco ecológico em solos ultramáficos	
5.3.4.2 Composição da comunidade bacteriana nos solos ultramáficos	
5.3.5 Bioacessibilidade gástrica, pulmonar e dermal de Co, Cr e Ni	
5.3.6 Riscos à saúde humana	
5.3.6.1 Risco à saúde humana por exposição a solos ultramáficos	
5.3.6.2 Risco à saúde humana por consumo de vegetais	
5.4 Conclusão	
Referências bibliográficas	
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	149

1 INTRODUÇÃO GERAL

Solos ultramáficos possuem baixa ocorrência no planeta, mas apresentam alta importância ambiental, geoquímica e industrial. São ambientes hostis para a maioria das plantas devido aos altos teores de metais pesados e à baixa fertilidade natural. Plantas hiperacumuladoras são espécies raras que se desenvolvem nesses ambientes sem apresentar sinais de toxidez, devido à capacidade de acumularem concentrações elevadas de metais. O fenômeno da hiperacumulação depende da alta tolerância das plantas aos metais, que pode ser obtida pela desintoxicação do metal e pela compartimentalização intracelular. Nesse sentido, estas espécies são potencialmente úteis para agromineração de metais em solos ultramáficos e o uso de técnicas não destrutivas para determinação de metais in situ e ex situ otimizam o monitoramento dessas plantas sem geração de passivos ambientais.

A agromineração é uma fitotecnologia que consiste no uso de hiperacumuladoras para extrair metais de substratos enriquecidos e transformá-los em bio-minérios com uso industrial. A incineração da biomassa permite uma recuperação elevada do minério que pode ser refinado e aproveitado, principalmente, na metalurgia. O níquel (Ni) é o metal com teores mais anômalos em solos ultramáficos e atualmente o mais promissor para agromineração pelo seu alto valor comercial, alta diversidade de plantas hiperacumuladoras e relativamente baixo custo de processamento. Entretanto, a disponibilidade de Ni nos solos ultramáficos e a redução dos seus teores mais lábeis com os cultivos sucessivos podem limitar a eficiência fitoextratora das espécies.

O uso de agentes quelantes pode aumentar a solubilidade e disponibilidade do Ni nos solos e, consequentemente, sua acumulação pelas plantas. Estudos anteriores de nosso Grupo de Pesquisa (Química Ambiental de Solos – UFRPE) utilizando ácido cítrico demonstraram o potencial desse agente quelante em aumentar a acumulação de Ni em espécie hiperacumuladora de clima temperado. Entre as principais vantagens do ácido cítrico, podemos destacar além do efeito na acumulação de metais na parte aérea, à alta degradabilidade desse quelante natural orgânico e o relativo baixo custo para sua aplicação. Porém, a dinâmica do uso de agentes quelantes em solos ultramáficos e os riscos ambientais e à saúde humana associados ainda precisam ser mais entendidos. Além disso, a compreensão da microbiota em ambientes extremos apresenta potencial promissor para biotecnologia e biorremediação.

Dessa forma, o entendimento do acúmulo e distribuição dos metais nos tecidos vegetais e de manejos em solos ultramáficos são importantes para potencialização da agromineração. Por isso, diversas técnicas de mapeamento elementar em macro e microescala têm sido utilizadas para auxiliar na elucidação dos mecanismos de acumulação e tolerância de metais em plantas. Dentre essas, podemos destacar a micro-fluorescência de raios-X baseada em luz síncrotron (μ FRX-SR). A μ FRX-SR se estende no espectro eletromagnético desde o infravermelho, passando pela radiação ultravioleta e chegando aos raios-X, permitindo a produção de imagens de áreas relativamente grandes (como folhas, por exemplo), com uma alta resolução espacial. Portanto, o uso de μ FRX-SR para observação de órgãos vegetais, como folhas, e estruturas celulares, possibilita a avaliação da distribuição elementar em macro e microescala, contribuindo para uma compreensão mais abrangente da fisiologia vegetal.

No presente trabalho, riscos ecossistêmicos e ecologia de solos ultramáficos foram estudados. Adicionalmente, técnicas baseadas em luz síncrotron e testes histoquímicos foram utilizados para entender a distribuição foliar e celular de metais em hiperacumuladoras tropicais e avaliar seus potenciais de hiperacúmulo natural e induzido por ácido cítrico. Com isso, é possível auxiliar a elucidação dos mecanismos envolvidos na acumulação e tolerância de metais nessas espécies e, consequentemente, impulsionar a agromineração segura de Ni e a mitigação da poluição de solos por metais pelo uso de hiperacumuladoras adaptadas às condições tropicais.

1.1 Hipóteses

- a. O uso de fluorescência de raio-x portátil (FRXp) para determinação de Ni em plantas é eficiente após calibrações baseadas em método destrutivo (ICP-OES);
- b. Espécies hiperacumuladoras tropicais são economicamente viáveis para implementação de projetos de agromineração de Ni nas condições brasileiras;
- c. A aplicação de ácido cítrico ao solo ultramáfico aumenta a solubilidade de Ni e outros metais, elevando a concentração desses elementos na parte aérea de *Blepharidium* guatemalense;
- d. As hiperacumuladoras tropicais apresentam padrão de distribuição de Ni nas folhas similar, com acúmulo preferencial do metal nas margens e nervuras;
- O Ni é conduzido pelo floema e se acumula preferencialmente em células epidérmicas, o que permite a tolerância do elemento sem danos sérios ao metabolismo e indica defesa contra herbivoria;
- f. Os solos estudados apresentam riscos aceitáveis ao ambiente e à saúde humana;
- g. O consumo de hortaliças cultivadas em solos ultramáficos representa riscos carcinogênicos inaceitáveis à saúde humana;
- h. Existe alta diversidade relativa de bactérias nos solos ultramáficos;

 A aplicação de ácido cítrico no solo reduz a abundância e riqueza da comunidade bacteriana que é restruturada após a degradação do quelante.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de agromineração de Ni e fitoextração de metais por meio de plantas hiperacumuladoras tropicais cultivadas em solos ultramáficos sem e com aplicação de ácido cítrico e mapear a distribuição espacial dos metais em folhas inteiras e células foliares usando luz síncrotron. Adicionalmente, estabelecer método ex situ de determinação de Ni em plantas com FRXp, compreender a comunidade bacteriana de solos ultramáficos e investigar riscos ecológicos, ambientais e à saúde humana por exposição a partículas de solo e consumo de vegetais cultivados nesses ambientes.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar método ex situ de determinação de teores totais de Ni em plantas por microfluorescência de raio-x portátil;
- b. Avaliar o potencial de *Pfaffia sarcophylla*, *Lippia lupulina*, *Justicia lanstyakii*, *Blepharidium guatemalense* e *Berkheya coddii* na agromineração de Ni;
- c. Avaliar os efeitos da adição de ácido cítrico sobre a acumulação de Ni na espécie hiperacumuladora considerada mais promissora;
- Mapear a distribuição espacial de metais nas folhas das espécies estudadas utilizando microfluorescência de raios – X baseada em luz síncrotron;
- e. Observar a distribuição celular de Ni nas folhas da espécie definida como mais promissora por meio de avaliações anatômicas e testes histoquímicos;
- f. Investigar a mobilidade de Ni, Cr e Co nos solos ultramáficos;
- g. Avaliar as bioacessibilidades gástrica, pulmonar e dermal de Ni, Cr e Co e estimar os riscos carcinogênicos e não-carcinogênicos por exposição aos solos ultramáficos;
- Investigar os riscos à saúde humana por consumo de *Lactuca sativa* e *Brassica oleracea* cultivadas em solos ultramáficos brasileiros;
- Compreender a comunidade bacteriana (filos) dos solos estudados e o efeito da aplicação de ácido cítrico sobre suas características.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Solos ultramáficos: origem e distribuição global

O termo ultramáfico deriva do latim "ultra" (excesso) e "máfico" (rico em magnésio e ferro). Solos ultramáficos são resultantes de processos de intemperismo de rochas ultrabásicas (<45,0 % SiO₂), especificamente peridotitos, piroxenitos, ou por metamorfismos dessas rochas (serpentinitos). Estes materiais de origem são formados sob condições de arrefecimento de magmas primitivos basálticos ou envolvendo processos de serpentinização, apresentando uma assembleia mineralógica enriquecida por metais como olivina, piroxênios, hornblenda, biotita, espinélio, lizardita, antigorita, crisotilo, cromita e magnetita (VITHANAGE et al., 2014; GALEY et al., 2017; KIERCZAK; PIETRANIK; PEDZIWIATR, 2021; NASCIMENTO et al., 2022). Por isso, a principal característica dos solos ultramáficos é a elevada concentração relativa de Fe, Mg, Mn, e da tríade Co, Cr e Ni, que podem superar os valores de background dos solos do planeta em milhares de vezes (Tabela 1) (VITHANAGE et al., 2019).

A maior parte das rochas ultrabásicas está localizada no manto e corresponde a 84,0 % do volume da Terra. A porção trazida para a crosta por forças tectônicas origina solos que cobrem aproximadamente 3,0 % da superfície do planeta (SIEBECKER et al., 2017; KIERKZAC et al., 2021). Apesar da baixa proporção superficial, os solos ultramáficos apresentam ampla distribuição geográfica, com presença em regiões temperadas e tropicais (África do Sul, Albânia, Angola, Austrália, Áustria, Bósnia e Herzegovina, Brasil, Bulgária, Camarões, Canadá, Colômbia, Costa Rica, Cuba, Escócia, Espanha, Estados Unidos da América, Filipinas, Finlândia, França, Grécia, Guatemala, Guiana, Índia, Indonésia, Irã, Irlanda, Itália, Jamaica, Japão, Macedônia, Madagascar, Malásia, Marrocos, México, Nicarágua, Noruega, Nova Caledônia, Nova Zelândia, País de Gales, Polônia, Porto Rico, Portugal, República Dominicana, República Tcheca, Sérvia, Sri Lanka, Suécia, Suíça, Taiwan, Turquia, Venezuela, Zâmbia e Zimbábue) (TOMOVIC et al., 2013; VITHANAGE et al., 2019; GWENZI, 2020; GARNICA-DÍAZ et al., 2022) (Figura 1).

Normalmente, os ambientes ultramáficos localizam-se em limites de encontro de placas tectônicas, principalmente na zona do círculo de fogo do Pacífico (também conhecida por anel de fogo do Pacífico), região com aproximadamente 40.000 km de extensão e que contém a maior quantidade e intensidade de atividades sísmicas do planeta (GWENZI, 2020). Isto ocorre devido algumas rochas ultramáficas como peridotitos, sofrerem alterações hidrotérmicas (processo de serpentinização) no fundo do oceano e emergirem por subducção de placas tectônicas (GARNICA-DÍAZ et al., 2022). O termo serpentina é originado do latim

"serpentinus" (serpente) devido a aparência esverdeada e escamosa do material. Durante a serpentinização, as rochas são expandidas em até 45,0 % se tornando muito fraturadas e mais susceptíveis ao intemperismo químico. Este processo altera a mineralogia original, gerando minerais hidratados como serpentina, brucita, anfibólio e talco (STRIEDER, 1992). A serpentinização também é sugerida como uma das possíveis promotoras da origem da vida na Terra e em Marte, devido a liberação de gases como hidrogênio e metano formando habitats favoráveis para organismos quimiossintéticos. Adicionalmente, sondagens do programa espacial da NASA "Mars Reconnaissance Orbiter" identificaram veios de serpentina no meteorito marciano Nakhla e em crateras do planeta (GUILLOT; HATTORI, 2013; MCCOLLOM; SEEWALD, 2013).

Figura 1 - Distribuição global de ambientes geológicos ultramáficos serpentiníticos (adaptado de Gwenzi, 2020).



Fonte: Arquivo pessoal.

Solos ultramáficos ocorrem em quase todas as ordens de solo, mas no geral, são classificados como Cambissolo, Vertissolo ou Latossolo e possuem alto interesse científico por se tratar de ambientes com atributos químicos favoráveis apenas para organismos extremófilos (ECHEVARRIA et al., 2018; MARESCOTTI et al., 2019). Porém, a ocorrência de fauna e flora específicas é um atrativo pouco estudado principalmente em regiões tropicais (GARNICA-DÍAZ et al., 2022). Altas temperaturas ($22 - 31 \,^{\circ}$ C), precipitações elevadas (> 1000,0 mm ano⁻¹) e boa drenagem em alguns países como Filipinas, Nova Caledônia e Brasil favorecem a

hidrólise ocasionando maiores taxas de intemperismo e consequentemente, a formação de solos ultramáficos profundos ($\approx 20,0$ m), conhecidos por lateritas niquelíferas (solos vermelhos contendo camadas de goethita e saprólito rico em Mg e Si) (THORNE et al., 2012; VAN DER ENT et al., 2018). A elevada presença de metais e os baixos teores de P, K e Ca nos solos ultramáficos são fatores limitantes para utilização agrícola. Dessa forma, a principal importância econômica destes ambientes é a contribuição para extração mineral global de Ni, Cr, Co, Cu, Ti e elementos do grupo da platina (PECK; HUMINICKI, 2016).

Localização	Prof (cm)	Ni (mg kg ⁻¹)	Cr (mg kg ⁻¹)	Co (mg kg ⁻¹)
Média mundial (solos "normais") ^a	0 - 10	29,0	60,0	11,0
Galícia (Espanha) ^b	0 - 20	373,0	4309,0	7132,0
Ranau (Malásia) ^c	0 - 20	6332,0	4873,0	1005,0
Eubeia (Grécia) ^d	0 - 25	334,0	234,0	31,0
Serra da Nogueira (Portugal) ^e	10 - 30	2342,0	6822,0	175,0
Szklary (Polônia) ^f	4 - 25	1329,0	2671,0	119,0
Parma (Itália) ^g	0 - 20	2466,0	2231,0	106,0
Pogradec (Albânia) ^h	0 - 15	2442,0	635,0	259,0
Adelschlag (Austrália) ⁱ	0 - 20	2580,0	1910,0	172,0
Yudhaganawa (Sri Lanka) ^j	0 - 15	6567,0	14880,0	555,0
Niquelândia (Brasil) ^k	15 - 30	25767,0	8066,0	115,0
Soroako (Indonésia) ¹	0 - 15	7051,0	17216,0	57,0
Oregon (Estados Unidos) ^m	0 - 12	2718,0	1247,0	173,0
Anatólia (Turquia) ⁿ	0 - 15	2680,0	631,0	166,0
Beni Boufrah (Marrocos)°	0 - 10	1821,0	311,0	88,0
Ilhas Andamão (Índia) ^p	10 - 15	4316,0	4437,0	533,0
Kazak (Bulgária) ^q	0 - 20	2333,0	3872,0	203,0
Dawros (Irlanda) ^r	0 - 20	784,0	2000,0	160,0
Vosgos (França) ^s	0 - 20	842,0	4810,0	202,0
Monte Ouenarou (Nova Caledônia) ^t	4 - 10	7750,0	NA	720,0
Nové Dvory (República Tcheca) ^u	0 - 20	3054,0	2682,0	103,0
Goonhilly (Reino Unido) ^v	0-30	2500,0	2300,0	110,0
Zlatibor (Sérvia) ^w	0 - 20	1552,0	244,0	133,0
Kromdraai (África do Sul) ^x	0 - 10	300,0	900,0	NA
Santa Elena (Costa Rica) ^y	0 - 10	3610,0	2860,0	173,0
Hyogo (Japão) ^{z1}	3 - 10	1812,0	2920,0	NA
Altenburg (Áustria) ^{z2}	0 - 12	1069,0	798,0	NA
Hualien (Taiwan) ^{z3}	0 - 15	979,0	421,0	NA

Tabela 1 - Teores médios totais de Ni, Cr e Co em solos ultramáficos no mundo.

NA não analisado; "Kabata-pendias, 2011; ^bArenas-lago et al., 2016; ^cAziz et al., 2015; ^dMegremi, 2010; ^eFreitas et al., 2004; ^fKierczak et al., 2008; ^gLombini et al., 1998; ^hShallari et al., 1998; ⁱWenzel et al., 2003; ^jVithanage et al., 2014; ^kGarnier et al., 2009; ^lvan der Ent et al., 2013; ^mAlexander, 2014; ⁿUnver et al., 2013; ^oAter et al., 2000; ^pPal et al., 2005; ^qBani et al., 2010; ^rBrearley, 2018; ^sChardot et al., 2007; ^lQuantin et al., 2001; ^uQuantin et al., 2008; ^vSlingsby; Brown, 1977; ^wTomovic et al., 2013; ^xBalkwill et al., 2011; ^yReeves; Baker; Romero, 2007; ^{z1,z2,z3}Hseu et al., 2018.

2.2 Plantas hiperacumuladoras de metais

A primeira observação de hiperacumulação de um metal ocorreu em meados do século 18, por Georg Everhard Rumphius. A espécie foi chamada de *Arbor aluminosa* devido ao seu porte arbóreo e acúmulo de alumínio (RUMPHIUS, 1743; JANSEN et al., 2002). O termo hiperacumuladora foi criado por Reeves em 1976 após observar a alta acumulação natural de Ni (257.400 mg kg⁻¹ no látex e 11.700 mg kg⁻¹ em folhas) pela espécie *Pycnandra acuminata* na Nova Caledônia (JAFFRÉ et al., 1976; VAN DER ENT et al., 2012). Porém, a primeira observação de hiperacúmulo de Ni ocorreu 28 anos antes na Itália em *Alyssum bertolonii* (MINGUZZI; VERGNANO, 1948). A concentração limite (*threshold*) que identifica o fenômeno da hiperacumulação varia com o metal considerado. Plantas que possuem mais de 1000 mg kg⁻¹ de Ni na matéria seca das folhas são consideradas hiperacumuladoras do elemento. Para Co, Cr, Cu, o teor mínimo é de 300,0 mg kg⁻¹; os limiares para Zn e Mn são de 3.000 e 10.000 mg kg⁻¹, respectivamente (REEVES et al., 2017) (Tabela 2).

As hiperacumuladoras podem ser obrigatórias, se forem endêmicas desses solos metalíferos e sempre apresentarem teores elevados do elemento; ou facultativas, quando não são endêmicas e podem ou não apresentar alto acúmulo de metais. São divididas em oito grupos: (1) plantas de solos ultramáficos apresentando hiperacumulação de Ni; (2) plantas de solos enriquecidos por elementos calcófilos apresentando hiperacumulação por Cd, Pb, Tl ou Zn; (3) hiperacumuladoras de Cu e Co; (4) hiperacumuladoras de Mn; (5) hiperacumuladoras em solos com teores anômalos de Se; (6) hiperacumuladoras de vários elementos em solos poluídos por indústrias; (7) hiperacumuladoras de terras raras como Ce e La; e (8) hiperacumuladoras de elementos maiores como Fe e Al (VAN DER ENT et al., 2012; VANDER ENT et al., 2013). Atualmente, são conhecidas 746 espécies de plantas hiperacumuladoras, sendo a maioria (532) acumuladoras de Ni (CORZO REMIGIO et al., 2020).

O alto número de hiperacumuladoras de Ni deve-se, principalmente, à facilidade de o acúmulo ser provado e pela extensão de afloramentos ultramáficos enriquecidos pelo elemento (VAN DER ENT et al., 2013; GEI et al., 2018; NAVARRETE-GUTIÉRREZ et al., 2021). Estas plantas são consideradas raras, correspondendo apenas a 0,2 % das espécies vegetais descritas. A principal hipótese sobre a evolução da hiperacumulação consiste em mecanimos de defesa da planta contra herbivoria e vantagem competitiva no ambiente. O Ni acumulado é tóxico para um grande número de insetos e fungos e capaz de reduzir o crescimento de outras plantas competidoras (MARTENS & BOYD, 2002; JAFFRÉ et al., 2018). A maioria dos estudos sobre ecologia vegetal em ambientes ultramáficos é de clima temperado. Entretanto, inúmeras hiperacumuladoras foram descritas em países tropicais, sendo Cuba e Brasil

detentores de 30,0 % de todas as espécies hiperacumuladoras de Ni conhecidas até o momento (Figura 2) (NAVARRETE-GUTIÉRREZ et al., 2021; GARNICA-DÍAZ et al., 2022).

Elemento	Espécie	Concentração (mg kg-1)	Threshold (mg kg ⁻¹)	
Ag	Potamogeton oxyphyllus	13,5	-	
As	Pteris vittata*	3750 - 23000 ^{RG} (0,1)	> 1000	
Au	Brassica juncea*	57 (0,001)	-	
Cł	Noccaea caerulescens*	3000 (0,05)	> 100	
Ca	Arabidopsis halleri	$3600^{RG}(0,05)$		
Co	Haumaniastrum robertii*	$10000^{RG}(0,2)$	> 300	
C	Haumaniastrum katangense*	8356 (10)	> 200	
Cu	Aeolanthus biformifolius	14000^{RG} (10)	> 500	
Pb	Noccaea rotondifolia subsp. cepaeifolia*	$8000^{RG}(1)$	> 1000	
Mn	Virotia neurophylla*	55000 ^{RG} (200)	> 10000	
	Alyssum bertoloni*	13400 (1,5)		
	Berkheya coddii	17000 - 76000 ^{<i>RG</i>} (1,5)		
	Alyssum spp.	10000-25000 (1,5)		
	<i>Leptoplax</i> spp.	10000-35000 (1,5)		
	Bornmuellera spp.	10000-30000 (1,5)		
NT.	Buxus spp.	10000-25000 (1,5)	> 1000	
INI	Leucocroton spp.	10000-27000 (1,5)	> 1000	
	Phyllanthus spp.	20000-60000 (1,5)		
	Rinorea bengalensis	10000-27000 (1,5)		
	Pearsonia metallifera	14000 (1,5)		
	Pycnandra acuminata	11700 (1,5)		
	Blepharidium guatemalense	43000 (1,5)		
Se	Astragalus pattersoni*	6000 - 15000 ^{RG} (0,02)	> 100	
T 1	Iberis intermedia*	3070 (1)	. 100	
11	Biscutella laevigata	$4055 - 19000^{RG}(1)$	> 100	
U	Atriplex confertifolia*	100 (0,5)	-	
Zn	Noccaea caerulescens*	$10000 - 54000^{RG} (100)$	> 3000	
ETD	Pronephrium simplex	3000	> 1000	
ETRS	Dicranopteris linearis	7000^{RG}	> 1000	

Tabela 2 - Importantes espécies hiperacumuladoras de metais e metalóides estudadas no mundo (adapatado de Sheoran et al., 2009; van der Ent et al., 2012; Reeves et al., 2017; Bernardino et al., 2018; Navarrete-gutiérrez et al., 2021).

*Primeiras espécies relatadas como hiperacumuladoras; ^{RG} recorde global de concentração reportada; os valores entre parênteses são concentrações médias normalmente encontradas em plantas não acumuladoras.

Dentre as de clima tropical, a *Berkheya coddii* é a maior hiperacumuladora de Ni conhecida, com recorde global registrado de aproximadamente 8,0 % do elemento nas folhas (MESJASZ-PRZYBYLOWICZ et al., 2004). Trata-se de uma planta nativa da África do Sul, perene, pertencente à família Asteraceae e pode atingir 1,5 m de altura. Esta espécie é uma hiperacumuladora obrigatória de Ni, e apresenta vantagens em relação à outras espécies como: produção de biomassa relativamente alta (> 300,0 g por planta), fácil propagação a partir de sementes e teores de Ni na rebrota superiores aos do ciclo inicial (ROBINSON et al., 1997;

CHANEY et al., 2014). Outra planta com potencial para estudos com agromineração é a espécie lenhosa mexicana *Blepharidium guatemalense* que pode chegar à 18 metros de altura e apresentou 4,3 % de Ni nas folhas (NAVARRETE-GUTIÉRREZ et al., 2021). Apesar do alto numéro de espécies descritas, as hiperacumuladoras brasileiras, até o momento, não são atrativas comercialmente devido às relativas baixas produção de biomassa e acumulação de níquel (NASCIMENTO et al., 2022).

Figura 2 - Áreas tropicais com presença de solos ultramáficos e espécies hiperacumuladoras (adaptado de Garnica-díaz et al., 2022).



Fonte: Arquivo pessoal.

A identificação de espécies hiperacumuladoras ao redor do mundo é importante para a prospecção geoquímica e tecnologias focadas em descontaminação ambiental. Adicionalmente, o estudo de mecanismos de acúmulo de metais também auxilia no entendimento de regulação fisiológica de elementos essenciais, potencialmente tóxicos e não essenciais (VAN DER ENT et al., 2019). Porém, estas espécies estão ameaçadas por processos de urbanização e desmatamento que destroem seu habitat natural (JAFFRÉ et al., 2018). Dessa forma, a identificação de hiperacumuladoras em herbários e levantamentos florísticos em ambientes ultramáficos são ferramentas importantes para o desenvolvimento de fitotecnologias (REEVES; BAKER; ROMERO, 2007; TOMOVIC et al., 2013; VAN DER ENT et al., 2019).

2.3 Níquel e agromineração

Os primeiros relatos do uso do níquel são datados por volta de 4000 a.c para a produção de ferramentas simples. Após alguns milênios, seu uso foi estendido para a cunhagem de armas e moedas (WEBER; BANERJEE, 2016). O início do uso do Ni na história moderna ocorreu em meados do século XVIII após o isolamento do elemento pelo mineralogista sueco Axel Fredrik Cronstedt que atribuiu o nome níquel em referência ao termo alemão para o minério de cobre e níquel (kupfernickel), que signfica "diabo do cobre", onde grandes quantidades do elemento foram encontradas (COLELLA; GUALTIERI, 2007; WEBER; BANERJEE, 2019).

O níquel é um metal pesado pertencente ao grupo 10 da tabela periódica juntamente com ferro e cobalto. Possui peso atômico e densidade de 58,69 g e 8,9 g cm⁻³, respectivamente (KABATA-PENDIAS, 2011). Na crosta terrestre, o Ni é o 22° elemento mais abundante e ocorre normalmente associado com oxigênio e enxofre, nas formas de óxidos ou sulfetos. É considerado um elemento essencial para plantas tendo relação com atividade da urease, germinação de sementes e remobilização do nitrogênio das folhas senescentes (VAN DER ENT et al., 2019). Dentre seus estados de oxidação (+1, +2, +3 e +4), a forma bivalente é a mais móvel, tóxica e encontrada no ambiente. O aporte de Ni no solo pode ocorrer por fontes naturais (emissões vulcânicas e intemperismo de rochas máficas e ultramáficas) e antrópicas (mineração, efluentes industriais, lodo de esgoto, resíduos de indústrias de ligas de Ni, fabricação de tintas e queima de combustíveis fósseis) (EL-NAGGAR et al., 2021; LIMA et al., 2023; MUSTAFA et al., 2023). Estima-se que 8,5 milhões de quilos de Ni são emitidos para a atmosfera anualmente por fontes naturais. Para as fontes antrópicas, este valor é cinco vezes maior (GAD, 2014).

A produção mundial de Ni é estimada em 2.700.000 t ano⁻¹ e movimenta cerca de US\$ 20 bilhões anualmente (USGS, 2019). O Brasil é o oitavo maior produtor do mundo (67.000 t ano⁻¹) e possui a terceira maior reserva global com 11.000.000 t do minério (USGS, 2020). As reservas nacionais conhecidas de níquel estão distribuídas nos estados de Goiás (45,0 %), Bahia (36,3 %), Pará (11,3 %) e Minas Gerais (7,4 %) (DNPM, 2011). O valor de mercado deste metal aumentou em até 600,0 % nos últimos 10 anos e tem preço médio atual de 22.500 USD/T (9 de março de 2023) (TRADING ECONOMICS, 2023). O Ni é utilizado principalmente como matéria-prima para indústrias metalúrgicas na fabricação de ligas de aço (65,0 %) devido sua alta resistência à corrosão. Além disso, possui aplicabilidade na galvanoplastia e se encontra em mais de 300.000 produtos domésticos, militares, aeroespaciais, marítimos e arquitetônicos (SHAHZAD et al., 2018; USGS, 2019). O Ni também está presente em componentes elétricos e magnéticos e é um potencial contaminante nas próximas décadas devido à alta demanda de

baterias de hidreto metálico de Ni para a produção de veículos híbridos e elétricos (NYKVIST; SPREI; NISLSSON, 2019). Dessa forma, a mineração mundial do elemento está em valorização crescente.

Apesar da importância para a economia global, as técnicas extrativistas convencionais e as indústrias de processamento mineral provocam fortes impactos ambientais como: geração de resíduos, drenagem ácida de minas, deposição de metais, desmatamento, emissão de gases de efeito estufa, alto gasto energético e uso de máquinas pesadas (FARJANA et al., 2019; WERNER; BEBBINGTON; GREGORY, 2019). Algumas áreas de mineração são abandonadas por não possuírem mais a rentabilidade necessária para justificar uma extração convencional. Além disso, o Fórum Econômico Mundial traçou metas para uma mineração de Al, Fe, Ni, Cu e Zn mais sustentável até 2050, buscando uma relação equilibrada entre a atividade econômica e as preocupações ambientais, ou seja, uma produção eficiente com mínimo comprometimento às gerações futuras (WORLD ECONOMIC FORUM, 2015).

Nesse sentido, a fitomineração é uma "green technology", com baixo custo de aplicação, e potencial de rentabilidade, tornando-se uma alternativa sustentável para remediação de áreas contaminadas e recuperação de minérios. O termo fitomineração foi estabelecido por Rufus Chaney em 1983 para descrever uma variante do processo de fitoextração com retorno lucrativo. Três décadas depois, Jean-Louis Morel sugeriu uma atualização do termo para agromineração com o objetivo de atribuir um aspecto de multidisciplinaridade à tecnologia e não a limitar apenas a áreas de mineração (TOGNACCHINI et al., 2020). Assim, a agromineração trata-se do uso de plantas hiperacumuladoras para extrair metais de substratos enriquecidos (solos, sedimentos, saprólitos, lamas industriais, rejeitos de minas) e transformálos em bio-minérios que podem ser utilizados pelas indústrias, ou seja, é uma tecnologia potencialmente rentável para obtenção de minérios em áreas com teores inadequados de nutrientes e metais para as formas convencionais de cultivo agrícola e mineração (Figura 3) (VAN DER ENT; MULLIGAN, 2015; NKRUMAH; CHANEY; MOREL, 2017).

Após o cultivo, a biomassa vegetal é colhida, seca e compactada. A recuperação do metal pode ocorrer por três abordagens baseadas em princípios de piro e hidrometalurgia (Figura 4): (i) fundição de ferroníquel usando um processo de alta temperatura; (ii) incineração da biomassa seca (obtenção do bio-minério) seguida por processos de hidrometalurgia, e (iii) lixiviação do Ni diretamente da biomassa seca (SIMONNOT et al., 2018). A abordagem de obtenção do bio-minério tem se mostrado promissora por reduzir as impurezas da biomassa (carbono orgânico, P, Ca, Mg, K, Cl) e consequentemente, concentrar o níquel no material. Depois de incinerado, o Ni é lixiviado, precipitado e purificado.



Figura 3 – Representação da agromineração de níquel.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 4 – Fluxograma do processamento de hiperacumuladoras para obtenção de Ni e compostos de Ni (adaptado de Simonnot et al. (2018)).



Fonte: Arquivo pessoal.

O sucesso da agromineração depende de fatores como: cultivo de plantas hiperacumuladoras em larga escala, identificação de espécies promissoras, uso de práticas agronômicas para aumento de biomassa e teor foliar do metal e alto valor de mercado do minério de interesse (VAN DER ENT et al., 2015; SIMONNOT et al., 2018). O Ni é um elemento siderófilo que está ligado principalmente a óxidos de ferro e manganês nos solos ultramáficos. A baixa disponibilidade do metal é um dos fatores limitantes para a fitoextração. Por isso, técnicas que aumentam sua disponibilidade no solo e extração pelas plantas, embora não obrigatórias para o processo, podem aumentar a performance da agromineração. Entre estas, podemos destacar o uso de fertilizantes, herbicidas, correção de pH, maior densidade de plantio, inoculação microbiana e agentes quelantes (BANI et al., 2015a; BANI et al., 2015b; BANI; ECHEVARRIA, 2019; NASCIMENTO et al., 2020).

O uso de agentes quelantes sintéticos ou naturais é uma ferramenta eficaz no aumento da disponibilidade de metais no solo. Alguns autores não recomendam a utilização de agentes quelantes sintéticos em processos de fitoextração devido ao alto custo de aplicação e persistência no ambiente, podendo provocar a transferência de metais para corpos hídricos (MEERS et al., 2004; FREITAS; NASCIMENTO, 2016). Tratando-se de quelantes naturais, pesquisas mostram o potencial do uso do ácido cítrico ($C_6H_7O_8$) na fitoextração de metais por ser um ácido orgânico natural de baixo peso molecular, hidrossolúvel, de menor custo e rápida biodegradabilidade (FREITAS et al., 2009; FREITAS et al., 2013; FREITAS; NASCIMENTO, 2016).

O ácido cítrico pode complexar o Ni aumentando a disponibilidade e, consequentemente, a absorção do metal pela planta (VITHANAGE et al., 2019). A eficiência do uso de ácido cítrico com plantas hiperacumuladoras ainda é pouco estudada, mesmo assim, apresenta algumas discordâncias. Robinson et al. (1997) observaram que o uso de ácido cítrico (10 e 20 g kg⁻¹) provocou efeitos negativos em *B. codii* reduzindo significativamente a absorção de níquel. Porém, as concentrações testadas foram elevadas, favorecendo a competição entre outros elementos e maior absorção de Co e Cr que podem ter causado toxicidade. Outros estudos indicaram que o uso de ácido cítrico na concentração de 20,0 mmol kg⁻¹ aumentaram de 55,0 a 100,0 % os teores de Ni nas folhas de *Odontarrhena muralis* (anteriormente *Alyssum murale*) e *Noccaea caerulescens* (NASCIMENTO et al., 2020; NASCIMENTO; HESTERBERG; TAPPERO, 2020). Por isso, avaliações de doses de ácido cítrico e seus efeitos em diferentes espécies de hiperacumuladoras são importantes na busca de estratégias para potencialização da agromineração de níquel.

2.4 Luz síncrotron na hiperacumulação de metais

A luz síncrotron é um tipo de radiação eletromagnética de alto fluxo e brilho que se estende por uma faixa ampla do espectro eletromagnético, desde a luz infravermelha passando pela luz visível, radiação ultravioleta e atingindo os raios X (LNLS, 2023). Este tipo de energia é gerado por aceleradores de partículas (síncrotrons) que aceleram elétrons próximo a velocidade da luz para produção de radiação eletromagnética no amplo espectro. O nome síncrotron é uma junção das palavras sicronicidade e elétron devido sua aceleração num fluxo constante (órbita estável) (CNPEM, 2020).

A utilização dos síncrotrons teve início na década de 50 e atualmente existem mais de 60 estruturas em funcionamento distribuídas por dezenas de países no mundo. Eles são classificados entre primeira e quarta geração, sendo a última considerada a com feixes de radiação mais brilhantes e precisos e com aprimoramento na resolução espacial e temporal (CNPEM, 2023). Os síncrotrons de primeira geração foram construídos para pesquisa de física de alta energia. A adição de "wrigglers" ou onduladores maximizaram a intensidade da radiação síncrotron permitindo mudanças de direção dos feixes e possibilitando a evolução das gerações e, consequentemente, suas aplicabilidades (WINICK, 1997; CHOPPIN et al., 2013; CNPEM, 2023). Atualmente, apenas o Brasil (Sirius) e a Suécia (MAX-IV) possuem síncrotrons de quarta geração (CNPEM, 2020). De forma geral, o síncrotron é composto por cinco componentes (Figura 5).

Figura 5 – Representação esquemática do síncrotron brasileiro de 4^ª geração "Sirius".



Fonte: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, 2023).

O estágio inicial (1) ocorre no acelerador linear (linac) onde um canhão de elétrons emite estas partículas a partir do aquecimento de uma liga metálica. Os elétrons são acelerados próximos à velocidade da luz e conduzidos ao acelerador injetor (booster) por imãs. O booster (2) é um acelerador circular com objetivo de aumentar a energia dos elétrons (600 mil voltas por segundo). Após atingir a energia necessária, os elétrons são transportados ao anel de armazenamento. No anel de armazenamento (3), os elétrons altamente carregados energeticamente produzem a luz síncrotron quando suas trajetórias são desviadas (surgimento das linhas de luz). A etapa 4 é composta por uma rede magnética responsável pela deflexão e focalização do feixe de elétrons para as estações de pesquisa. Nas estações de pesquisa, também conhecidas por estações experimentais ou cabanas (5), as linhas de luz são absorvidas, refletidas ou espalhadas nas amostras analisadas para avaliações atômica, molecular, química, elétrica, eletrônica, magnética e outras por meio de técnicas de espectroscopia, espalhamento de raios X, cristalografia e tomografia (CNPEM, 2020).

O amplo espectro permite análises em diferentes radiações e o alto brilho aumenta a velocidade da investigação e detalhamento do material em nanômetros (Figura 6). Adicionalmente, é possível avaliar os materiais simulando condições ambientais reais (pressão, temperatura, campos elétricos e magnéticos, gases e outras) (CNPEM, 2020). A diversidade das linhas de luz permite a aplicação em diferentes áreas do conhecimento como por exemplo: na agricultura (eficiência da aplicação de fertilizantes, biofortificação, estudos com física, química, mineralogia e biologia em solos), na medicina (desenvolvimento de novos fármacos, tratamentos de doenças, pesquisas sobre câncer e o vírus SARS-CoV-2), na indústria (produção de catalisadores químicos, materiais mais resistentes e tecnológicos, energia renovável, exploração de petróleo e gás natural), e ambiental (estudos de poluentes, fluidos, plantas e animais) (CHOPPIN et al., 2013; RAMOS et al., 2016; KONG; VOGT; LEE, 2018; CNPEM, 2020; NASCIMENTO et al., 2020; CLARO et al., 2023; HICKS et al., 2023; NOSKE et al., 2023; SZOSTAK et al., 2023) (Figura 7).







Figura 7 – Aplicação de microtomografia computadorizada de raios X e microscopia crioeletrônica para estudos na agricultura, meio ambiente e saúde humana e animal.

Fonte: Adaptado de Claro et al. (2023) e Noske et al. (2023).
Tratando-se da aplicabilidade em plantas, a luz síncrotron vem sendo utilizada em estudos sobre nutrição vegetal e fitorremediação. No caso de hiperacumuladoras, os mecanismos de absorção e acúmulo de metais podem variar entre espécies. Diversos transportadores atuam na hiperacumulação e a interação entre os metais afeta este processo. Por isso, a forma com que o metais são distribuídos nos tecidos vegetais de espécies hiperacumuladoras ainda é pouco compreendida (VAN DER ENT et al., 2019). Para preencher essa lacuna de conhecimento, técnicas como fluorescência de raios - X (FRX) e observação de estruturas celulares por meio de cortes transversais permitem avaliações em macro e microescala, possibilitando a compreensão da dinâmica e acúmulo de metais nos tecidos das plantas (VAN DER ENT et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2020). Para isso, laboratórios de luz síncrotron disponibilizam fontes de fótons de alta intensidade que são 10 ordens de magnitude mais brilhantes que aquelas geradas por tubos de raios - X, aumentando a sensibilidade analítica e a resolução das imagens (LOMBI; SUSINI, 2009; SARRET et al., 2013). O uso dessa tecnologia permite que tecidos vegetais sejam analisados in vivo, impedindo a redistribuição significativa de metais e tornando seus mapeamentos e especiações mais realistas, reduzindo a produção de artefatos na análise (VAN DER ENT et al., 2017) (Figura 7).



Figura 8 – Distribuição espacial de metais em folhas de espécies hiperacumuladoras brasileiras analisadas por microfluorescência de raios-x baseada em luz síncrotron.

Fonte: Arquivo pessoal.

Estudos em *Pennisetum purpureum*, *Berkheya coddii*, *Odontarrhena muralis*, *Noccaea tymphaea* e *Bornmuellera emarginata* mostraram que a distribuição espacial de metais como Cd e Ni é variável e o acúmulo de metais pode ocorrer por diferentes estratégias fisiológicas como por exemplo acúmulo vacuolar, exclusão de elementos tóxicos por extremidades foliares ou armazenamento em tricomas (VAN DER ENT et al., 2017; VAN DER ENT et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020; NASCIMENTO; HESTERBERG; TAPPERO, 2020; TANANONCHAI et al., 2023). Até o momento, avaliações desse tipo são inexistentes em hiperacumuladoras brasileiras. Portanto, o estudo da distribuição de metais em plantas pode conduzir ao entendimento dos processos associados à biofortificação, tolerância e hiperacumulação de metais. Isso é fundamental para auxiliar no melhoramento genético de plantas, as quais podem ser utilizadas na agricultura, na agromineração de Ni ou na remediação de áreas contaminadas por metais.

2.5 Riscos ambientais e à saúde humana em solos ultramáficos

Processos naturais como intemperismo dos minerais e erosão do solo em ambientes ultramáficos podem se tornar um problema devido aos altos teores de metais, principalmente, Ni, Cr e Co (VITHANAGE et al., 2019; KIERCZAK; PIETRANIK; PEDZIWIATR, 2021). Atividades de mineração e agricultura nesses solos apresentam os principais riscos ambientais e à saúde humana por contaminação das águas superficiais e subterrâneas, exposição à partículas de solo e consumo de alimentos cultivados sob estas condições. Os metais também podem ser bioacumulados e biomagnificados, atingindo pessoas mesmo distantes destas áreas (Figura 9) (MAHURPAWAR, 2015; RAMACHANDRA et al., 2018; GERVAIS-BERGERON et al., 2023). De forma geral, os metais em solos ultramáficos são pouco móveis por estarem associados à frações recalcitrantes como óxidos de ferro e manganês ou na forma residual (GARNIER et al., 2009; GARNIER et al., 2013). Porém, condições climáticas e ações antrópicas podem modificar a geoquímica dos contaminantes. Apesar de relativamente baixa quando comparada ao teor total, a disponibilidade de metais em solos ultramáficos ultrapassam significativamente níveis de poluição estabelecidos em solos "normais" no mundo (KABATA-PENDIAS, 2011). O Ni por exemplo, possui quatro estados de oxidação sendo a forma Ni²⁺ (a mais móvel e tóxica) associada em média por apenas 2 - 3 % do teor total, proporção que normalmente ultrapassa os valores de background pelo mundo (GENCHI et al., 2020; EL-NAGGAR et al., 2021).

Apesar de ser um micronutriente para as plantas, o excesso de Ni é relacionado à redução da produtividade agrícola por danos a taxas de germinação, desbalanço nutricional, divisão

celular, clorose e necrose (SARAC et al., 2019; KUMAR et al., 2021). Adiconalmente, o Ni pode provocar danos em órgãos dos seres humanos como cerébro, pele, rins, pulmões, fígado e coração (ATSDR, 2005; EL-NAGGAR et al., 2021) (Tabela 3). As dermatites são os danos mais comuns por contato ao metal (cerca de 20,0 % da população mundial têm alergia à joias) (ATSDR, 2005). Os níveis de exposição ao Ni dependem do cotidiano do indivíduo. Em geral, o ser humano ingere cerca de 170,0 µg dia⁻¹ na alimentação, 2,0 µg dia⁻¹ por consumo de água, inala entre 0,1 e 1,0 µg dia⁻¹ (não fumante), e possui exposição dermal durante o banho, por contato com poeira ou no manuseio de moedas e outros metais revestidos pelo elemento (ATSDR, 2005; LIMA et al., 2023).



Figura 9 – Riscos ecossistêmicos por ações antrópicas e naturais em solos ultramáficos.

Fonte: Arquivo pessoal.

Para Cr, as preocupações são relacionadas principalmente com sua toxicidade. O Cr é um dos metais menos móveis e disponíveis nos solos ultramáficos, sendo encontrado principalmente em cromitas e óxidos de ferro (GARNIER et al., 2013). É essencial para humanos devido à participação em processos do metabolismo energético e tem níveis de consumo entre $20,0 - 45,0 \mu g$ dia⁻¹ (Cr III) (ATSDR, 2012). Apesar da menor exposição e da sua essencialidade para os seres humanos, a forma cancerígena Cr (VI) está fortemente

associada à argilas e óxidos de manganês neste solos. Seus efeitos deletérios englobam desde erupções cutâneas a câncer de pulmão (ATSDR, 2012). Assim como Cr, o Co é outro representante dos metais com teores mais anômalos em solos ultramáficos e forte associação com óxidos de manganês. A alimentação é o principal meio de exposição ao elemento (11,0 µg dia⁻¹) e apesar de ser benéfico aos humanos por compor a vitamina B12, a alta exposição ao metal pode provocar danos respiratórios e cardiovasculares graves (ATSDR, 2023). Os efeitos tóxicos dos metais nos organimos ocorrem por processos oxidativos e redutivos devido à ligação dos contaminantes a sítios de proteínas, deslocamento de elementos e formação de radicais livres que provocam o mau funcionamento das células (JAISHANKAR et al., 2014).

Tabela 3. Efeitos deletérios à saúde humana por exposição a Ni, Cr e Co.

Efeito	Ni	Cr	Co
Genotoxicidade	Х	Х	
Problemas respiratórios (asma, bronquite, irritação nasal e pulmonar, etc)	Х	Х	Х
Problemas cardiovasculares	Х	Х	Х
Dermatites	Х	Х	Х
Doenças neurológicas	Х		Х
Problemas renais	Х	Х	Х
Problemas gastrointestinais (úlceras, lesões no intestino)		Х	Х
Problemas de fertilidade (qualidade dos espermatozóides e óvulos)	Х	Х	
Problemas hepáticos		Х	Х
Problemas hematológicos (anemia)		Х	Х
Cânceres	Х	Х	Х
Teratogênese (aborto, redução de peso, má formação congênita, etc)		Х	
Problemas oculares	Х	Х	Х
Problemas imunológicos	Х	Х	Х
Problemas muscoesqueléticos	Х		Х

Fonte: Atsdr 2005, 2012 e 2023.

Normalmente, crianças são mais susceptíveis aos riscos quando comparadas a adultos devido a comportamentos de mão à boca, sucção de dedos, maior frequência respiratória e menor peso corporal (OKORIE; ENTWISTLE; DEAN, 2012). Porém, diante das atividades de agricultura e mineração, os adultos se tornam o principal organismo alvo (mão-de-obra e maior consumo de hortaliças). Outro fator importante é que em solos ultramáficos a exposição aos metais é aumentada para todas as rotas (ingestão, inalação e contato dérmico) visto que os relativos altos teores disponíveis sobrepõem o fator baixa mobilidade. Por isso, monitoramentos de riscos em áreas ultramáficas são fundamentais para o manejo seguro do solo e da população.

Referências bibliográficas

ALEXANDER, E.B. Arid to humid serpentine soils, mineralogy, and vegetation across the Klamath Mountains, USA. **Catena**, v. 116, p. 114–122, 2014. <u>https://doi.org/10.1016/j.catena.2013.12.003</u>.

ARENAS-LAGO, D.; ANDRAD, M.L.; VEGA, F.A.; SINGH, B.R. TOF-SIMS and FE-SEM/EDS to verify the heavy metal fractionation in serpentinite quarry soils. **Catena**, v. 136, p. 30–43, 2016. <u>https://doi.org/10.1016/j.catena.2015.03.005</u>.

ATER, M.; LEFEBVRE, C.; GRUBER, W.; MEERTS, P. A phytogeochemical survey of the flora of ultramafic and adjacent normal soils in North Morocco. **Plant and Soil**, v. 218, p. 127-135, 2000. <u>https://doi.org/10.1023/A:1014925007960</u>.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005. Toxicological profile for Nickel. Atlanta, GA: **U.S. Department of Health and Human Services**, Public Health Service. <u>https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp15.pdf</u>.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2012. Toxicological profile for Chromium. Atlanta, GA: **U.S. Department of Health and Human Services**, Public Health Service. <u>https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp7.pdf</u>.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2023. Toxicological Profile for Cobalt (Draft for Public Comment). Atlanta, GA: U.S. **Department of Health and Human Services**, Public Health Service. <u>https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp33.pdf</u>.

AZIZ, R.A.; RAHIM, S.A.; SAHID, I.; IDRIS, W.M.R. Speciation and availability of heavy metals on serpentinized paddy soil and paddy tissue. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, v. 195, p. 1658–1665, 2015. <u>https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2015.06.235</u>.

BALKWILL, K.; CAMPBELL-YOUNG, G.J.; FISH, L.; MUNDAY, J.; FREAN, M.L.; STALMANS, M. A new species of Sartidia (Graminae), endemic to ultramafic soils. **South African Journal of Botany**, v. 77, p. 598-607, 2011. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.12.003.

BANI, A.; PAVLOVA, D.; ECHEVARRIA, G.; MULLAJ, A.; REEVES, R.D.; MOREL, J.L.; SULCE, S. Nickel hyperaccumulation by the species of *Alyssum* and *Thlaspi* (Brassicaceae) from the ultramafic soils of the Balkans. **Botanica Serbica**, v. 34, p. 3–14, 2010. <u>UDK 582.683.2(497)</u>.

BANI, A.; ECHEVARRIA, G.; SULC, E. S.; MOREL, J. L. Improving the agronomy of *Alyssum murale* for extensive phytomining: a five-year field study. **International Journal of Phytoremediation**, v.17, p.117–127, 2015a. <u>https://doi.org/10.1080/15226514.2013.862204</u>.

BANI, A.; ECHEVARRIA, G.; ZHANG, X.; BENIZRI, E.; LAUBIE, B.; MOREL, J. L.; SIMONNOT, M. O. The effect of plant density in nickel-phytomining field experiments with *Alyssum murale* in Albania. **Australian journal of botany**, v. 63, p.72–77, 2015b. <u>https://doi.org/10.1071/BT14285</u>.

BANI, A.; ECHEVARRIA, G. Can organic amendments replace chemical fertilizers in nickel agromining cropping systems in Albania? **International Journal of Phytoremediation**, v. 21, p. 43–51, 2019. <u>https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1523871</u>.

BERNARDINO, C.A.R.; MAHLER, C.F.; SILVA, E.F.; NOVO, L.A.B. Fitotecnologias: situação atual e perspectivas futuras. **Acta Brasiliensis**, v. 2, p. 63-68, 2018. <u>https://doi.org/10.22571/2526-433877</u>.

BREARLEY, F.Q. Geo-ecological studies on two ultramafic sites in western Ireland. **Ecological Research**, v. 33, p. 581–591, 2018. <u>https://doi.org/10.1007/s11284-018-1584-2</u>.

CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, 2020. SIRIUS – Acelerando o futuro da ciência. <u>https://cnpem.br/wp-content/uploads/2020/11/low_livro-sirius_2020.pdf</u>.

CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, 2023. https://cnpem.br/.

COLELLA, C.; GUALTIERI, A.F. Cronstedt's zeolite. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 105, p. 213-221. <u>https://doi.org/doi:10.1016/j.micromeso.2007.04.056</u>.

DNPM – AGÊNCIA NACIONAL DE MINERAÇÃO (2011). Níquel. <u>https://sistemas.anm.gov.br/publicacao/mostra_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=7401</u>.

CHANEY, R. L.; REEVES, R.D.; BAKLANOV, I.A.; CENTOFANTI, T.; BROADHURST, C.L.; BAKER, A.J.M.; ANGLE, J.S.; VAN DER ENT, A.; ROSEBERG, R.J. Phytoremediation and phytomining: using plants to remediate contaminated or mineralized environments, Chap. 15. In: Rajakaruna N, Boyd RS, Harris T (eds) **Plant ecology and evolution in harsh environments**. Nova Science, New York, p. 365–391, 2014. https://se.copernicus.org/preprints/se-2017-75/se-2017-75-RC2-supplement.pdf.

CHARDOT, V.; ECHEVARRIA, G.; GURY, M.; MASSOURA, S.; MOREL, J.L. Nickel bioavailability in an ultramafic toposequence in the Vosges Mountains (France). **Plant and Soil**, v. 1, p. 7–21, 2007. <u>https://doi.org/10.1007/s11104-007-9261-1</u>.

CHOPPIN, G.; LILJENZIN, J.; RYDBERG, J.; EKBERG, C. Chapter 16 - Particle Accelerators. **Radiochemistry and Nuclear Chemistry (Fourth Edition)**, p. 493-512, 2013. <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405897-2.00016-1</u>.

CLARO, P.I.C.; BORGES, E.P.B.S.; SCHELDER, G.R.; ARCHILHA, N.L.; PINTO, AL.; CARVALHO, M.; DRIEMEIER, C.E.; FAZZIO, A.; GOUVEIA, R.F. From micro- to nanoand time-resolved x-ray computed tomography: Bio-based applications, synchrotron capabilities, and data-driven processing. **Applied Physics Reviews**, v. 10, p. 1-20, 2023. <u>https://doi.org/10.1063/5.0129324</u>.

CORZO REMIGIO, A.; CHANEY, R.L.; BAKER, A.J.M.; EDRAKI, M.; ERSKINE, P.D.; ECHEVARRIA, E.; VAN DER ENT, A. Phytoextraction of high value elements and contaminants from mining and mineral wastes: opportunities and limitations. **Plant Soil**, v. 449, p. 11-37, 2020. <u>https://doi.org/10.1007/s11104-020-04487-3</u>.

ECHEVARRIA G. Genesis and behaviour of ultramafic soils and consequences for nickel biogeochemistry. In: van der Ent A, Echevarria G, Baker AJM, Morel JL, editors. **Agromining: Farming for metals**. Extracting unconventional resources using plants. Cham: Springer; 2018. p. 135-56. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-319-61899-9_8</u>.

EL-NAGGAR, A.; AHMED, N.; MOSA, A.; NIAZI, N.K.; YOUSAF, B.; SHARMA, A.; SARKAR, B.; CAI, Y.; CHANG, S.X. Nickel in soil and water: Sources, biogeochemistry, and remediation using biochar. **Journal of Hazardous Materials**, v. 419, p. 1-16, 2021. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126421.

FARJANA, S. H.; HUDA, N.; MAHMUD, M. A. P.; SAIDUR, R. A review on the impact of mining and mineral processing industries through life cycle assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 231, p. 1200-1217, 2019. <u>https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.05.264</u>.

FORNASARO, S. Potentially toxic elements in ultramafic soils: a study from metamorphic ophiolites of the voltri massif (Western Alps, Italy). **Minerals**, v. 9, p. 1-23. 2019. <u>https://doi.org/10.3390/min9080502</u>.

FREITAS, H.; PRASAD, M.N.V.; PRATAS, J. Analysis of serpentinophytes from northeast of Portugal for trace metal accumulation - relevance to the management of mine environment. **Chemosphere**, v. 54, p. 1625–1642, 2004. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.09.045</u>.

FREITAS, E. V. S.; NASCIMENTO, C. W. A.; SILVA, A. J.; DUDA, G. P. Indução da fitoextração de chumbo por ácido cítrico em solo contaminado por baterias automotivas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 467-472, 2009. https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000200024.

FREITAS, E. V. S.; NASCIMENTO, C. W. A. SOUZA, A.; SILVA, F. B. Citric acid-assisted phytoextraction of lead: A field experiment. **Chemosphere**, v.92, p. 213-217, 2013. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.103.</u>

FREITAS, E. V. S.; NASCIMENTO, C. W. A. Degradability of natural and synthetic chelating agents applied to a lead-contaminated soil. **Journal of Soils and Sediments**, v. 17, p. 1272-1278, 2016. <u>http://dx.doi.org/10.1007/s11368-015-1350-9</u>.

GAD, S.C. Nickel and Nickel Compounds. **Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)**, p. 506-510. <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00889-7</u>.

GALEY, M.L.; VAN DER ENT, A.; IQBAL, M.C.M.; RAJAKARUNA, N. Ultramafic geoecology of South and Southeast Asia. **Botanical studies**, v. 58, p. 1-28, 2017. <u>https://doi.org/10.1186/s40529-017-0167-9</u>.

GARNICA-DÍAZ, C.; ITURRALDE, R.B.; CABRERA, B.; CALDERÓN-MORALES, E.; FELIPE, F.L.; GARCÍA, R.; HECHAVARRÍA, J.L.G.; GUIMARÃES, A.F.; MEDINA, E.; PAUL, A.L.D.; RAJAKARUNA, N.; RESTREPO, C.; SIEBERT, S.J.; BERG, E.V.D.; VAN DER ENT, A.; VELASQUEZ, G.; HULSHOF, C.M. Global Plant Ecology of Tropical Ultramafc Ecosystems. **The Botanical Review**, v. 1, p. 1-43, 2022. https://doi.org/10.1007/s12229-022-09278-2. GARNIER, J.; QUANTIN, C.; GUIMARÃES, C.; GARG, V.K.; MARTINS, E.S.; BECQUER, T. Understanding the genesis of ultramafic soils and catena dynamics in Niquelândia, Brazil. **Geoderma**, v. 151, p. 204-214, 2009. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.04.020.

GARNIER, J.; QUANTIN, C.; GUIMARÃES, E.M.; VANTELON, D.; MONTARGES-PELLETIER, E.; BECQUER, T. Cr (VI) genesis and dynamics in Ferralsols developed from ultramafic rocks: The case of Niquelândia, Brazil. **Geoderma**, v. 193, p. 256-264, 2013. http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.08.031.

GEI, V.; ERSKINE, P. D.; HARRIS, H. H.; ECHEVARRIA, G.; MESJASZ-PRZYBYLOWICZ, J.; BARNABAS, A.; PRZYBYLOWICZ, W. J.; KOPITTKE, P. M.; VANDER ENT, A. Tools for the Discovery of Hyperaccumulator Plant Species and Understanding Their Ecophysiology, **Agromining: Farming for Metals**, p. 117-133, 2018. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-319-61899-9_7</u>.

GENCHI, G.; CAROCCI, A.; LAURIA, G.; SINICROPI, M.S.; CATALANO, A. Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, p. 1-21. <u>https://doi.org/10.3390/ijerph17030679</u>.

GERVAIS-BERGERON, B.; PAUL, A.L.D.; CHAGNON, P.; BAKER, A.J.M.; VAN DER ENT, A.; FAUCON, M.; QUINTELA-SABARIS, C.; LABRECQUE, M. Trace element hyperaccumulator plant traits: a call for trait data collection. **Plant and Soil**, v. 1, p. 1-10, 2023. <u>https://doi.org/10.1007/s11104-023-05996-7</u>.

GUILLOT, S.; HATTORI, K. Serpentinites: Essential roles in geodynamics, arc volcanism, sustainable development, and the origin of life. **Elements**, v.9, p. 95-8, 2013. <u>https://doi.org/10.2113/gselements.9.2.95</u>.

GWENZI, W. Occurrence, behaviour, and human exposure pathways and health risks of toxic geogenic contaminants in serpentinitic ultramafic geological environments (SUGEs): A medical geology perspective. **Science of The Total Environment**, v. 700, p. 1-16, 2020. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134622</u>.

HICKS, K.G.; CLUNTUN, A.A.; SCHUBERT, H.L.; HACKETT, S.R.; BERG, J.A.; LEONARD, P.G.; ALEIXO, M.A.A.; ZHOU, Y.; BOTT, A.J.; SALVATORE, S.R.; CHANG, F.; BLEVINS, A.; BARTA, P.; TILLEY, S.; LEIFER, A.; GUZMAN, A.; AROK, A.; FOGARTY, S.; WINTER, J.; AHN, H.; ALLEN, K.N.; BLOCK, S.; CARDOSO, I.A.; DING, J.; DREVENY, I.; GASPER, W.C.; HO, Q.; MATSUURA, A.; PALLADINO, M.J.; PRAJAPATI, S.; SUN, P.; TITTMANN, K.; TOLAN, D.R.; UNTERLASS, J.; VANDEMARK, A.P.; HEIDEN, M.G.V.; WEBB, B.A.; YUN, C.; ZHAO, P.; WANG, B. Protein-metabolite interactomics of carbohydrate metabolism reveal regulation of lactate dehydrogenase. **Science**, v. 379, p. 996-1003, 2023. <u>https://doi.org/10.1126/science.abm3452</u>.

HSEU, Z.Y.; ZEHETNER, F.; FUJII, K.; WATANABE, T.; NAKAO, A. Geochemical fractionation of chromium and nickel in serpentine soil profiles along a temperate to tropical climate gradient. **Geoderma**, v. 327, p. 97-106, 2018. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.04.030. JAFFRÉ, T.; BROOKS, R. R.; LEE, J.; REEVES, R. D. Sebertia acuminata: A Hyperaccumulator of Nickel from New Caledonia. **Science**, v. 193, p. 579-580, 1976. <u>https://doi.org/10.1126/science.193.4253.579</u>.

JAFFRÉ, T.; REEVES, R.D.; BAKER, A.J.M.; SCHAT, H.; VAN DER ENT, A. The discovery of nickel hyperaccumulation in the New Caledonian tree *Pycnandra acuminata* 40 years on: An introduction to a Virtual Issue. **New Phytologist**. v. 218, p.397-400, 2018. https://doi.org/10.1111/nph.15105.

JAISHANKAR, M.; TSETEN, T.; ANBALAGAN, N.; MATHEW, B. B.; BEEREGOWDA, K. N. Interdisciplinary Toxicology, v. 7, p. 60-72, 2014. <u>https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009</u>.

JANSEN, S.; BROADLEY, M. R.; ROBBRETCH, E.; SMETS, E. F. Aluminum Hyperaccumulation in Angiosperms: A Review of Its Phylogenetic Significance. The **Botanical Review**, v. 68, p. 235-269, 2002. <u>https://doi.org/10.1663/0006-</u> <u>8101(2002)068[0235:AHIAAR]2.0.CO;2</u>.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, A. K. **Trace elements in soils and plants**, 4th edn. CRC, Ann Arbor, MI, USA, 2011. <u>https://doi.org/10.1201/b10158</u>.

KIERCZAK, J.; NEEL, C.; ALEKSANDER-KWATERCZAK, U.; HELIOS-RYBICKA, E.; BRIL, H. PUZIEWICK, J. Solid speciation and mobility of potentially toxic elements from natural and contaminated soils: a combined approach. **Chemosphere**, v. 73, 2008. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.015</u>.

KIERCZAK, J.; PIETRANIK, A.; PEDZIWIATR, A. Ultramafic geoecosystems as a natural source of Ni, Cr, and Co to the environment: A review. **Science of The Total Environment**, v. 755, p.1-18, 2021. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142620</u>.

KONG, M.; VOGT, T.; LEE, Y. High-pressure synchrotron X-ray diffraction study of tremolite and actinolite in various fluids. **Current Applied Physics**, v. 18, p. 1218-1224. <u>https://doi.org/10.1016/j.cap.2018.05.018</u>.

KUMAR, M.; LAL, N.; LUTHRA, P.M.; MASRAM, D.T. Exploring the binding and cleavage activities of nickelII complexes towards DNA and proteins. **New Journal of Chemistry**, v. 45, 2021. <u>https://doi.org/10.1039/D0NJ06210C</u>.

LIMA, L.H.V.; NASCIMENTO, C.W.A.; SILVA, F.B.V.; ARAÚJO, P.R.M. Baseline concentrations, source apportionment, and probabilistic risk assessment of heavy metals in urban street dust in Northeast Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 858, p. 1-15, 2023. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022159750</u>.

LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, 2023. <u>https://lnls.cnpem.br/sirius/como-funciona-o-sirius/</u>.

LOMBI, E.; SUSINI, J. Synchrotron-based tecniques for plant and soil science: opportunities, challenges and future perspectives. **Plant Soil**, v. 320, p. 1-35, 2009. <u>http://dx.doi.org/10.1007/s11104-008-9876-x</u>. LOMBINI, A.; DINELLI, E.; FERRARI, C.; SIMONI, A. Plant – soil relationships in the serpentinite screes of Mt. Prinzera (Northern Apennines, Italy). Journal of Geochemical Exploration, v. 64, p. 19–33, 1998. <u>https://doi.org/10.1016/S0375-6742(98)00017-X</u>.

MAHURPAWAR, M. Effects of heavy metals on human health. **International Journal of Research**, p. 1-7, 2015. <u>https://doi.org/10.29121/granthaalayah.v3.i9SE.2015.3282</u>. MARESCOTTI, P.; COMODI, P.; CRISPINI, L.; GIGLI, L.; ZUCCHINI, A.;

MARTENS, S.N.; BOYD, RS. The defensive role of Ni hyperaccumulation by plants: a field experiment. **American Journal of Botany**, v. 89, p. 998-1003, 2002. <u>https://doi.org/10.3732/ajb.89.6.998</u>.

MCCOLLOM, T.M.; SEEWALD, J.S. Serpentinites, Hydrogen, and Life. **Elements**, v. 9, p. 129-134, 2013. <u>https://doi.org/10.2113/gselements.9.2.129</u>.

MEERS, E.; HOPGOOD, M.; LESAGE, E.; VERVAEKE, P.; TACK, F.M.G. & VERLOO, M.G. Enhanced phytoextraction: Search of EDTA Alternatives. **International Journal of Phytoremediation**, v. 6, p.95-109, 2004. <u>https://doi.org/10.1080/16226510490454777</u>.

MEGREMI, I. Distribution and bioavailability of Cr in central Euboea, Greece. **Central European Journal of Geosciences**, v. 2, p. 103–123, 2010. <u>https://doi.org/10.2478/v10085-009-0042-3</u>.

MESJASZ-PRZYBYLOWICZ, J.; NAKONIECZNY, M.; MIGULA, P.; AUGUSTYNIAK, M.; TARNAWSKA, M.; REIMOLD, W.U.; KOERBEL, C.; PRZYBYLOWICZ, W.; GLOWACKA, E. Uptake of cadmium, lead nickel and zinc from soil and water solutions by the nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii*. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, v. 46, p.75–85, 2004.

MINGUZZI, C.; VERGANO O. Contenuto di nichel nelle ceneri di *Alyssum bertolonii* (Nickel content of the ash of *Alyssum bertolonii*) (in Italian). **Atti della Societa Toscana Scienze Naturali**, Pisa, Memorie Serie A, v. 55, p. 49-74, 1948.

MUSTAFA, A.; ZULFIQAR, U.; MUMTAZ, M.Z.; RADZIEMSKA, M.; HAIDER, F. U.; HOLATKO, J.; HAMMERSHMIEDT, T.; NAVEED, M.; ALI, H.; KINTL, A.; SAEED, Q.; KUCERIK, J.; BRTNICKY, M. Nickel (Ni) phytotoxicity and detoxification mechanisms: A review. **Chemosphere**, v. 328, 2023. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138574</u>.

NASCIMENTO, C. W. A.; HESTERBERG, D.; TAPPERO, R. Effects of exogenous citric acid on the concentration and spatial distribution of Ni, Zn, Co, Cr, Mn and Fe in leaves of *Noccaea caerulescens* grown on a serpentine soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 398, 2020. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122992</u>.

NASCIMENTO, C. W. A.; HESTERBERG, D.; TAPPERO, R.; NICHOLAS, S.; SILVA, F. B. V. Citric acid-assisted accumulation of Ni and other metals by *Odontarrhena muralis*: Implications for phytoextraction and metal foliar distribution assessed by m-SXRF. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 1-9, 2020. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114025. NASCIMENTO, C.W.A.; LIMA, L.H.V.; SILVA, Y.A.J.B.; BIONDI, C.M. Ultramafic soils and nickel phytomining opportunities: A review. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.1, p.1-17, 2022. <u>https://doi.org/10.36783/18069657rbcs20210099</u>.

NAVARRETE-GUTIÉRREZ, D. M.; NKRUMAH, P.N.; VAN DER ENT, A.; POLLARD, J.; BAKER, AJ.M.; TORRALBA, F.N.; PONS, M.N.; SÁNCHEZ, J.A.C.; HERNÁNDEZ, T.G.; ECHEVARRIA, G. The potential of Blepharidium guatemalense for nickel agromining in Mexico and Central America. International Journal of Phytoremediation, v. 23, p. 1157-1168. 2021. https://doi.org/10.1080/15226514.2021.1881039.

NKRUMAH, P. N.; CHANEY, R. F.; MOREL, J. L. Agronomy of 'Metal Crops' Used in Agromining. **Agromining: Farming for Metals**, p. 19-22, 2017. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-319-61899-9_2</u>.

NOSKE, G.D.; SONG, Y.; FERNANDES, R.S.; CHALK, R.; ELMASSOUDI, H.; KOEKEMOER, L.; OWEN, C.D.; EL-BABA, T.J.; ROBINSON, C.V.; OLIVA, G.; GODOY, S. An in-solution snapshot of SARS-COV-2 main protease maturation process and inhibition. **Nature Communications**, v. 14, p. 1-13, 2023. <u>https://doi.org/10.1038/s41467-023-37035-5</u>.

NYKVIST, B.; SPREI, F.; NILSSON, M. Assessing the progress toward lower priced long range battery electric vehicles. **Energy Policy**, v. 124, p. 144-155, 2019. <u>https://doi.org/10.1016/j.enpol.2018.09.035</u>.

OKORIE, A.; ENTWISTLE, J.; DEAN, J. R. Estimation of daily intake of potentially toxic elements from urban street dust and the role of oral bioaccessibility testing. **Chemosphere**, v. 86, p. 460-467, 2012. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.09.047</u>.

PAL, A.; DUTTA, S.; MUKHERJEE, P.K.; PAUL, A.K. Occurrence of heavy metalresistance in microflora from ultramafic soil of Andaman. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, p. 207-218, 2005. <u>https://doi.org/10.1002/jobm.200410499</u>.

PECK, D.C.; HUMINICKI, M.A.E. Value of mineral deposits associated with mafic and ultramafic magmatism: implications for exploration strategies. **Ore Geology Reviews**, v.72, p. 269-298, 2016. <u>https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2015.06.004</u>.

QUANTIN, C.; BECQUER, T.; ROUILLER, J.H.; BERTHELIN, J. Oxide weathering and trace metal release by bacterial reduction in a New Caledonia Ferralsol. **Biogeochemistry**, v. 53, p. 323-340, 2001. <u>https://doi.org/10.1023/A:1010680531328</u>.

QUANTIN, C.; ETTLER, V.; GARNIER, J.; ŠEBEK, O. Sources and extractibility of chromium and nickel in soil profiles developed on Czech serpentinites. **Comptes Rendus Geoscience**, 340, 872–882, 2008.

RAMACHANDRA, T. V.; SUDARSHAN, P. B.; MAHESH, M. K.; VINAY, S. Spatial patterns of heavy metal accumulation in sediments and macrophytes of Bellandur wetland, Bangalore. **Journal of Environmental Management**, v. 206, p. 1204-1210, 2018. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.10.014. RAMOS, I.; PATACO, I.M.; MOURINHO, M.P.; LIDON, F.; REBOREDO, F.; PESSOA, M.F.; CARVALHO, M.L.; SANTOS, J.P.; GUERRA, M. Elemental mapping of biofortified wheat grains using micro X-ray fluorescence. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.120, p. 30-36, 2016. <u>https://doi.org/10.1016/j.sab.2016.03.014</u>.

REEVES, R. D.; BAKER, A. J. M.; ROMERO, R. The ultramafic flora of the Santa Elena peninsula, Costa Rica: A biogeochemical reconnaissance. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 93, p. 153-159, 2007. <u>https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2007.04.002</u>.

REEVES, R. D.; BAKER, A. J. M.; JAFFRÉ, T.; ERSKINE, P. D.; ECHEVARRIA, G.; VAN DER ENT, A. A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloid trace elements. **New Phytologist**, v. 218, p. 397-400, 2017. <u>https://doi.org/10.1111/nph.14907</u>.

ROBINSON, B. H.; BROOKS, R. R.; HOWES, A. W.; KIRKMAN, J. H.; GREGG, P. E. H.The potential of the high-biomass nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii* for phytoremediation and phytomining. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 60, p. 115-126, 1997. https://doi.org/10.1016/S0375-6742(97)00036-8.

RUMPHIUS. **Herbarium amboinense** (Het Amboisch Kruid-boek).Vol. 3. Ed. J. Burmannus. Amsterdam, 1743. <u>http://www.botanicus.org/item/31753000819414</u>.

SARAC, I.; BONCIU, E.; BUTNARIU, M.; PETRESCU, I.; MADOSA, E. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of some heavy metals by use of *Allium test*. **Caryologia**, v. 72(2); p. 37-43, 2019. <u>https://doi.org/10.13128/cayologia-256</u>.

SARRET, G.; SMITS, E.A.H.; MICHEL. H.C.; ISAURE, M.P.; ZHAO, F.J.; TAPPERO, R. Chapter One - Use of Synchrotron-Based Techniques to Elucidate Metal Uptake and Metabolism in Plants. **Advances in Agronomy**, v. 119, p. 1-82, 2013. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407247-3.00001-9.

SHAHZAD, B.; TANVEER, M.; REHMAN, A.; CHEEMA, S.A.; FAHAD, S.; REHMAN, S.; SHARMA, A. Nickel; whether toxic or essential for plants and environment - A review. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 132, 2018. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.10.014.

SHALLARI, S.; SCHWARTZ, C.; HASKO, A.; MOREL, J.L. Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. **Science of The Total Environment**, v. 209, p.133-142, 1998. <u>https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)80104-6</u>.

SHEORAN, V.; SHEORAN, A.S.; POONIA, P. Phytomining: a review. **Minerals Engineering**, v. 22, p. 1007-1019, 2009. <u>https://doi.org/10.1016/j.mineng.2009.04.001</u>.

SIEBECKER, M. G.; CHANEY, R. L.; SPARKS, D. L. Nickel speciation in several serpentine (ultramafic) topsoils via bulk synchrotron-based techniques. **Geoderma**, v. 298, p. 35-45, 2017. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.03.008</u>.

SIMONNOT, M.O.; VAUGHAN, J.; LAUBIE, B. Processing of bio-ore to products. **Agromining: Farming for metals.** Extracting unconventional resources using plants. Cham: Springer; p. 39-52, 2018. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-030-58904-2</u>. SLINGSBY, D.R.; BROWN, D.H. Nickel in British serpentine soils. Journal of Ecology. v. 65, p. 597, 1977. <u>https://doi.org/10.2307/2259504</u>.

STRIEDER, A.J. Serpentinização e metassomatismo em rochas ultramáficas: discussão das características e recomendações para o tratamento geoquímica. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 22, p. 329-337, 1992. <u>https://doi.org/10.5327/RBG.V22I3.425</u>.

SZOSTAK, R.; GONÇALVES, A.S.; FREITAS, J.N.; MARCHEZI, P.E.; ARAÚJO, F.L.; TOLENTINO, H.C.N.; TONEY, M.F.; MARQUES, F.C.; NOGUEIRA, A.F. In Situ and Operando Characterizations of Metal Halide Perovskite and Solar Cells: Insights from Lab-Sized Devices to Upscaling Processes. **Chemical Reviews**, v. 123, p. 3160-3236. <u>https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00382</u>.

TANANONCHAI, A.; TANG, M.; PAO, C.W.; SAMPANPANISH, P.; TANTHANUCH, W.; TANCHARAKORN, S. The study of EDTA enhanced Cd accumulation and formation in Napier grass using synchrotron μ X-ray fluorescence imaging and X-ray absorption spectroscopy. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 207, 2023. https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2023.110851.

THORNE, R.L.; ROBERTS, S.; HERRINGTON, R. Climate change and theformation of nickel laterite deposits. **Geology**, v. 40, p. 331-334, 2012. <u>https://doi.org/10.1130/G32549.1</u>.

TOGNACCHINI, A.; ROSENKRANZ, T.; VAN DER ENT, A.; MACHINET G.E.; ECHEVARRIA, G.; PUSCHENREITER, M. Nickel phytomining from industrial wastes: Growing nickel hyperaccumulator plants on galvanic sludges. **Journal of Environmental Management**, v. 254, 2020. <u>https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109798</u>.

TRADING ECONOMICS (2023) – **Níquel (contrato futuro – preços)**. https://pt.tradingeconomics.com/commodity/nickel.

TOMOVIC, G.M.; MIHAILOVIC, N.L.J.; TUMI, A.F.; GAJIC, B.A.; MISLJENOVIC, T.D.; NIKETIC, M.S. Trace metals in soils and several Brassicaceae plant species from serpentine sites of Serbia. **Archives of Environmental Protection**, v. 39, p. 29-49, 2013. <u>https://doi.org/10.2478/aep-2013-0039</u>.

UNVER, I.; MADENOGLU, S.; DILSIZ, A.; NAMLI, A. Influence of rainfall and temperature on DTPA extractable nickel content of serpentine soils in Turkey. **Geoderma**, v. 202, p. 203-211, 2013. <u>https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.03.025</u>.

USGS - The U.S. Geological Survey, 2019. Nickel Statistics and Information. **National Minerals Information Center**. <u>https://www.usgs.gov/centers/nmic/nickel-statistics-and-information</u>.</u>

USGS - The U.S. Geological Survey, 2020. Nickel Statistics and Information. **National Minerals Information Center**. <u>https://www.usgs.gov/centers/nmic/nickel-statistics-and-information</u>.</u>

VAN DER ENT, A.; BAKER, A. J. M.; REEVES, R. D.; POLLARD, A. J.; SCHAT, H. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. **Plant Soil**, v. 362, p. 1-16, 2012. <u>https://doi.org/10.1007/s11104-012-1287-3</u>.

VAN DER ENT, A.; BAKER, A. J. M.; BALGOOY, M. M. J.; TJOA, A. Ultramafic nickel laterites in Indonesia (Sulawesi, Halmahera): Mining, nickel hyperaccumulators and opportunities for phytomining. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 128, p. 72-79, 2013. https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2013.01.009.

VAN DER ENT, A.; MULLIGAN, D. Multi-element concentrations in plant parts and fluids of Malaysian nickel hyperaccumulatorplants and some economic and ecological considerations. **Journal of Chemical Ecology**, v. 41, p. 396–408, 2015. <u>https://doi.org/10.1007/s10886-015-0573-y</u>.

VAN DER ENT, A.; CALLAHAN, D.L.; NOLLER, B.N.; MESKASZ-PRZYBYLOWICZ.; PRZYBYLOWICZ, W.J.; BARNABAS, A.; HARRIS, H. Nickel biopathways in tropical nickel hyperaccumulating trees from Sabah (Malaysia). **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-21, 2017. <u>http://dx.doi.org/10.1038/srep4186</u>.

VAN DER ENT, A.; CARDACE, D.; TIBBETT, M.; ECHEVARRIA, G. Ecological implications of pedogenesis and geochemistry of ultramafic soils in Kinabalu Park (Malaysia). **Catena**, v. 160, p. 154-169, 2018. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.catena.2017.08.015</u>.

VAN DER ENT, A.; ECHEVARRIA, G.; POLLARD, A.J.; ERSKINE, P.D. X-Ray Fluorescence Ionomics of Herbarium Collections. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-5, 2019. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40050-6.

VITHANAGE, M.; RAJAPAKSHA, A.U.; OZE, C.; RAJAKARUNA, N.; DISSANAYAKE, C.B. Metal release from serpentine soils in Sri Lanka. **Environmental Monitoring and assessment**, v. 186, p. 3415-3429, 2014. <u>https://doi.org/10.1007/s10661-014-3626-8</u>.

VITHANAGE, M.; KUMARATHILAKA, P.; OZE, C.; KARUNATILAKE, S.; SENEVIRATNE, M.; HSEU, Z.; GUNARATHNE, V.; DASSANAYAKE, M.; OK, Y. S.; RINKLEBE, J. Occurrence and cycling of trace elements in ultramafic soils and their impacts on human health: A critical review. **Environment International**, v. 131, p. 1-17, 2019. <u>https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104974</u>.

WEBER, J.H.; BANERJEE, M.K. Nickel and Nickel Alloys: An Overview. **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**, 2019. <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.02572-8</u>.

WENZEL, W.W.; BUNKOWSKI, M.; PUSCHENREITER, M.; HORAK, O. Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. **Environmental Pollution**, v. 123, p. 131-138, 2003. https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00341-X.

WERNER, T. T.; BEBBINGTON, A.; GREGORY, G. Assessing impacts of mining: Recent contributions from GIS and remote sensing. **The Extractive Industries and Society**, v. 6, p. 993-1012, 2019. <u>https://doi.org/10.1016/j.exis.2019.06.011</u>.

WINICK, H. Fourth Generation Light Sources. Paper presented at the **17th IEEE Particle** Accelerator Conference (PAC 97), Vancouver, Canada, May 12–16, 1997.

3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X PORTÁTIL PARA O MONITORAMENTO DE NÍQUEL EM PLANTAS

Resumo

A crescente contaminação de solos por níquel ameaça à segurança alimentar e requer análises rápidas para tomadas de decisão em tempo hábil. A espectrometria de fluorescência de raios X portátil (FRXp) vem sendo utilizada para detecção de metais em plantas. Abordagens de preparação das amostras são conflitantes e a precisão das medições depende de cada equipamento utilizado. Dessa forma, o trabalho objetivou avaliar procedimentos de preparo de amostras e a capacidade de predição de Ni em plantas por duas abordagens com FRXp. Para isso, 300 amostras de folhas e raízes de 14 espécies vegetais crescidas em ambientes limpos e contaminados foram avaliadas. Cinco tempos de leitura (30, 60, 90, 120, 300 s) e quatro massas das amostras (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 g) foram testados. As calibrações dos modelos foram realizadas com abordagem empírica e com uso de fator de correção baseado no teor de Ni medido em amostra padrão com teor certificado. Os dados foram submetidos à regressão linear e correlação de Pearson. Os teores médios de Ni nas espécies variaram entre 2,9 e 14960,0 mg kg⁻¹. Os tratamentos de tempo de leitura e massa da amostra afetaram significativamente as medições de Ni (15,0 – 35,0 %). Os melhores parâmetros de determinação foram 1,0 g da amostra e 60 s de tempo de análise com recuperação de 72,0 % do teor certificado, gerando um fator de correção de 1,39 para as estimativas. O modelo empírico de predição apresentou estimativas precisas ($R^2 = 0.94$) com maior precisão para teores altos (> 100,0 mg kg⁻¹). A abordagem com fator de correção obteve predições satisfatórias principalmente para os teores próximos ao limite de detecção. As validações cruzadas apresentaram fortes correlações (r = 0.98) entre os teores preditos e medidos. O uso do FRXp foi eficiente e preciso para as determinações de Ni nas duas abordagens de modelos preditivos testados e os resultados podem servir para monitoramento rápido dos teores de Ni em plantas e aprimoramentos da técnica com determinações in situ.

Palavras-chave: FRXp. Método não-destrutivo. Predição. Preparação de amostras.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A PORTABLE X-RAY FLUORESCENCE METHOD FOR MONITORING NICKEL IN PLANTS

Abstract

The increasing contamination of soils by nickel threatens food safety and requires rapid analysis for timely decision making. Portable X-ray fluorescence spectrometry (pXRF) has been used for detection of metals in plants. Sample preparation approaches are conflicting and measurement accuracy depends on each piece of equipment used. Thus, this work aimed to evaluate sample preparation procedures and the ability to predict Ni in plants by two approaches with pXRF. To this end, 300 leaf and root samples from 14 plant species grown in clean and contaminated environments were evaluated. Five reading times (30, 60, 90, 120, 300 s) and four sample masses (0.5; 1.0; 1.5; 2.0 g) were tested. Calibrations of the models were performed with an empirical approach and using a correction factor based on the Ni content measured in a standard sample with certified content. The data were subjected to linear regression and Pearson correlation. The mean Ni contents in the species ranged from 2.9 to 14960.0 mg kg⁻¹. The treatments of reading time and sample mass significantly affected the Ni measurements (15 -35.0 %). The best determination parameters were 1.0 g of sample and 60 s of analysis time with 72.0 % recovery of the certified content, yielding a correction factor of 1.39 for the estimates. The empirical prediction model showed accurate estimates ($R^2 = 0.94$) with higher accuracy for high contents (> 100.0 mg kg⁻¹). The correction factor approach obtained satisfactory predictions mainly for levels close to the detection limit. The cross-validations showed strong correlations (r = 0.98) between predicted and measured levels. The use of pXRF was efficient and accurate for Ni determinations in both predictive model approaches and these results can serve for rapid monitoring of Ni contents in plants and improvements of the technique with in situ determinations.

Keywords: Non-destructive method. Prediction. Sample preparation. pXRF.

3.1 Introdução

A fluorescência de raios X portátil (FRXp) tem se mostrado como uma técnica móvel, rápida, relativamente barata, segura e eficiente para estudos ambientais. Trata-se de um método multielementar, não destrutivo e não invasivo que pode otimizar investigações de campo em relação a métodos tradicionais de digestão química, que embora mais precisos, são caros, lentos, destrutivos e geram passivos ambientais (RAN et al., 2014; FARIA et al., 2020; HORTA et al., 2021; LENORMAND et al., 2022).

O analisador portátil foi incialmente projetado para triagens e mapeamentos geoquímicos exploratórios com caráter qualitativo sendo um marco para a otimização do tempo entre amostragem, resultados e tomadas de decisão no gerenciamento ambiental (LEMIÈRE, 2018). O rápido avanço e melhorias nos hardwares e softwares dos equipamentos possibilitaram estudos quantitativos em diversas matrizes como: solos, resíduos de mineração, lodo de esgoto, poeira de asfalto, rochas, microplásticos, evidências criminais, itens arqueológicos, obras de arte, material de reciclagem, águas residuais, fertilizantes e plantas (CRADDOCK, 1985; TURNER, 2017; VAN DER ENT et al., 2019; ANDRADE et al., 2021; LENORMAND et al., 2022; PELEGRINO et al., 2022; TOUZÉ et al., 2022; LIMA et al., 2023).

As análises de fluorescência de raio X ocorrem normalmente em pequenas quantidades de amostras e podem ter a precisão e exatidão afetadas por fatores de umidade, número de disparos, tamanho de partículas e presença de componentes orgânicos no material avaliado (RAN et al., 2014; LENORMAND et al., 2022). Adicionalmente, existem inconsistências na literatura sobre preparação das amostras, falta de rigor analítico e diferenças na qualidade dos equipamentos em relação a limites de detecção e na determinação de teores entre elementos leves e pesados, sendo mais precisos para o segundo grupo (TOWETT; SHEPHERD; DRAKE, 2015; LEMIÈRE, 2018; TOUZÉ et al., 2022). Por isso, o desenvolvimento de metodologias e calibrações de modelos nos diferentes instrumentos são fundamentais para a aplicabilidade da técnica.

Tratando-se de plantas, o uso de FRXp é relativamente recente e ocorre principalmente em estudos relacionados à fitorremediação ou nutrição vegetal, possuindo limitações devido à alta umidade e à baixa densidade das amostras em relação aos solos e rochas (ZHOU et al., 2020). Investigações em áreas ultramáficas (in situ) e herbários (ex situ) analisaram milhares de espécies e identificaram dezenas de hiperacumuladoras de metais com potencial para aplicação de fitotecnologias em áreas contaminadas, principalmente por níquel (GEI et al., 2018; VAN DER ENT et al., 2019). O monitoramento dos teores de metais em plantas auxilia tanto na prospecção de espécies para remediação ambiental quanto para a segurança alimentar. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou procedimentos de preparo de amostras e a capacidade de predição de Ni em plantas por duas abordagens com FRXp.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Seleção das espécies e amostragem

A seleção das espécies foi baseada nas informações fisiológicas sobre tolerância, exclusão e acúmulo de Ni por plantas visando um gradiente nos teores do metal (baixo, médio, alto e muito alto). Foram utilizadas 300 amostras de raízes e folhas de 14 espécies vegetais crescidas em solos agrícolas, solos ultramáficos e em troncos de árvores. As espécies foram adquiridas de diferentes experimentos do nosso Grupo de Pesquisa e divididas em 7 hiperacumuladoras de Ni (*Pfaffia sarcophylla, Lippia lupulina, Justicia lanstyakii, Blepharidium guatemalense, Berkheya coddii, Bornmuellera emarginata e Noccaea caerulescens*) e 7 não hiperacumuladoras do elemento (*Zea mays* L., *Saccharum officinarum, Lactuca sativa, Brassica oleracea, Imperata cylindrica, Lupinus albus* e *Calymperes palisotii*).

3.2.2 Preparo das amostras, análises químicas e controle de qualidade

As amostras vegetais foram lavadas com água corrente, e uma tripla lavagem com água destilada, secas em estufa a 65 °C por 48 h, e maceradas num moinho tipo Wiley ($\emptyset < 2,0$ mm). Posteriormente, subamostras de 0,5 g de raízes e folhas foram digeridas com HNO₃ + H₂O₂ (3:1) num forno de micro-ondas (Milestone-Ethos Easy) a 180 °C por 10', de acordo com a metodologia 3050B modificada (USEPA, 1996). Os extratos foram filtrados ($\emptyset < 2,0$ µm), sendo o volume completado até 25 mL com água ultrapura em balões volumétricos certificados e armazenados a 4 °C para posterior análise.

Os teores totais de Ni nas plantas foram determinados por espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP - OES Perkin Elmer 7000 DV). As análises foram realizadas em duplicatas e com testes em branco. Todos os materiais utilizados nas análises foram devidamente lavados, permaneceram imersos por 24 h na solução de HNO₃ (10 %) e depois foram lavados com água destilada. Como controle de qualidade para os teores totais utilizou-se o padrão NIST (National Institute of Standards and Technology) que possui os teores dos metais certificados em planta (SRM 1570a - Trace Elements in Spinach Leaves). A recuperação de Ni na amostra certificada foi considerada satisfatória (90,1 %).

Para o controle de qualidade das medições do FRXp, uma amostra de padrão interno foi utilizada para verificar a precisão do aparelho e avaliar a estabilidade e consistência da análise.

As verificações foram realizadas por medições no início, durante e final de cada dia de trabalho. A variação entre as leituras foi considerada satisfatória (< 5 %).

3.2.3 Aparelho FRXp

As análises de FRXp foram realizadas utilizando o S1 TITAN modelo 800. Este analisador é baseado na tecnologia de energia dispersiva por Fluorescência de Raios X (EDXRF). Quando energizado, o equipamento gera raios X de energia elevada para reportar as concentrações elementares de uma amostra (BRUKER, 2020a). As especificações do analisador portátil estão descritas na tabela 4.

DetectorFAST SDD TM Resolução típica: < 145eV					
Escudo do detectorOpcionalCâmera CMOS a coresInclusa					
Câmera CMOS a cores Inclusa					
Tubo de raio-X com alvo de Rh, 4W. Max: 50kV, 200µA. Limites funcionais:					
6kV/195μA, 15kV/60μA, 40kV/40μA, 45kV/40μA, 50kV/20μA	6kV/195μA, 15kV/60μA, 40kV/40μA, 45kV/40μA, 50kV/20μA				
Colimador 8 mm	8 mm				
Filtro Trocador automático de filtro de cinco posições	Trocador automático de filtro de cinco posições				
Alcance de elementos Mg-U	Mg-U				
Temperatura da amostra 150 °C com filme Ultralene® e até 500 °C com filme Kapton® e adaptador de superfície quente	a amostra 150 °C com filme Ultralene® e até 500 °C com filme Kapton® e adaptador de superfície quente				
Peso 1,5 kg com bateria					
Dimensões 25 cm x 28 cm x 9 cm (comprimento x largura x altura)					
Ambiente operacional Temperatura operacional: -10 a 50 °C; Altitude máxima: 2500 m; Resistente a	Temperatura operacional: -10 a 50 °C; Altitude máxima: 2500 m; Resistente a				
respingo e poeira	respingo e poeira				
Energia Bateria de lítio (7,2V); Carregador de bateria (9V DC @ 3A)	Bateria de lítio (7,2V); Carregador de bateria (9V DC @ 3A)				
9,4 cm LCD táctil a cores integrado, TFT de matriz activa, transflectivo, 640 x					
480 pixels; 65536 cores	480 pixels; 65536 cores				
Software Bruker Elemental S1 proprietary					
Microprocessador de sistema 1 GHz, 512 RAM					
Armazenamento de dados 8 GB (padrão), expansível para 64 GB; memória interna: 8000 leituras com					
espectro; USB: 80000 leituras com espectro					
Sistema operacional PC Windows® XP, Windows® 7 ou Windows® 8					
Transferência de dados Cabo USB, USB flashdrive	Cabo USB, USB flashdrive				
Sistema de segurança Proteção por senha, desligamento sem amostras, sensor de proximidade IR	Proteção por senha, desligamento sem amostras, sensor de proximidade IR				
Idiomas Chinês, Alemão, Inglês, Francês, Holandês, Idonésio, Italiano, Japonês, Coreano	Chinês, Alemão, Inglês, Francês, Holandês, Idonésio, Italiano, Japonês, Coreano,				
Polonês, Português, Russo, Espanhol, Tailandês e Turco	Polonês, Português, Russo, Espanhol, Tailandês e Turco				
Certificação CE, cTUVus, IEC 61010-1:2010 by TUV SUD, EN 61326-1:2006					

Tabela 4 - Especificações do FRXp S1 TITAN modelo 800.

Fonte: Bruker, 2020a.

3.2.4 Protocolo experimental para FRXp

O diâmetro e compacidade das partículas são fatores determinantes durante a preparação das amostras para medição dos teores de metais. Dessa forma, as amostras vegetais anteriormente secas (65 °C) e trituradas em moinho tipo Wiley (Ø < 2,0 mm), foram maceradas em almofariz de ágata e tamisadas (Ø < 300,0 µm) para obtenção de um material mais fino e homogêneo. Cinco tempos de leitura (30, 60, 90, 180 e 360 s) e quatro massas de amostra (0,5, 1,0, 1,5, e 2,0 g) foram testados a fim de compreender limitações do aparelho durante as medições e estabelecer um método padrão. Estes testes foram realizados utilizando uma amostra da hiperacumuladora de Ni *Noccaea caerulescens* (padrão interno com o teor médio de Ni obtido por ICP-OES em diferentes laboratórios). O modo de escaneamento PLANT (calibrado em fábrica) foi utilizado e cada tratamento foi medido cinco vezes. Após os testes, o procedimento padrão para as medições foi estabelecido e está descrito na figura 10. As amostras (n = 300) foram divididas aleatoriamente em dois grupos: experimental e teste; e foram analisadas em triplicata. O conjunto experimental dos dados foi composto por 75,0 % das amostras (n = 240) e o conjunto teste por 25,0 % (n = 60) (validação cruzada). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de Ni no equipamento utilizado são 2,0 e 6,6 mg kg⁻¹, respectivamente (BRUKER, 2020b).

Figura *10*– Modelo esquemático da metodologia desenvolvida para determinação de Ni em plantas por FRXp.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.2.5 Análise de dados

Os dados obtidos foram submetidos a métodos estatísticos univariados (frequência, mínimo, máximo, média, mediana, desvio padrão e coeficiente de variação). Os resultados dos efeitos de tempo e massa na determinação de Ni foram analisados quanto aos critérios de homoscedasticidade e distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk (p > 0,05) e submetidos à análise de variância (ANOVA, $p \le 0,05$). Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelo teste de Tukey ($p \le 0,05$). A calibração empírica foi realizada por regressão linear e as validações dos modelos foram avaliadas por correlação de Pearson. Os procedimentos gráficos e estatísticos foram realizados nos softwares OriginPro 2019 e SISVAR (versão 5.8).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Distribuição dos teores de Ni nas amostras avaliadas por ICP-OES

Os teores médios de Ni nas espécies variaram entre 2,9 e 14960,0 mg kg⁻¹ (Tabela 5). As espécies seguiram a seguinte ordem decrescente quanto aos acúmulos do metal: *B. guatemalense* > *B. coddii* > *B. emarginata* > *P. sarcophylla* > *L. lupulina* > *J. lanstyakii* > *N. caerulescens* > *Z. mays* L. > *L.* sativa > *B. oleracea* > *L. Albus* > *I. cylindrica* > *C. palisotii* > *S. officinarum*. As frequências dos teores de Ni (mg kg⁻¹) encontrados foram: 24,0 % (0 – 100), 7,0 % (101 – 200), 3,0 % (201 – 300), 8,0 % (301 – 400), 2,0 % (401 – 500), 6,0 % (501 – 600), 3,0 % (601 – 2000), 17,0 % (2001 – 4000), 12,0 % (4001 – 6000), 4,0 % (6001 – 8000), 5,0 % (8001 – 10000), 4,0 % (10001 – 12000), 5,0 % (12001 – 15000).

Os altos valores de amplitude, desvio padrão e coeficiente de variação dos dados são parâmetros desejáveis em estudos de calibração pois permitem uma maior faixa de estimativa dos teores por regressão linear (KALNICKY; SINGHVI, 2001). Adicionalmente, a alta variação indica características fisiológicas diferentes sobre acúmulo e tolerância entre as plantas. Por exemplo, os menores teores de Ni foram encontrados em *S. officinarum*, espécie não hiperacumuladora cultivada em solo agrícola com baixo teor disponível do metal (0,14 mg kg⁻¹) e em *C. palisotii*, briófita coletada em área de preservação ambiental e que assimila os nutrientes do material particulado do ar e da água da chuva (KLOS et al., 2018). Já o maior, foi descrito na hiperacumuladora lenhosa mexicana *B. guatemalense*, cultivada em solo ultramáfico com disponibilidade do elemento 470 vezes superior (66,1 mg kg⁻¹).

Os substratos utilizados também influenciaram nos altos teores de Ni em algumas espécies não hiperacumuladoras como *Z. mays* L., *L.* sativa e *B. oleracea* cultivadas sobre solos ultramáficos e sob aplicação de ácido cítrico (agente quelante para aumento da disponibilidade

de metais no solo). Apesar de ser um micronutriente, estas espécies apresentaram acúmulos de Ni dezenas de vezes maiores do que quando cultivadas em condições agrícolas, indicando um alerta para a segurança alimentar, principalmente nas hortaliças folhosas devido à alta transpiração e massa de folhas que intensifica a absorção de água e metais por fluxo de massa (ALFARO et al., 2021). Por outro lado, as espécies *I. cylindrica* e *L. albus* apresetaram baixos teores de Ni nas folhas, mesmo cultivadas em solos ultramáficos. Isso pode ser atribuído às estratégias de proteção contra fitotoxidez do Ni por meio da estabilização do metal pelas raízes e, consequentemente, em um baixo fator de translocação (FERRAZ et al., 2012; TAUQEER et al., 2019).

por lor oldo.				
Espécies (n)	Ni (mg kg ⁻¹)	Substrato	Parte avaliada	Ni Solo ^b
S. officinarum (1)	2,9	Solo agrícola	Folha	0,14
C. palisotii (3)	3,2-7,0	Tronco de árvore	Filóide	-
I. cylindrica (3)	6,0 – 9,3	Solo ultramáfico	Folha	42,0
L. albus (3)	8,2-13,0	Solo ultramáfico	Folha	42,0
Z. mays L. (132) ^a	13,3 - 587,8	Solo ultramáfico	Folha e raiz	87,0 - 352,7
B. oleracea (3)	147,2 - 154,0	Solo ultramáfico	Folha	66,1 - 220,9
<i>L</i> . sativa (6)	166,9 - 224,5	Solo ultramáfico	Folha	66,1 - 220,9
N. caerulescens (3)	481,6 - 566,8	Solo ultramáfico	Folha	42,0
P. sarcophylla (3)	1044 - 3863,0	Solo ultramáfico	Folha	220,9
B. coddii (128)	1168,2 - 13928,8	Solo ultramáfico	Folha e raiz	176,3
J. lanstyakii (1)	2221,5	Solo ultramáfico	Folha	220,9
L. lupulina (1)	3042,5	Solo ultramáfico	Folha	220,9
B. emarginata (12)	3337,0-5800,0	Solo ultramáfico	Folha	42,0
B. guatemalense (1)	14960,0	Solo ultramáfico	Folha	66,1
Parâmetros	Valor			
Mínimo (mg kg ⁻¹)	2,9			
Máximo (mg kg ⁻¹)	14960,0			
Mediana (mg kg ⁻¹)	1853,2			
Média (mg kg ⁻¹)	3150,2			
Desvio P. (mg kg ⁻¹)	3768,2			
CV (%)	119.6			

Tabela 5 – Estatística descritiva e faixa das concentrações de Ni nas espécies determinadas por ICP-OES.

^a Amostras e dados (Nascimento, 2022); ^b Teores disponíveis (mg kg⁻¹) extraídos por DTPA (Lindsay; Norvell, 1978).

3.3.2 Efeito do tempo de leitura e massa das amostras para medições por FRXp

Os teores de Ni foram quantificados em todas as amostras e para todos os tratamentos avaliados. Porém, o tempo de leitura e a massa utilizados afetaram significativamente as medições do metal na amostra de referência (Figura 11). As medições por 30 s apresentaram teor médio de Ni 35,0 % menor do que os outros tempos avaliados. O tempo de medição está

diretamente relacionado com o número de leituras realizadas por segundo, tendo o seu erro de contagem, normalmente minimizado com maior duração da análise (SILVA et al., 2021). Não existe uma padronização do período mínimo necessário para determinações precisas com FRXp. Estudos indicam leituras entre 30 e 200 s podendo variar de acordo com características do equipamento, tipo do elemento (leve ou pesado), faixa de concentração investigada e requisitos de qualidade dos dados (BULL; BROWN; TURNER, 2017; VAN DER ENT et al., 2019; ZHOU et al., 2020; MCGARRY; FLOYD; LITTLETON, 2021).

Para a massa das amostras, o uso de 0,5 g provocou uma redução de 15,0 % no teor de Ni em relação aos demais tratamentos e apresentou variabilidade de 11,0 % entre medições das réplicas. O uso da massa $\ge 1,0$ g combinado ao tempo de leitura ≥ 60 s alcançou recuperações médias de 72,0 % do valor certificado na amostra de referência, gerando um fator de correção 1,39. Adicionalmente, a variabilidade entre os teores das réplicas, nessas condições de medição, foi inferior a 1,0 %. As subestimações dos teores em amostras com menores quantidades podem ser atribuídas à dispersão dos sinais de raios X produzidos devido ao maior espaço de ar entre a amostra e o detector (RAN et al., 2014; TOUZÉ et al., 2022). Estudos mostraram que a moagem ou prensa da matriz avaliada aumentam a homogeneidade da amostra e sua compacidade, reduzindo os espaços de ar na janela de detecção e apresentando maiores teores dos metais nas menores granulometrias (SILVA et al., 2018; SILVA et al., 2021). Por isso, o diâmetro de partícula, o tempo de leitura e a massa da amostra adotados neste estudo foram de \leq 300,0 µm, 60 s e 1,0 g, respectivamente. Estes parâmetros foram escolhidos considerando um sistema ideal entre precisão (< 1,0 % de variação entre as réplicas), exatidão (> 70,0 % de aproximação ao teor de Ni certificado) e preparo mínimo da amostra (secagem e moagem rápidas).



Figura 11 – Efeitos do tempo (A) e da massa (B) na determinação de Ni por FRXp.

Letras maiúsculas iguais não diferem pelo teste Tukey ($p \le 0.05$).

3.3.3 Predição dos teores de Ni e validação dos modelos

A capacidade preditiva dos modelos deve ser validada para verificação da confiabilidade, precisão e exatidão da predição. As duas abordagens mais utilizadas para a calibração dos dados são: (i) regressão linear entre valores medidos por FRXp e os determinados pelo método químico (calibração empírica) e (ii) ajustes por um fator de correção a partir de medições por FRXp em amostras de referência com teores certificados para o metal avaliado (QU et al., 2022; TOUZÉ et al., 2022). As duas abordagens foram consideradas neste trabalho. O conjunto experimental de 240 amostras foi utilizado para a calibração empírica dos dados. A regressão linear apresentou alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,94$) (Figura 12). O alto R^2 encontrado pode ser atribuído ao padrão dos teores de Ni serem menores nas leituras em FRXp do que em ICP-OES. Adicionalmente, o alto número de amostras e suas condições de preparo, a faixa larga de concentrações, a baixa presença de outliers (< 5,0 %) e o controle de qualidade das análises tornaram o modelo mais robusto.



Figura 12 - Correlação entre os teores de Ni determinados por ICP-OES e FRXp (n = 240).

A subestimação dos teores encontrados no FRXp em relação à digestão química pode estar associada à baixa densidade da matriz vegetal e a sensibilidade dos instrumentos, visto que equipamentos como ICP-OES apresentam maiores limites de detecção e quantificação em relação ao uso de FRXp (ZHOU et al., 2020). A precisão do FRXp também é afetada por interferências espectrais interelementares (interferência K α /K β) (USEPA, 2007). Outro fator importante é a variação dos limites de detecção dos elementos entre equipamentos, que depende principalmente da voltagem do tubo e tecnologia dos detectores. Equipamentos modernos com tubos de Rh ou Ag operando na sua capacidade máxima (50 kV e 200 μ A) possuem LDs de 5,0 a 100,0 mg kg⁻¹ para elementos com número atômico entre 19 e 68, como o níquel (LEMIÈRE, 2018; VAN DER ENT, 2019). Porém, os LQs são em média 3 vezes superiores aos LDs e o uso de amostras com teores muito baixos podem reduzir a precisão do modelo. Por isso, a sensibilidade do equipamento deve ser estabelecida pela menor detecção do elemento com recuperação aceitável (USEPA, 2007). Estas limitações foram observadas durante as validações cruzadas (Figura 13).

Figura 13 - (A) Validação cruzada e (B) precisão dos teores de Ni estimados por regressão linear (n = 60). (C) Validação cruzada e (D) precisão dos teores de Ni estimados pelo fator de correção (1,39) (n = 60).



As calibrações empíricas e por ajuste de fator de correção apresentaram fortes correlações entre os teores medidos e preditos (r = 0.98) (Figura 13A e C). No entanto, a acurácia no conjunto teste (n = 60) para os valores preditos por regressão linear foi negativa

para amostras com teores inferiores a 100,0 mg kg⁻¹ (Figura 13B). A acurácia média da predição desconsiderando os valores negativos, foi satisfatória (110,0 %). Dessa forma, os resultados encontrados sugerem que a calibração empírica é mais apropriada para plantas hiperacumuladoras ou espécies cultivadas em solos enriquecidos pelo metal, com faixas de teores acima de 100,0 mg kg⁻¹. Já a calibração por ajuste de fator de correção (1,39) apresentou acurácia média de 96,0 % com maior precisão para teores próximos ao limite de detecção. As duas abordagens de calibração foram consideradas confiáveis devido à baixa dispersão das medições repetidas, e da relativa boa exatidão encontrada.

3.4 Conclusão

Os métodos de preparação das amostras com medições mais rápidas e menor quantidade do material subestimam significativamente a determinação de níquel por FRXp. Predições precisas para Ni ($R^2 = 0.94$) foram obtidas por regressão linear permitindo a redução de análises químicas e tempo para tomadas de decisão no gerenciamento ambiental. O relativo alto limite de quantificação do FRXp testado para o modelo de calibração empírica sugere que seu uso é mais apropriado em plantas hiperacumuladoras ou espécies cultivadas em solos enriquecidos pelo metal. A predição de Ni pelo uso do fator de correção (1,39) foi considerada satisfatória e indicada como melhor opção para a determinação de teores próximos ao limite de detecção. Correlações deste estudo com novas medições in situ podem otimizar ainda mais o tempo de obtenção dos resultados com o mínimo de preparo das amostras.

Referências bibliográficas

ALFARO, M.R.; UGARTE, O.M.; LIMA, L.H.V.; SILVA, J.R.; SILVA, F.B.V.; LINS, S.A.S, NASCIMENTO, C.W.A. Risk assessment of heavy metals in soils and edible parts of vegetables grown on sites contaminated by an abandoned steel plant in Havana. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 44, p. 43-56, 2021. https://doi.org/10.1007/s10653-021-01092-w.

ANDRADE, R.; SILVA, S.H.G.; WEINDORF, D.C.; CHAKRABORTY, S.; FARIA, W.M.; GUILHERME, L.R.G.; CURI, N. Micronutrients prediction via pXRF spectrometry in Brazil: Influence of weathering degree. **Geoderma Regional**, v. 27, p. 1-12, 2021. <u>https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2021.e00431</u>.

BRUKER. Bruker Handheld LLC. **TITAN 800 – graphene Plant Materials - 8 mm or 5 mm spot (P/N 730.0225)**, 2020b. <u>https://www.bruker.com/en/products-and-</u> solutions/elemental-analyzers/handheld-xrf-spectrometers/S1-TITAN.html.

BULL, A.; BROWN, M.T.; TURNER, A. Novel use of field-portable-XRF for the direct analysis of trace elements in marine macroalgae. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 228 – 233. <u>https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.049</u>.

CRADDOCK, P. P. T., Medieval copper alloy production and West African bronze analyses, **Archaeometry**, v. 27, p. 17–41, 1985. <u>https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.1985.tb00344.x</u>.

FARIA, A.J.G.; SILVA, S.H.G.; MELO, L.C.A.; ANDRADE, R.; MANCINI, M.; MESQUITA, L.F.; TEIXEIRA, A.F.S.; GUILHERME, L.R.G.; CURI, N. Soils of the Brazilian Coastal Plains biome: prediction of chemical attributes via portable X-ray fluorescence (pXRF) spectrometry and robust prediction models. **Soil Research**, v. 58, p. 683-695, 2020. <u>https://doi.org/10.1071/SR20136</u>.

FERRAZ, P.; FIDALGO, F.; ALMEIDA, A.; TEIXEIRA, J. Phytostabilization of nickel by the zinc and cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. Are metallothioneins involved? Plant **Physiology and Biochemistry**, v. 57, p. 254-260, 2012. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.05.025.

GEI, V.; ERSKINE, P.D.; HARRIS, H.H.; ECHEVARRIA, G.; MESJASZ-PRZYBYLOWICZ, J.; BARNABAS, A.D.; PRZYBYLOWICZ, W.J.; KOPITTKE, P.M.; VAN DER ENT, A. Tools for the Discovery of Hyperaccumulator Plant Species and Understanding Their Ecophysiology. **Agromining: Farming for Metals**, v.1, p. 117-133, 2018. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-319-61899-9_7</u>.

HORTA, A.; AZEVEDO, L. NEVES, J.; SOARES, A.; POZZA, L. Integrating portable X-ray fluorescence (pXRF) measurement uncertainty for accurate soil contamination mapping. **Geoderma**, v. 382, p. 1-11, 2021. <u>https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114712</u>.

KALNICKY, D.; SINGHVI, R. Field portable XRF analysis of environmental samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 83, p. 93-122, 2001. <u>https://doi.org/10.1016/S0304-3894(00)00330-7</u>.

KŁOS, A.; ZIEMBIK, Z.; RAJFUR, M.; DOŁHA ŃCZUK-ŚRÓDKA, A.; BO CHENEK, Z.; BJERKE, J. W.; TØMME RVIK, H.; ZAGAJEWSKI, B.; ZIÓŁKOWSKI, D.; JERZ, D.; ZIELIŃSKA, M.; KREMS, P.; GODYŃ, P.; MAR CINIAK, M.; ŚWISŁOWSKI, P. Using moss and lichens in biomonitoring of heavy - metal contamination of forest areas in southern and north - eastern Poland. **Science of the Total Environment**, v. 627, p. 438-449, 2018. http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.211.

LEMIÈRE, B. A review of pXRF (field portable X-ray fluorescence) applications for applied geochemistry. **Journal of Geochemical Exploration**, 188, p. 1-14, 2022. <u>https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2018.02.006</u>.

LENORMAND, E.; KUSTNER, C.; COMBROUX, I.; BOIS, P.; WANKO, A. Diagnosing trace metals contamination in ageing stormwater constructed wetlands by portable X-ray Fluorescence Analyzer (pXRF). **Science of the Total Environment**, v. 844, 2022. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157097.

LIMA, L.H.V.; NASCIMENTO, C.W.A.; SILVA, F.B.V.; ARAÚJO, P.R.M. Baseline concentrations, source apportionment, and probabilistic risk assessment of heavy metals in urban street dust in Northeast Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 858, p. 1-15, 2023. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022159750</u>.

LINDSAY, W.L.; NORVELL, W.A. Development of a DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese, and Copper. **Soil Science Society of America Journal**, v. 42, p. 421-428, 1978. https://doi.org/10.2136/sssaj1978.03615995004200030009x.

MCGARRY, A.; FLOYD, B.; LITTLETON, J. Using portable X-ray fluorescence (pXRF) spectrometry to discriminate burned skeletal fragments. **Archaeological and Anthropological Sciences**, v. 117, p. 1-13, 2021. <u>https://doi.org/10.1007/s12520-021-01383</u>.

NASCIMENTO, J.S. Fitomineração induzida e fracionamento de níquel, cromo e cobalto em solo ultramáfico tratado com ácido cítrico. **Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo – UFRPE**, 48p, 2022. <u>http://www.pgs.ufrpe.br/?q=en/dissertations</u>.

PELEGRINO, M.H.P.; SILVA, S.H.G.; FARIA, A.J.G.; MANCINI, M.; TEIXEIRA, A.F.S.; CHAKRABORTY, S.; WEINDORF, D.C.; GUILHERME, L.R.G.; CURI, N. Prediction of soil nutrient content via pXRF spectrometry and its spatial variation in a highly variable tropical área. **Precision Agriculture**, v. 23, p.18-34, 2022. <u>https://doi.org/10.1007/s11119-021-09825-8</u>.

QU, P. NIU, H.C.; WENG, Q.; LI, N.B.; ZHAO, Y.; ZHANG, H.J. Apatite and zircon geochemistry for discriminating ore-forming intrusions in the Luming giant porphyry Mo deposit, Northeastern China. **Ore Geology Reviews**, v. 143, 2022. <u>https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2022.104771</u>.

RAN, J.; WANG, D.; WANG, C.; ZHANG, G.; YAO, L. Using portable X-ray fluorescence spectrometry and GIS to assess environmental risk and identify sources of trace metals in soils of peri-urban areas in the Yangtze Delta region, China. **Environmental Science Processes & Impacts**, v. 16, p. 1-8, 2014. <u>https://doi.org/10.1039/c4em00172a</u>.

SILVA, S.H.G.; SILVA, E.A.; POGGERE, G.C.; GUILHERME, L.R.G.; CURI, N. Tropical soils characterization at low cost and time using portable X-ray fluorescence spectrometer (pXRF): Effects of different sample preparation methods. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, p. 80-92, 2018. <u>http://dx.doi.org/10.1590/1413-70542018421009117</u>.

SILVA, S.H.G.; RIBEIRO, B.T.; GUERRA, M.B.B.; CARVALHO, H.W.P.; LOPES, G.; CARVALHO, G.S.; GUILHERME, L.R.G.; RESENDE, M.; MANCINI, M.; CURI, N.; RAFAEL, R.B.A.; CARDELLI, V.; COCCO, S.; CORTI, G.; CHAKRABORTY, S.; LI, B.; WEINDORF, D.C. pXRF in tropical soils: Methodology, applications, achievements and challenges. **Advances in Agronomy**, v. 167, p. 1- 62, 2021. https://doi.org/10.1016/bs.agron.2020.12.001.

TAUQEER, H.M.; RAHMAN, H.U.; HUSSAIN, S.; ABBAS, F.; IQBAL, M. The potential of an energy crop "*Conocarpus erectus*" for lead phytoextraction and phytostabilization of chromium, nickel, and cadmium: An excellent option for the management of multi-metal contaminated soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 173, p.273-284, 2019. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.119.

TOUZÉ, S.; LAPERCHE, V.; HUBAU, A.; MOREAU, P. pXRF on printed circuit boards: Methodology, applications, and challenges. **Waste Management**, v. 146, p. 66-76, 2022. <u>https://doi.org/10.1016/j.wasman.2022.05.001</u>.

TOWETT, E.K.; SHEPHERD, K.D.; TONDOH, J.E.; WINOWIECKI, L.A.; LULSEGED, T.; NYAMBURA, M.; SILA, A.; VAGEN, T.; CADISCH, G. Total elemental composition of soils in Sub-Saharan Africa and relationship with soil forming factors. **Geoderma Regional**, v. 5, p. 157-168, 2015. <u>https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2015.06.002</u>.

TURNER, A. In situ elemental characterisation of marine microplastics by portable XRF. **Marine Pollution Bulletin**, v. 124, p. 286-291, 2017. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.045.

USEPA - United States Environmental Protection Agency (1978). **Method 3050B:** Acid Digestion of Sludges, Sediments, and Soils, Revision 2. Washington DC. https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/epa-3050b.pdf.

USEPA - United States Environmental Protection Agency (2007). **Method 6200**: Field portable x-ray fluorescence spectrometry for the determination of elemental concentrations in soil and sediment. <u>https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/6200.pdf</u>.

VAN DER ENT, A.; ECHEVARRIA, G.; POLLARD, A.J.; ERSKINE, P.D. X-Ray Fluorescence Ionomics of Herbarium Collections. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-5, 2019. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-019-40050-6</u>.

ZHOU, S.; WEINDORF, D.; CHENG, Q.; YANG, B.; YUAN, Z.; CHAKRABORTY, S. Elemental assessment of vegetation via portable X-ray fluorescence: Sample preparation and methodological considerations. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 174, 2020. <u>https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.105999</u>.

4 POTENCIAL PARA AGROMINERAÇÃO NATURAL E INDUZIDA DE NÍQUEL E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE METAIS AVALIADOS POR μFRX-SR EM CINCO HIPERACUMULADORAS TROPICAIS

Resumo

A capacidade de hiperacumulação pode ser utilizada na agromineração de Ni em áreas ultramáficas, mas há escassez de dados sobre espécies hiperacumuladoras tropicais, especialmente sobre a distribuição de metais nos tecidos vegetais e os mecanismos de tolerância que elas utilizam para lidar com elevados teores de níquel. Estudos que possibilitem a avaliação da distribuição espacial de metais em folhas e em escala celular podem contribuir no entendimento do acúmulo e da tolerância de metais e, consequentemente, na potencialização da agromineração. Desta forma, este trabalho teve como objetivos avaliar o potencial de acumulação de Ni nas hiperacumuladoras tropicais P. sarcophylla, J. lanstyakii, L. lupulina, B. coddii e B. guatemalense (natural e induzida) e avaliar a distribuição de metais intra e extracelular. Para isso, os teores totais de Ni das cinco espécies foram determinados. A espécie com maior acúmulo de Ni foi cultivada sob aplicação de ácido cítrico (40,0 mmol kg⁻¹) visando aumentar a fitoacumulação do metal. A recuperação de Ni no bio-minério foi avaliada. A distribuição espacial dos metais em folhas inteiras e hidratadas foi avaliada por microfluorescência de raios-X baseada em luz síncrotron. Adicionalmente, cortes histológicos e testes histoquímicos foram realizados na espécie mais promissora para observar a distribuição de Ni a nível celular. As plantas acumularam concentrações de Ni que variaram de 2222,0 (P. sarcophylla) a 14960,0 mg kg⁻¹ (B. guatemalense). As outras espécies acumularam 3042,5 (L. lupulina), 3863,0 (J. lanstyakii) e 11387,0 (B. coddii) mg kg⁻¹ de Ni nas folhas. A distribuição espacial de níquel, Mn, e Co foi semelhante em todas as espécies, com acumulação preferencial nas margens e nervuras das folhas. A análise microscópica em B. guatemalense mostrou que o Ni estava concentrado na epiderme e no floema, sugerindo translocação para tecidos mais jovens e provável mecanismo de defesa contra herbívoros e raios ultravioletas. A aplicação de ácido cítrico duplicou a disponibilidade de Ni no solo. O teor de Ni na biomassa aérea de B. guatemalense foi de 14960,0 mg kg⁻¹, com 18,0 % de Ni no biominério. As plantas tratadas com ácido cítrico mostraram um aumento na translocação de Ni das raízes para as folhas e, consequentemente, no teor de Ni na biomassa (18405,0 mg kg⁻¹). Por sua vez, o teor de Ni no biominério atingiu 30,0 %. Os nossos dados indicam um baixo potencial das hiperacumuladores brasileiras aqui avaliadas para a agromineração comercial. No entanto, a acumulação elevada de Ni por *B. guatemalense* e *B. coddii* torna estas espécies candidatas à agromineração tropical. Os nossos resultados precisam ser confirmados em condições de campo, mas indicam que o ácido cítrico pode aumentar a eficiência da agromineração de Ni com B. guatemalense em solos ultramáficos.

Palavras-chave: Biominério. Fitoextração induzida. Fitomineração. Luz síncrotron. Plantas metalófitas.

POTENCIAL FOR NATURAL AND INDUCED NICKEL AGROMINING AND SPATIAL DISTRIBUTION OF METALS ASSESSED BY SR-µXRF IN FIVE TROPICAL HYPERACCUMULATORS

Abstract

The capacity for hyperaccumulation can be used in the agromining of Ni in ultramafic areas, but there is a scarcity of data on tropical hyperaccumulator species, especially on the distribution of metals in plant tissues and the tolerance mechanisms they use to deal with high levels of nickel. Studies that allow the evaluation of the spatial distribution of metals in leaves and on a cellular scale may contribute to the understanding of metal accumulation and tolerance and, consequently, to the potentiation of agromining. Thus, this work aimed to evaluate the potential for natural and induced accumulation of Ni of the tropical hyperaccumulators P. sarcophylla, J. lanstyakii, L. lupulina, B. coddii and B. guatemalense and to evaluate the distribution of metals intra and extracellularly. For this, the total Ni contents of the five species were determined. The species with the highest Ni accumulation was grown under citric acid application (40.0 mmol kg⁻¹) aiming to increase the phytoaccumulation of the metal. The recovery of Ni in the bio-mineral ore was evaluated. The spatial distribution of metals in whole and hydrated leaves was evaluated by synchrotron light-based X-ray microfluorescence. Additionally, histological sections and histochemical tests were performed on the most promising species to observe Ni distribution at the cellular level. Plants accumulated Ni concentrations ranging from 2222.0 (*P. sarcophylla*) to 14960.0 mg kg⁻¹ (*B. guatemalense*). The other species accumulated 3042.5 (L. lupulina), 3863.0 (J. lanstyakii) and 11387.0 (B. *coddii*) mg kg⁻¹ of Ni in the leaves. The spatial distribution of nickel, Mn, and Co was similar in all species, with preferential accumulation in leaf margins and veins. Microscopic analysis in B. guatemalense showed that Ni was concentrated in the epidermis and phloem, suggesting translocation to younger tissues and probable defense mechanism against herbivores and ultraviolet rays. Citric acid application doubled the availability of Ni in the soil. The Ni content in the aerial biomass of *B. guatemalense* was 14960.0 mg kg⁻¹, with 18.0 % Ni in the bio-ore. Citric acid-treated plants showed an increase in Ni translocation from roots to leaves and, consequently, in Ni content in biomass (18405.0 mg kg⁻¹). In turn, the Ni content in the bio-ore reached 30.0 %. Our data suggest a low potential of the Brazilian hyperaccumulators tested here for commercial agromining. However, the high Ni accumulation by B. guatemalense and B. coddii makes these species candidates for tropical agromining. Additionally, our results need to be confirmed under field conditions, but indicate that citric acid may increase the efficiency of Ni agromining with B. guatemalense in ultramafic soils.

Keywords: Bio-ore. Induced phytoextraction. Metallophytic plants. Phytomining. Synchrotron light.

4.1 Introdução

A hiperacumulação é um fenômeno raro na natureza pelo qual plantas conseguem acumular teores de metais ou metaloides centenas a milhares de vezes superiores em relação a maioria das outras espécies vegetais (REEVES et al., 2017). Apesar da ampla distribuição geográfica, a maioria das espécies estudadas são de regiões de clima temperado. Entretanto, dentre as de clima tropical, algumas espécies foram descritas com acúmulos de até 7,6 % de Ni nas folhas (AUGUSTYNIAK et al., 2002; REEVES; BAKER; ROMERO, 2007; MARCHIORETTO; MIOTTO; SIQUEIRA, 2010; VAN DER ENT; MULLIGAN, 2015; NAVARRETE-GUTIÉRREZ et al., 2021). Diversos estudos mostram a potencialidade do uso de hiperacumuladoras para remediação de solos poluídos por metais, em muitos desses são necessárias décadas para mitigar a poluição a um nível de risco aceitável (FAYIGA; SAHA, 2016; SHAH; DAVEREY, 2020).

Quando essas espécies são usadas na recuperação de metais com valor comercial de solos ou substratos enriquecidos, por outro lado, o uso de hiperacumuladoras pode ser economicamente viável. Essa fitotecnologia, conhecida como agromineração, consiste no uso de plantas para extrair metais de substratos enriquecidos (solos, sedimentos, saprólitos, lamas industriais, entulhos de minas) e transformá-los em bio-minérios que podem ser utilizados pelas indústrias (VAN DER ENT & MULLIGAN, 2015; NKRUMAH; CHANEY; MOREL, 2017). O Ni é o metal mais promissor na agromineração devido à quantidade de espécies vegetais que podem ser utilizadas e pelo alto valor e tamanho do mercado para o elemento, que movimenta cerca de US\$ 36 bilhões anualmente (SIMONNOT; VAUGHAN; LAUBIE, 2018; USGS, 2019). No entanto, o sucesso da agromineração de Ni depende principalmente da capacidade de hiperacumulação da espécie, da sua produção significativa de biomassa e da disponibilidade de Ni no substrato.

Técnicas que aumentam a disponibilidade de Ni no solo e extração pelas plantas, embora não obrigatórias para o processo, podem aumentar a performance da agromineração. Entre estas, podemos destacar o uso de fertilizantes, herbicidas, correção de pH, maior densidade de plantio, inoculação microbiana e agentes quelantes (BANI et al., 2015a; BANI et al., 2015b; BANI; ECHEVARRIA, 2019; NASCIMENTO et al., 2020). Tratando-se de quelantes naturais, pesquisas mostram o potencial do uso do ácido cítrico ($C_6H_7O_8$) na fitoextração de metais por ser um ácido orgânico natural de baixo peso molecular, hidrossolúvel, de menor custo e rápida biodegradabilidade (FREITAS et al., 2009; FREITAS et al., 2013; FREITAS; NASCIMENTO, 2016). O ácido cítrico pode complexar o Ni aumentando a disponibilidade e, consequentemente, a absorção do metal pela planta (VITHANAGE et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020; NASCIMENTO; HESTERBERG; TAPPERO, 2020).

O fenômeno da hiperacumulação depende da alta tolerância das plantas aos metais, que pode ser obtida pela desintoxicação do metal e pela compartimentalização intracelular. Uma compreensão mais abrangente dos mecanismos na microescala (tecidos e células) envolvidos na acumulação e tolerância de Ni por espécies acumuladoras pode contribuir para novos métodos que impulsionem a agromineração no campo. Para preencher essa lacuna de conhecimento, técnicas como micro-fluorescência de raios-X baseada em luz síncrotron (µFRX-SR) e observação de estruturas celulares por meio de cortes transversais permitem avaliações em macro e microescala, auxiliando na compreensão da dinâmica e acúmulo de metais nos tecidos das plantas (VAN DER ENT et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2020).

Por isso, investigações sobre plantas hiperacumuladoras, avaliações da distribuição histológica de metais e efeitos do uso de quelantes em solos ultramáficos são importantes na busca da potencialização da agromineração de níquel. Nesse sentido, o presente trabalho objetivou: (i) avaliar o potencial de agromineração de Ni em cinco espécies hiperacumuladoras tropicais (*P. sarcophylla, L. lupulina, J. lanstyakii, B. guatemalense* e *B. coddii*); (ii) entender os efeitos da aplicação de ácido cítrico na disponibilização de Co, Cr e Ni no solo ultramáfico e na hipercumulação de metais por plantas; (iii) e avaliar a distribuição espacial intra e extracelular de metais em folhas de hiperacumuladoras usando luz síncrotron e análises histológicas.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Obtenção e descrição das espécies

Cinco espécies de hiperacumuladoras tropicais foram estudadas, sendo três brasileiras (*P. sarcophylla, L. lupulina, J. lanstyakii*), uma mexicana (*B. guatemalense*) e uma africana (*B. coddii*) (Figura 14). As três espécies brasileiras foram selecionadas e coletadas baseada nos maiores teores de níquel determinados por FRXp durante um levantamento exploratório no complexo máfico-ultramáfico do município da Niquelândia – GO (14° 27'28"S e 48° 27' 59"O) (Figura 15). Dez plantas de cada espécie e uma amostra composta de solo da área ultramáfica foram coletadas e armazenadas para posterior análise. Sementes das espécies mexicana e africana foram enviadas do estado de Chiapas e da província de Mpumalanga, respectivamente, para posterior cultivo em solo ultramáfico coletado (0 - 20 cm) no município de Buenos Aires

– PE (07º 44' 04"S e 35º 24' 59"O). Quanto à descrição das espécies, foram estudadas plantas de famílias e características de crescimento distintas.

L. lupulina, popularmente conhecida por alecrim do Cerrado, pertence à família Verbenaceae e é uma espécie endêmica do Brasil, podendo ser encontrada também na Argentina, Bolívia e Paraguai. Trata-se de um subarbusto aromático, com inflorescências em tons de rosa, adpatado às condições de secas sazonais e que pode atingir até 1,1 m de altura (MORAIS et al., 2022). Esta espécie possui acúmulo de Ni registrado de aproximadamente 1000,0 mg kg⁻¹ (REEVES et al., 2007; FUNARI et al., 2016; MORAIS et al., 2022).

J. lanstyakii, popularmente conhecida por crista do Cerrado, pertence à família Acanthaceae. É uma espécie nativa do Brasil com crescimento subarbustivo que varia entre 30 e 50 cm e possui uso ornamental devido suas inflorescências vermelhas (LIMA et al., 2022). Os acúmulos foliares de Ni relatados para esta planta variaram entre 691,0 e 2309,0 mg kg⁻¹ (RATIÉ et al., 2019).

P. sarcophylla, popularmente conhecida por Ginseng-brasileiro, pertence à família Amaranthaceae. É uma espécie brasileira, endêmica do estado de Goiás, com crescimento subarbustivo (0,6 – 1,2 m), preferencialmente, nos períodos secos (PEDERSEN, 1997; MARCHIORETTO; MIOTTO; SIQUEIRA, 2010; MARCHIORETTO, 2015). Esta espécie teve acúmulos de Ni registrados em solos ultramáficos entre 370,0 e 1044,0 mg kg⁻¹ (NASCIMENTO et al., 2022).

B. coddii pertence à família Asteraceae e é endêmica da África do Sul. A espécie possui crescimento arbustivo atingindo 1,5 m de altura além de produzir uma biomassa média de 300 g por planta (ROBINSON et al., 1997; CHANEY et al., 2014). O nome da planta é oriundo da homenagem ao botânico sul-africano Olive Mary Hilliard Codd. Trata-se de uma planta perene com folhas de textura áspera devido à presença de pelos na superfície. Esta espécie é geralmente cultivada em jardins devido ao apelo estético das suas inflorescências (PLUMMER, 2022). Quanto ao acúmulo de Ni, a *B. coddii* possui o recorde global com 7,6 % do elemento nas folhas (MESJASZ-PRZYBYLOWICZ et al., 2004; REEVES et al., 2017).

B. guatemalense pertence à família Rubiaceae e é uma espécie arbórea nativa da América Central (Guatemala, Honduras e México). Apesar do seu crescimento inicial no formato de arbusto com caules pouco espessos, esta árvore pode atingir até 18 metros de altura e já foram observados acúmulos foliares de Ni superiores a 4,0 % (NAVARRETE-GUTIÉRREZ et al., 2021). A conservação da espécie ocorre em duas áreas de proteção, a Reserva da Biosfera "Montes Azules" no estado de Chiapas, no México, e no Parque Nacional "Sierra del Lacandón", na Guatemala (FUENTES; MARTÍNEZ; SAMAIN, 2021).

Figura 14 - Locais de obtenção das espécies hiperacumuladoras estudadas. (a) sementes de *B. guatemalense* enviadas do México; (b) *J. lanstyaki*, (c) *L. lupulina* e (d) *P. sarcophylla* coletadas no Brasil; (e) sementes de *B. coddii* enviadas da África do Sul.



Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 15 - Área de coleta das hiperacumuladoras brasileiras no município de Niquelândia-GO.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.2.2 Caracterização química e mineralógica dos solos e teste com ácido cítrico

As amostras de solo foram secas ao ar e peneiradas em malha de abertura de 2,0 mm para a determinação do pH em água na relação de 1:2.5 (v/v); K⁺ e Na⁺ trocáveis extraídos com a solução de Mehlich-1 e determinados por fotometria de emissão de chama; Ca²⁺ e Mg²⁺ trocáveis determinados pelo método volumétrico por titulação com EDTA (0,025 mol L⁻¹) após a extração desses cátions pela solução de cloreto de potássio (KCl) 1 mol L⁻¹; Al³⁺ trocável determinado pelo método volumétrico por titulação com hidróxido de sódio (0,025 mol L⁻¹), após a extração com KCl 1 mol L⁻¹; acidez potencial por titulação alcalimétrica do extrato após a extração com solução de acetato de cálcio $(0,5 \text{ mol } L^{-1})$, com pH ajustado para 7,1–7,2; fósforo disponível por colorimetria após extração com a solução de Mehlich-1; e carbono orgânico total pelo método de oxidação via-úmida Walkley-Black (TEIXEIRA, 2017) (Tabela 1). Os teores disponíveis de Co, Cr e Ni nos solos foram avaliados por DTPA (LINDSAY; NORVELL, 1978). A extração dos teores totais dos metais foi realizada pela digestão de 0,5000 g ($\emptyset < 2,0$ mm) das amostras de solo em beckers de teflon com solução ácida (HF + HNO₃ + HClO₄ + HCl) em chapa aquecedora a 190 °C (ALVAREZ et al., 2001); todos os extratos foram filtrados $(\emptyset < 2,5 \ \mu m)$; e os volumes aferidos em balões volumétricos certificados de 25 mL (NBR ISSO/IEC) com água ultrapura; e armazenados a 4 °C para posterior análise.

A análise mineralógica foi realizada na fração areia grossa, sendo determinada por difração de raios x (DRX) em um difratômetro modelo Shimadzu XRD 6000, operado com tubo de Cobre (Cu) a 40 kV e 30 mA. Amostras das frações areia, em forma de pó, foram analisadas em uma amplitude de 5-65° (2θ) e velocidade de 1,0 2θ min⁻¹. A fração areia foi obtida por meio de centrifugação segundo Jackson (1969) e identificada por meio da microscopia ótica, determinada de acordo com as propriedades macroscópicas, segundo Leinz & Campos (1979). Os critérios empregados para interpretação dos difratogramas e identificação dos minerais constituintes da fração areia foram baseados no espaçamento interplanar (d) e no comportamento dos picos de difração frente aos tratamentos de saturação e térmicos empregados, conforme apresentado por Jackson (1975), Brown & Brindley (1980) e Moore & Reynolds (1989).

Cinco doses de ácido cítrico (0, 5, 10, 20, 40, 80 mmol kg⁻¹) foram aplicadas em triplicatas de 250 g dos solos ultramáficos da Niquelândia e Buenos Aires. Subamostras de 20 g de solo foram coletadas 2, 5, 10, 15, 28 e 45 dias após a aplicação do quelante. O pH dos solos e os teores disponíveis de Ni, Cr e Co foram determinados considerando a variação do tempo de aplicação do ácido. Esta etapa foi realizada para a escolha ideal da dose de ácido cítrico para o experimento com agromineração.
							0 5		
Solo	pН	H+A1	Ca	Mg	Al	Na	Κ	Р	COT ^a
	(H_2O)			-cmol _c o	1m ⁻³			mg dm ⁻³	g kg ⁻¹
BA - PE	6,6	2,6	1,3	40,0	0,0	0,3	0,1	0,0	20,0
NIQ - GO	6,5	2,3	0,6	3,0	0,0	0,4	0,1	0,0	12,0

Tabela 6 - Atributos químicos dos solos ultramáficos de Buenos Aires – PE (BA) e Niquelândia-GO (NIQ) utilizados no experimento em casa de vegetação.

^aCarbono orgânico total do solo.

4.2.3 Experimento de agromineração

A espécie *B. guatemalense* foi escolhida para o experimento em casa de vegetação devido ao maior potencial de acúmulo de Ni descrito na literatura em relação às determinações prévias (FRXp) dos teores do metal encontrados nas outras hiperacumuladoras aqui testadas (NAVARRETE-GUTIÉRREZ et al., 2021). Sementes de *B. guatemalense* foram germinadas em areia + vermiculita (1:1 v/v) (27,0 % de taxa de germinação). Após 15 dias, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos contendo 5,0 kg do solo ultramáfico de Buenos Aires – PE ($\emptyset < 2 \text{ mm}$) e cultivadas por 90 dias. O experimento foi realizado num delineamento inteiramente casualizado com três repetições e o tratamento com ácido cítrico (40,0 mmol kg⁻¹) foi aplicado em dose total no 85° dia de cultivo (considerando a rapidez da morte da planta após a aplicação do quelante). Os vasos não foram fertilizados para simular uma condição natural e irrigados com água destilada diariamente mantendo o solo a aproximadamente 80,0 % da capacidade de retenção de água.





Fonte: Arquivo pessoal.

4.2.4 Análises químicas das plantas e potencial de fitoextração de metais

As plantas de *B. guatemalense* foram coletadas e separadas em raiz e parte aérea. As amostras vegetais foram lavadas com água corrente, e uma tripla lavagem com água destilada, secas em estufa a 65 °C, e maceradas num moinho tipo Wiley. Posteriormente, subamostras de 0,5 g de raízes e folhas foram digeridas com HNO₃ + H₂O₂ (3:1) num forno de micro-ondas (Milestone-Ethos Easy) a 180 °C por 10', de acordo com a metodologia 3050B modificada (USEPA, 1996). Para as espécies brasileiras e *B. coddii* apenas as partes aéreas foram analisadas. Todos os extratos obtidos das digestões foram filtrados ($\emptyset < 2,0 \mu$ m), sendo o volume completado até 25 mL com água ultrapura em balões volumétricos certificados. Os extratos foram armazenados a 4 °C para posterior análise.

O potencial de fitoextração de Co, Cr, e Ni por *B. guatemalense* foi avaliado pelos fatores de translocação e bioconcentração (FBC) dos metais (SILVA et al., 2017; CERDEIRA-PÉREZ et al., 2019), de acordo com as equações abaixo:

$$Translocação = \frac{Metal_{PA} (mg kg^{-1})}{Metal_{raiz} (mg kg^{-1})} \quad (Eq. 1)$$

$$FBC = \frac{Metal_{PA} (mg kg^{-1})}{Metal_{solo} (mg kg^{-1})} \quad (Eq. 2)$$

Onde, $Metal_{PA}$ é o teor do metal na parte aérea da planta (mg kg⁻¹); $Metal_{raíz}$ é o teor do metal nas raízes (mg kg⁻¹) e $Metal_{solo}$ é o teor total do metal no solo (mg kg⁻¹).

4.2.5 Obtenção do bio-minério

Após a determinação dos teores totais de Ni nas plantas, a espécie com maior acúmulo do metal nas folhas foi escolhida (*B. guatemalense*) e as folhas das repetições foram secas a 60 °C, moídas em moinho de facas e incineradas em mufla a 550 °C por 3 h. Após combustão, as cinzas (bio-minério) foram retiradas da mufla e pesadas. Para quantificar o teor de Ni no bio-minério, 0,2 g foram transferidos para tubos de teflon onde se adicionou 8,5 mL de HNO₃ e 1,5 mL de H₂O₂ para digestão total em forno de micro-ondas modelo Ethos EZ (Milestone, Sorisole, Itália) (ZHANG et al., 2014). Os extratos foram armazenados a 4 °C para posterior determinação.

4.2.6 Microfluorescência de raios X baseada em luz síncrotron

A medição de FRX foi realizada na microssonda de fluorescência de raios-X do NSLS-II, Laboratório Nacional Brookhaven – Estados Unidos da América. Folhas jovens de *P. sarcophylla, L. lupulina, J. lanstyakii* e *B. guatemalense* foram lavadas em água deionizada para remover partículas aderidas. A folhas foram posicionadas em quadros de slides com fita Kapton e seladas com um filme de ultralene para evitar a desidratação dos tecidos (Figura 17A); cada quadro foi então colocado num amostrador posicionado a 45° de incidência do feixe de raios X. A energia foi selecionada usando um monocromador de Si (111), e o feixe foi focado por espelhos Kirkpatrick-Baez para produzir um tamanho do ponto de 10 μ m × 15 μ m na amostra de folha. A fluorescência de raios X foi medida com um Vortex®-ME7 Silicon Drift Detector com detectores quânticos eletrônicos Xspress3 posicionados a 90° para o feixe incidente. A imagem foi feita no modo fly scan com energia de 10,0 keV usando um pixel com tamanho de 15 μ m e tempos de permanência de 100 ms/pixel para as folhas. As imagens foram criadas pelo software GSE Map Viewer (Larch) (Figura 17B e C).

Figura 17 - Modelo esquemático da análise de microfluorescência de raios X baseada em luz síncrotron realizada no Laboratório Nacional Brookhaven.



Fonte: Sarah Nicholas e Ryan Tappero.

4.2.7 Análises anatômicas

Para identificar a distribuição tecidual foram confeccionadas lâminas semipermanentes de *B. guatemalense* utilizando técnicas de corte à mão livre, com auxílio de lâminas cortantes. Os cortes transversais (lâmina foliar) foram clarificados em hipoclorito de sódio 2,0 %, lavados em água destilada, neutralizados com ácido acético 1,0 %, corados com solução de Azul de Alcian e Safranina, e montados entre lâmina e lamínula com glicerina a 50,0 % (KRAUS; ARDUIN, 1997). Para identificar a localização do níquel, cortes de controle (sem processo de descoloração) e cortes corados com Dimetilglioxima foram preparados de acordo com Moradi et al. (2010). As lâminas foram examinadas e fotografadas usando um microscópio óptico de luz Bel Photonics acoplado a uma câmera digital e software BEL.

4.2.8 Determinação dos metais e controle de qualidade

Os teores totais e disponíveis de Co, Cr e Ni nos solos e dos metais nas plantas foram determinados por espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP - OES Perkin Elmer 7000 DV). As análises foram realizadas em duplicatas e com testes em branco. Todos os materiais utilizados nas análises foram devidamente lavados, permaneceram imersos por 24 h na solução de HNO₃ (10,0 %) e depois foram lavados com água destilada. Um mililitro da solução de 0,5 mol L⁻¹ de Lu foi adicionado nos extratos (Lu como padrão interno para a correção dos interferentes analíticos na determinação dos metais em ICP–OES). Como padrão de qualidade para os teores totais utilizou-se dois padrões NIST (National Institute of Standards and Technology) que possui os teores dos metais certificados em solo (SRM 2710 - Montana I Soil) e planta (SRM 1570a - Trace Elements in Spinach Leaves). As recuperações de Co, Cr e Ni nas amostras certificadas variaram entre 90,0 e 95,0 % para planta e 91,0 a 106,0 % para solo, sendo consideradas satisfatórias. Os limites de decteção para os metais foram (mg kg⁻¹): 0,1 (Co), 0,2 (Cr) e 0,4 (Ni).

4.2.9 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos a métodos estatísticos univariados (média e desvio padrão). Os resultados do acúmulo natural e induzido de Ni pela hiperacumuladora *B. guatemalense* foram analisados quanto aos critérios de homoscedasticidade e distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk (p > 0,05) e submetidos à análise de variância (ANOVA, p $\leq 0,05$). O efeito do acúmulo de Ni após aplicação de ácido cítrico ao solo foi avaliado pelo teste de Tukey (p $\leq 0,05$). Os procedimentos gráficos e estatísticos foram realizados usando os softwares OriginPro 2019 e SISVAR (versão 5.8).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Disponibilidade natural e induzida de Co, Cr e Ni em solos ultramáficos

Os teores disponíveis dos metais nos solos ultramáficos da Niquelândia e Buenos Aires foram: 1,0 e 2,4 mg kg⁻¹ para Co; < LD para Cr e 220,9 e 66,1 mg kg⁻¹ para Ni, respectivamente. A baixa disponibilidade encontrada para Co e Cr está relacionada com a presença destes metais em minerais resistentes ao intemperismo, como espinélio, magnetita e cromita, ou à adsorção por óxihidróxidos de ferro e manganês que ocorrem em abundância nestes ambientes (GARNIER et al., 2013; VITHANAGE et al., 2014; ERTANI et al., 2017). Para níquel, a disponibilidade foi considerada alta nos dois solos, visto que a média mundial do teor total do elemento não ultrapassa 29,0 mg kg⁻¹ (KABATA-PENDIAS, 2011). Embora o Ni em ambientes ultramáficos também esteja associado principalmente a óxidos de Fe, sua alta presença em minerais primários como, olivina, piroxênios e anfibólios, e em minerais do grupo das serpentinas, facilita a liberação para o solo, tornando-o mais móvel e biodisponível em relação à Co e Cr (VITHANAGE et al., 2014; KIERCZAK et al., 2016).

Tratando-se da disponibilidade de Co, Cr e Ni induzida por ácido cítrico, foram observados aumentos significativos para todos os metais (Figura 18). Os incrementos para os teores disponíveis de Ni no solo da Niquelândia – GO, seguindo a aplicação crescente das doses (5, 10, 20, 40 e 80 mmol kg⁻¹), foram de 1,0 % (222,0 mg kg⁻¹), 10,0 % (242,4 mg kg⁻¹), 20,0 % (265,0 mg kg⁻¹), 87,0 % (412,8 mg kg⁻¹) e 145,0 % (543,8 mg kg⁻¹). Para o solo de Buenos Aires – PE, a disponibilidade do metal foi aumentada em 51,0 % (104,3 mg kg⁻¹), 86,0 % (128,6 mg kg⁻¹), 155,0 % (176,3 mg kg⁻¹), 277,0 % (260,9 mg kg⁻¹) e 436,0 % (370,9 mg kg⁻¹). Existe uma relação direta entre disponibilidade do elemento e absorção por plantas. Por isso, os incrementos da labilidade de Ni nos solos ultramáficos são desejáveis na busca da otimização da performance de remoção do metal. Além disso, a ação do ácido cítrico não é seletiva apenas para o metal de interesse. Cromo, por exemplo, teve sua disponibilidade aumentada de 15 a 100 vezes sob a aplicação da maior dose do quelante (80 mmol kg⁻¹). Contudo, os teores disponíveis permaneceram baixos, sendo 1,5 mg kg⁻¹ em Buenos Aires e 4,9 mg kg⁻¹ na Niquelândia.

A baixa disponibilidade de Cr mesmo após aplicação do ácido cítrico, reforça a forte presença do metal em formas residuais. Para Co, a média mundial de teor total está entre 10 e 15 mg kg⁻¹ (KABATA-PENDIAS, 2011), e por isso, apenas a aplicação da maior dose de ácido cítrico foi preocupante pois aumentou a disponibilidade em 5 e 13 vezes, atingindo 12,7 mg kg⁻¹ em Buenos Aires e 13,0 mg kg⁻¹ na Niquelândia. O efeito significativo do ácido cítrico na

disponibilidade de Co apenas nas maiores doses está relacionado a forte associação do elemento à fração argila e óxidos de Fe e Mn (HSIAO, et al., 2009; KIERCZAK et al., 2020).

A ação do quelante orgânico na disponbilização dos metais é resultante da complexação metálica e liberação de altas quantidades de H⁺ para o sistema durante a sua dissociação, acidificando o solo e solubilizando minerais com grandes quantidades de Ni, Co e Cr (ZHU et al., 2005). A escolha da dose de ácido cítrico para o experimento com agromineração foi de 40 mmol kg⁻¹, baseada nos fatores custo benefício e aumento da disponibilidade de Ni sem incremento significativo na disponibilidade de Cr e cobalto.

Figura 18 - Disponibilidade de Ni, Cr e Co nos solos ultramáficos de Buenos Aires - PE e Niquelândia – GO, após aplicação de doses crescentes de ácido cítrico $(0, 5, 10, 20, 40 \text{ e } 80 \text{ mmol } \text{kg}^{-1})$.



Após a escolha da dose ideal, avaliou-se o efeito da aplicação do quelante na disponibilidade de metais e no pH dos solos em função do tempo (Figura 19). De forma geral, a disponibilidade máxima para Co, Cr e Ni nos dois solos avaliados ocorreu no segundo dia após a aplicação do ácido cítrico (Figura 19A-C).

Figura 19 - (A-C) Disponibilidade de Co, Cr e Ni nos solos ultramáficos após aplicação de ácido cítrico (40 mmol kg⁻¹) ao longo de 45 dias. (D) Efeito do ácido cítrico no pH dos solos ao longo do tempo. (E) DRX da fração areia na forma de pó não orientado dos solos ultramáficos analisados.



Ch = clorita; K = caulinita; Hb = hornblenda; Fd = feldspato; Mh/Mt = maghemita/magnetita; Gh = goethita.

Este efeito é facilmente explicado pela redução significativa do pH do solo para 5,5 na Niquelândia e 4,9 em Buenos Aires após 48 horas de aplicação do quelante. A intensidade e tempo de reação do ácido cítrico depende principalmente da afinidade dos grupos carboxílicos e fenólicos do quelante com o metal envolvido, do pH e da textura do solo (maiores efeitos em solos com baixo poder tampão e próximos da neutralidade) (FREITAS; NASCIMENTO, 2016). Um padrão de decréscimo da disponibilidade de Ni, Cr e Co foi observado após o segundo dia de aplicação do quelante, com uma tendência de retorno à condição inicial após 45 dias da aplicação.

O retorno da disponibilidade às condições iniciais do solo pode ser atribuído à degradação do quelante e remobilização dos metais para formas não prontamente disponíveis (FREITAS et al., 2009; FREITAS et al., 2013). Adicionalmente, o pH dos dois solos aumentaram a partir do segundo dia, superando o valor inicial no décimo dia pós aplicação do ácido, com tendência de estabilização até o dia 45 (Figura 19D). Os aumentos dos valores de pH que atingiram à neutralidade estão possivelmente relacionados à ação do ácido cítrico na solubilização de minerais como clorita, hornblenda e talco que durante suas dissociações liberam altas quantidades de hidroxilas e bases, principalmente, magnésio, reduzindo a biodisponibilidade dos metais pela formação de hidróxidos metálicos insolúveis (NEINA, 2019; KANELLOPOULOS, 2020) (Figura 19E). A variação da velocidade de reação e efeito residual do ácido cítrico, reforça a necessidade de avaliação individual do manejo com quelantes em solos enriquecidos por metais.

4.3.2 Fitoextração natural e induzida de Ni por hiperacumuladoras tropicais

Os acúmulos foliares de Ni nas hiperacumuladoras seguiram a seguinte ordem crescente: *P. sarcophylla* (2222,0 mg kg⁻¹) < *L. lupulina* (3042,5 mg kg⁻¹) < *J. lanstyakii* (3863,0 mg kg⁻¹) < *B. coddii* (11387,0 mg kg⁻¹) < *B. guatemalense* (14960,0 mg kg⁻¹) (Figura 20). Embora todas as espécies ultrapassem o limiar para hiperacúmulo de Ni (1000,0 mg kg⁻¹), apenas *B. coddii* e *B. guatemalense* atingiram teores desejáveis para agromineração (> 10000,0 mg kg⁻¹). Isto é comum, visto que no mundo, mais de 500 espécies são descritas como hiperacumuladoras de Ni e apenas 10,0 % são hiperniquelóforas (acúmulo foliar de Ni maior que 1,0 %) (VAN DER ENT et al., 2022). As plantas foram coletadas em solos com características químicas similares (Tabela 6). Porém, as espécies brasileiras *P. sarcophylla, L. lupulina* e *J. lanstyakii* apresentaram os menores acúmulos do metal mesmo cultivadas no solo da Niquelândia, que possui disponibilidade de Ni cerca de quatro vezes superior ao do solo de Buenos Aires. Isto sugere maior potencial de acúmulo natural e boa adaptabilidade das espécies mexicana (*B. guatemalense*) e africana (*B. coddii*) às condições brasileiras.

A espécie *B. guatemalense* acumulou de 1,3 a 7,0 vezes mais Ni do que as outras espécies e por isso foi escolhida como a mais promissora para testes de agromineração e aplicação de ácido cítrico ao solo. Nas raízes, os teores do metal nesta planta foi de 5015,0 mg

kg⁻¹, com índices de translocação e fator de bioconcentração de 3,0 e 10,0, respectivamente. Os maiores acúmulos foliares de Ni relatados no mundo para esta espécie foram de 3,3 % e 4,3 % (NAVARRETE-GUTIÉRREZ et al., 2020). Porém, os estudos foram realizados no seu habitat natural e indicaram melhores rendimentos de Ni após povoamento de cinco anos das plantas e colheitas a cada seis meses, estimando a extração do metal em 142,0 kg ha⁻¹ ano⁻¹ e fator de bioconcentração de 180,0. Adicionalmente, os teores disponíveis de Ni no solos estudados foram 190,0 e 460,0 mg kg⁻¹, o que supera em até sete vezes a disponibilidade do metal no solo utilizado neste trabalho (66,1 mg kg⁻¹) (NAVARRETE-GUTIÉRREZ et al., 2020; NAVARRETE-GUTIÉRREZ et al., 2021). Dessa forma, o cultivo de 90 dias aqui realizado reforça a importância da disponibilidade do metal no solo para maior fitoextração e o alto potencial de *B. guatemalense* na agromineração tropical em ciclos longos.



Figura 20 - Acúmulo de Ni foliar das hiperacumuladoras estudadas.

Ps Pfaffia sarcophylla, Ll Lippia lupulina, Jl Justicia lanstyakii, Bc Berkheya coddii, Bg Blepharidium guatemalense e Bg + ca Blepharidium guatemalense após aplicação de ácido cítrico (40 mmol kg⁻¹) no solo. Letras maiúsculas comparam os acúmulos de Ni em B. guatemalense com e sem ácido cítrico pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). A linha tracejada vermelha representa o limiar da hiperacumulação de Ni (1000 mg kg⁻¹).

Os acúmulos foliares para Co e Cr em *B. guatemalense* foram considerados baixos, sendo 31,7 e 0,2 mg kg⁻¹, respectivamente. Nas raízes, os teores para estes metais foram 17,3 mg kg⁻¹ para Co e 115,0 mg kg⁻¹ para Cr, gerando fatores de translocação e bioacumulação muito baixos (< 0,1). Teores de Co acima de 2,0 mg kg⁻¹ em plantas, são comuns apenas em

solos ultramáficos (HSIAO et al., 2009). A baixa disponibilidade de Cr no solo (< LD) e sua toxidez para a planta, justificam o acúmulo insignificante do metal. Tratando-se dos acúmulos de metais após a adição de ácido cítrico ao solo (40,0 mmol kg⁻¹), foi observado aumento significativo de 23,0 % para os teores de Ni nas folhas de *B. guatemalense*, com teor médio de 18405,0 mg kg⁻¹. Já o acúmulo de Ni nas raízes, foi similar ao controle mesmo após a aplicação do quelante, atingindo 5125,0 mg kg⁻¹. Os fatores de translocação e bioconcentração aumentaram para 3,6 e 13,0, indicando maior eficiência da fitoextração do Ni após aplicação do ácido cítrico. Por outro lado, os teores de Co e Cr, não sofreram aumentos nas folhas e raízes da espécie, continuando com baixos fatores de bioacumulação (< 0,1). Isto é um fator desejável para a agromineração, pois altos teores destes metais podem causar fitotoxicidade na espécie de interesse e limitar a absorção de níquel por danos metabólicos ou competição metálica (ROBINSON et al., 1997; NASCIMENTO et al., 2020).

4.3.3 Recuperação de Ni no bio-minério

As folhas de *B. guatemalense* contendo 1,5 % de Ni foram incineradas por 3 h a 550 °C e a perda líquida do peso do material vegetal alcançou 95,0 %. O fator de enriquecimento do metal após a incineração da biomassa foi de 12 vezes, com recuperação de Ni nas cinzas de 18,0 % (Figura 21).



Figura 21 - Teor de Ni no bio-minério de *B. guatemalense* com e sem aplicação de ácido cítrico ao solo.

O alto fator de enriquecimento é provocado pela remoção da maior parte do material orgânico (C, H, O, N) presente nas folhas durante o processo de queima, concentrando outros metais que apenas sofrem perdas à temperaturas superiores a 550 °C (ZHANG et al., 2014). O teor de Ni no bio-minério obtido a partir das plantas crescidas no solo tratado por ácido cítrico (40 mmol kg⁻¹) foi 60,0 % superior ao não tratado, com uma recuperação de Ni de 30,0 % e fator de enriquecimento de 16 vezes. O maior acúmulo de Ni no bio-minério tratado pode ser atribuído a redução de impurezas nas folhas durante a maior absorção e translocação do metal no período final do cultivo de *B. guatemalense*. Recuperações entre 6,0 e 20,0 % foram consideradas altas em folhas de *Leptoplax emarginata e Berkheya coddii*, pois superam em muitas vezes as concentrações encontradas nos minérios de Ni extraídos de lateritas (1,0 %) (ZHANG et al., 2014; SIMONNOT; VAUGHAN; LAUBIE, 2018). Normalmente, Ni, K, Ca e Mg são os principais componentes das cinzas nas formas de óxidos e carbonatos (NiO₂, MgO, K₂CO₃, CaCO₃). Portanto, procedimentos que removam impurezas e concentrem o Ni nas cinzas são desejáveis para reduzir o custo de recuperação do metal com alto grau de pureza.

4.3.4 Distribuição espacial de metais nas hiperacumuladoras

A técnica de μ FRX baseada em luz síncrotron foi utilizada para mapear folhas de *P. sarcophylla, L. lupulina, J. lanstyakii* e *B. guatemalense* quanto às distribuições espaciais de Ni, Co, Cr, K, Ca e Mn, sendo o primeiro estudo do mundo para as espécies brasileiras (Figura 22 – 27). De forma geral, os metais apresentaram distribuição similar tanto para as plantas transplantadas quanto para as espécies nativas com crescimento espontâneo. O Ni foi enriquecido nos principais feixes vasculares (nervuras centrais e secundárias) e nas margens foliares (Figura 22). Para *B. guatemalense*, o metal foi distribuído de forma mais homogênea por toda a superfície da folha, sugerindo uma estratégia de acúmulo pela planta, visto que foi a espécie com maior teor foliar de Ni registrado. Comportamento similar foi descrito para *Phyllanthus balgooyi* com o metal distribuído por toda folha, porém, apresentando enriquecimento na nervura central. Em contrapartida, *Phyllanthus rufuschaneyi* apresentou maior distribuição de Ni nas áreas internervais (VAN DER ENT et al., 2022).

Para a hipercumuladora brasileira *P. sarcophylla*, o enriquecimento de Ni ocorreu principalmente nas margens foliares. O mesmo padrão de acúmulo crescente em direção à margem foi observado em *Noccaea tymphaea* e *Bornmuellera emarginata* e associados a ligantes carboxílicos de baixos pesos moleculares, como o citrato (VAN DER ENT et al., 2019). Os padrões encontrados neste estudo sugerem que os maiores acúmulos de Ni estão

relacionados com a distribuição da fluorescência elementar mais homogênea na folha, ocupando regiões internervais.

Cobalto e Mn, normalmente, apresentam comportamentos antagônicos ao do Ni, com baixo acúmulo ou em localizações específicas, como tricomas, sugerindo mecanismos de exclusão das espécies devido a efeitos tóxicos que podem afetar a fitoextração de Ni (MORADI et al., 2010; VAN DER ENT et al., 2017; VAN DER ENT et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020; NASCIMENTO; HESTERBERG; TAPPERO, 2020). Neste estudo, estes metais apresentaram distribuições similares as do Ni em todas as espécies, contudo, em concentrações menores (Figuras 23 e 27). As altas intensidades de fluorescência no formato de pontos observadas para Ca por toda a folha sugerem a presença de cristais de oxalato de cálcio e foram fortemente correlacionadas com manganês (Figuras 26 e 27). Estudo com a hiperacumuladora de Mn *Grevillea meisneri*, na Nova Caledônia, indicou forte afinidade destes metais, devido sua co-localização nos tecidos vegetais favorecer a formação de óxidos mistos de Ca-Mn, sendo uma estratégia vegetal para manutenção de uma concentração interna de Ca suficiente mesmo em solos ultramáficos que normalmente são empobrecidos por este elemento (baixa relação Ca:Mg) (VITHANAGE et al., 2019; BIHANIC et al., 2021).

Não foi possível observar distribuição foliar de Cr nas espécies. Os poucos pontos de fluorescência observados em *P. sarcophylla*, *L. lupulina*, *J. Lanstyakii* podem ser atribuídos a resíduos do solo da Niquelândia que é enriquecido pelo metal (teor total de 1844,5 mg kg⁻¹) e não foram removidos completamente durante os procedimentos de limpeza das folhas (Figura 24). Isto ocorre devido à baixa disponibilidade de Cr nos solos ultramáficos, com alocação do metal em óxidos de Fe como a cromita (FeCr₂O₄) e a magnetita (Fe₃O₄) (VITHANAGE et al., 2019; GWENZI, 2020). Além disso, a toxidez do elemento para as plantas, provoca mecanismos de retenção do metal nas raízes, reduzindo significativamente sua translocação. O potássio apresentou maior enriquecimento com aproximação do pecíolo em *P. sarcophylla*, *J. lanstyakii* e *B. guatemalense*. Para *L. lupulina*, a distribuição de potássio ocorreu nos ápices foliares (Figura 25).

A variação na descrição da distribuição espacial dos metais apresentada entre estudos, reforça a importância destas avaliações nas hipercumuladoras, uma vez que menos de 10,0 % delas foram estudadas neste nível de informação (MESJASZ-PRZYBYLOWICZ et al., 2015). Portanto, estudos da distribuição de metais em plantas por fluorescência de raios-X baseada em luz síncrotron permitem estabelecer critérios e limitações dessas análises e podem auxiliar no melhoramento genético de plantas que possam ser utilizadas na fitorremediação de solos.



Figura 22 - Mapeamento elementar de Ni em seções transversais de folhas de *P. sarcophylla* (A), *L. lupulina* (B), *J. lanstyakii* (C) e *B. guatemalense* (D).



Figura 23 - Mapeamento elementar de Co em seções transversais de folhas de *P. sarcophylla* (A), *L. lupulina* (B), *J. lanstyakii* (C) e *B. guatemalense* (D).



Figura 24 - Mapeamento elementar de Cr em seções transversais de folhas de *P. sarcophylla* (A), *L. lupulina* (B), *J. lanstyakii* (C) e *B. guatemalense* (D).



Figura 25 - Mapeamento elementar de K em seções transversais de folhas de *P*. *sarcophylla* (A), *L. lupulina* (B), *J. lanstyakii* (C) e *B. guatemalense* (D).



Figura 26 - Mapeamento elementar de Ca em seções transversais de folhas de *P. sarcophylla* (A), *L. lupulina* (B), *J. lanstyakii* (C) e *B. guatemalense* (D).



Figura 27 - Mapeamento elementar de Mn em seções transversais de folhas de *P. sarcophylla* (A), *L. lupulina* (B), *J. lanstyakii* (C) e *B. guatemalense* (D).

4.3.5 Distribuição celular de Ni em B. guatemalense

A nervura central foi selecionada para os cortes transversais devido ao maior acúmulo de Ni observado nesta posição após o imageamento por µFRX-SR (Figura 28).





ct – *cutícula*; *ph* – *floema*; *xy* – *xilema*; *pq* – *parênquima*; *ep* – *epiderme*.

Após o uso de Dimetilglioxima, as imagens microscópicas apresentaram acúmulos de Ni na epiderme, cutícula, regiões intercelulares e floema (Figura 28B-D). O maior acúmulo ocorreu na cutícula, camada superficial que reveste a epiderme foliar formando uma barreira mecânica contra ação de patógenos (fungos e insetos) e protege o mesófilo, reduzindo perdas de água e os danos provocados na clorofila subjacente pelos raios ultravioletas (CORRÊA et al., 2008; MESJASZ-PRZYBYLOWICZ et al., 2015). O acúmulo de substâncias tóxicas nessas regiões é uma das estratégias vegetais para promover a formação de barreiras mecânicas e químicas contra patógenos. Por isso, o maior acúmulo de Ni na cutícula, epiderme e floema sugere defesa contra a herbivoria, visto que a eficiência do mecanismo de proteção à ataques de insetos sugadores depende da alta concentração de Ni no floema da planta (MUSTAFA et al., 2023). Além disso, a alta presença do metal no floema é indicativo de sua translocação para folhas mais jovens, que normalmente são mais atrativas para os insetos mastigadores por estímulo visual e maior conteúdo nutricional e de celulose (ALMEIDA-CORTEZ, 2005; CORRÊA et al., 2008).

O mesmo padrão de enriquecimento de Ni no floema foi observado nas hiperacumuladoras Phyllanthus rufuschaneyi e Phyllanthus balgooyi com acúmulos entre 12,0 e 17,0 % do elemento (MESJASZ-PRZYBYLOWICZ et al., 2015; VAN DER ENT et al., 2022). Adicionalmente, estudo realizado na hiperacumuladora australiana Stackhousia tryonii, apresentou comportamento similar de acúmulo do metal no espaço apoplástico circundando as células epidérmicas, padrão encontrado na maioria das hiperacumuladoras de níquel (MESJASZ-PRZYBYLOWICZ et al., 2015; SPIERS et al., 2022). Também foi possível observar a formação de cristais revestidos por Ni (Figura 28E). A maior parte dos cristais são formados por sais de cálcio, como carbonato e oxalato, e podem ocorrer na forma de ráfides ou drusas, principalmente na nervura central, na região do parênquima cortical (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2020). A presença destas estruturas é um indicativo sobre potencial de toxidez da planta, por se tratar de um dos princípios ativos no mecanismo de intoxicação de outros seres vivos (OLIVEIRA; PASIN, 2017). Além disso, a distribuição epidérmica do Ni combinada com disposição celular pouco espaçada, sugere mecanismo de sequestro vacuolar do elemento, utilizada maioria das hiperacumuladoras (MESJASZestratégia pela plantas PRZYBYLOWICZ et al., 2015; BIHANIC et al., 2021).

4.4 Conclusão

As espécies brasileiras *P. sarcophylla*, *L. lupulina* e *J. lanstyakii* foram avaliadas quanto à distribuição foliar de metais pela primeira vez. Para Ni, Mn e Co a distribuição espacial foi semelhante em todas as espécies, com acúmulo preferencial nas margens e nas nervuras da folha. A análise microscópica em *B. guatemalense* mostrou que o Ni estava concentrado na epiderme e no floema, sugerindo a translocação para tecidos mais jovens e um provável mecanismo de defesa contra herbívoros e danos ao fotossistema. A aplicação de ácido cítrico em um solo ultramáfico pode melhorar a eficiência da agromineração de Ni com *B. guatemalense*. Nossos resultados sugerem um baixo potencial das hiperacumuladoras brasileiras testadas aqui para a agromineração comercial. No entanto, o alto acúmulo de Ni de *B. guatemalense* e *B. coddii* torna essas espécies candidatas à agromineração tropical.

Referências bibliográficas

ALMEIDA-CORTEZ, J.S. Herbivoria e mecanismos de defesa vegetal. In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E.L.; WILLADINO, L.G.; CALVALCANTE, U.M.T. (Eds.). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: Imprensa Universitária, p.389-396, 2005.

ALVAREZ, J. R. E.; MONTERO, A. A.; JIMÉNEZ, N. H.; MUÑIZ, U. O.; PADILLA, A. R.; MOLINA, R. J.; VERA, S. Q. de. Nuclear and related analytical methods applied to the determination Cr, Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in a red ferralitic soil and Sorghum samples. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 247, n. 3, p. 479-486, 2001. https://doi.org/10.1023/A:1010640009301.

AUGUSTYNIAK, M.; MESJASZ-PRZYBYLOWICZ, J.; NAKONIECZNY, M.; DYBOWSKA, M.; PRZYBYLOWICZ, W.; MIGULA, P. Food relations between *Chrysolina pardalina* and *Berkheya coddii*, a nickel hyperaccumulator from South African ultramafic outcrops. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 11, p. 85–90, 2002. <u>https://www.researchgate.net/publication/279581567_Food_relations_between_Chrysolina_p</u> <u>ardalina_and_Berkheya_coddii_a_nickel_hyperaccumulator_from_South_African_ultramafic_outcrops</u>.

BANI, A.; ECHEVARRIA, G.; SULC, E. S.; MOREL, J. L. Improving the agronomy of Alyssum murale for extensive phytomining: a five-year field study. **International Journal of Phytoremediation**, v.17, p. 117–127, 2015a. <u>https://doi.org/10.1080/15226514.2013.862204</u>.

BANI, A.; ECHEVARRIA, G.; ZHANG, X.; BENIZRI, E.; LAUBIE, B.; MOREL, J. L.; SIMONNOT, M. O. The effect of plant density in nickel-phytomining field experiments with Alyssum murale in Albania. **Australian journal of botany**, v. 63, p. 72–77, 2015b. <u>https://doi.org/10.1071/BT14285</u>.

BANI, A.; ECHEVARRIA, G. Can organic amendments replace chemical fertilizers in nickel agromining cropping systems in Albania? **International Journal of Phytoremediation**, v. 21, p. 43–51, 2019. <u>https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1523871</u>.

BIHANIC, C.; PETIT, E.; PERROT, R.; CASES, L.; GARCIA, A.; PELISSIER, F.; POULLAIN, C.; RIVARD, C.; HOSSAERT-MCKEY, M.; MCKEY, D.; GRISON, C. Manganese distribution in the Mn-hyperaccumulator *Grevillea meisneri* from New Caledonia. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1-17, 2021. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-021-03151-9</u>.

BROWN, G.; BRINDLEY, G.W. X-ray Diffraction Procedures for clay mineral Identification. In: BRINDLEY, G.W; BROWN, G. London: **Mineralogical Society**, chapter 5, p.305-360, 1980. <u>https://doi.org/10.1180/mono-5.5</u>.

CERDEIRA-PÉREZ, A.; MONTERROSO, C.; RODRIGUEZ-GARRIDO, B.; MACHINET, G.; ECHEVARRIA, G.; PRIETO-FERNANDEZ, A.; KIDD, P. S. Implementing nickel phytomining in a serpentine quarry in NW Spain. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 197, p. 1-13, 2019. <u>https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2018.11.001</u>.

CHANEY, R. L.; REEVES, R.D.; BAKLANOV, I.A.; CENTOFANTI, T.; BROADHURST, C.L.; BAKER, A.J.M.; ANGLE, J.S.; VAN DER ENT, A.; ROSEBERG, R.J. Phytoremediation and phytomining: using plants to remediate contaminated or mineralized environments, Chap. 15. In: Rajakaruna N, Boyd RS, Harris T (eds) Plant ecology and evolution in harsh environments. **Nova Science**, New York, p. 365–391, 2014. https://se.copernicus.org/preprints/se-2017-75/se-2017-75-RC2-supplement.pdf.

CORRÊA, P.G.; PIMENTEL, R.M.M.; CORTEZ, J.S.A.; XAVIER, H.S. Herbivoria e anatomia foliar em plantas tropicais brasileiras. **Ciência e Cultura**, v. 60, p. 1-4, 2008. <u>http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252008000300017</u>.

CUÉLLAR-CRUZ, M.; PÉREZ, K.S.; MENDOZA, M.E.; MORENO, A. Biocrystals in Plants: A Short Review on Biomineralization Processes and the Role of Phototropins into the Uptake of Calcium. **Crystals**, v. 10, p. 1-23, 2020. <u>https://doi.org/10.3390/cryst10070591</u>.

ERTANI, A.; MIETTO, A.; BORIN, M.; NARDI, S. Chromium in agricultural soils and crops: a review. **Water Air Soil Pollution**, v. 228, p.190, 2017. <u>https://doi.org/10.1007/s11270-017-3356-y</u>.

FAYIGA, A. O.; SAHA, U. K. Arsenic hyperaccumulating fern: Implications for remediation of arsenic contaminated soils. **Geoderma**, v.284, p. 132-143, 2016. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.09.003</u>.

FREITAS, E. V. S.; NASCIMENTO, C. W. A.; SILVA, A. J.; DUDA, G. P. Indução da fitoextração de chumbo por ácido cítrico em solo contaminado por baterias automotivas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 467-472, 2009. https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000200024.

FREITAS, E. V. S.; NASCIMENTO, C. W. A. SOUZA, A.; SILVA, F. B. Citric acid-assisted phytoextraction of lead: A field experiment. **Chemosphere**, v.92, p. 213-217, 2013. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.103</u>.

FREITAS, E. V. S.; NASCIMENTO, C. W. A. Degradability of natural and synthetic chelating agents applied to a lead-contaminated soil. **Journal of Soils and Sediments**, v. 17, p. 1272-1278, 2016. <u>https://doi.org/10.1007/s11368-015-1350-9</u>.

FUENTES, A.C.D.; MARTÍNEZ, S.E.; SAMAIN, M.S. *Blepharidium guatemalense*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2021**: e.T30687A126292331. https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T30687A126292331.en.

FUNARI, C.S.; ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T.G.; MARTINEZ, I.; AMBRÓSIO, D.L.; CICARELLI, R.M.B.; SILVA, D.H.S.; GRAMINHA, M.A.S. Oleanonic acid *from Lippia lupulina* (Verbenaceae) shows strong in vitro antileishmanial and antitrypanosomal activity / Ácido oleanônico isolado de *Lippia lupulina* (Verbenaceae) apresenta potentes atividades leishmanicida e tripanocida. **Acta Amazonica**, v. 46, p. 411-416, 2016. https://doi.org/10.1590/1809-4392201600204. GARNIER, J.; QUANTIN, C.; GUIMARÃES, E.M.; VANTELON, D.; MONTARGES-PELLETIER, E.; BECQUER, T. Cr (VI) genesis and dynamics in Ferralsols developed from ultramafic rocks: The case of Niquelândia, Brazil. **Geoderma**, v. 193, p. 256-264, 2013. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.08.031</u>.

HSIAO, K. H.; BAO, K.H.; WANG, S.H.; HSEU, Z. Extractable Concentrations of Cobalt from Serpentine Soils with Several Single-Extraction Procedures. **Communications In Soil Science and Plant Analysis**, v. 40, p; 2200-2224. https://doi.org/10.1080/00103620902960674.

JACKSON, M.L. Soil chemical analysis: advanced course. Madison, University of Wisconsin, 1969. 894p. <u>https://worldcat.org/pt/title/1127712461.</u>

JACKSON, M. L. **Soil chemical analysis: advance Course**. 29. ed. Madison, 1975. 895 p. https://worldcat.org/pt/title/4478948.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, A. K. **Trace elements in soils and plants**, 4th edn. CRC, Ann Arbor, MI, USA, 2011. <u>https://doi.org/10.1201/b10158</u>.

KANELLOPOULOS, C. Influence of ultramafic rocks and hot springs with travertine depositions on geochemical composition and baseline of soils. Application to eastern central Greece. **Geoderma** v. 380, p. 1146-1149, 2020. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114649.

KIERCZARK, J.; PEEDZIWIATR, A.; WARROSZEWSKI, J.; MODELSKA, M. Mobility of Ni, Cr and Co in serpentine soils derived on various ultrabasic bedrocks under temperate climate. **Geoderma**, v. 268, p. 78–91, 2016. <u>https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.01.025</u>.

KIERCZAK, J.; PIETRANIK, A.; PĘDZIWIATR, A. Ultramafic geoecosystems as a natural source of Ni, Cr, and Co to the environment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 755, 2020. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142620</u>.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997. <u>https://buscaintegrada.ufrj.br/Record/aleph-UFR01-000603195/Details</u>.

LEINZ, V.; CAMPOS, J.E.S. **Guia para determinação de minerais**. 8.ed. São Paulo: Nacional, 1979. 149 p. <u>https://www.estantevirtual.com.br/lunalivros/viktor-leinz-joao-</u> <u>ernesto-de-souza-campos-guia-para-determinacao-de-minerais-</u> <u>3655944121?show_suggestion=0</u>.

LIMA, M.R.; GOMES, H.T.; CURY, N.F.; PEREIRA, L.A.R.; SILVEIRA, C.E.S. Developing propagation protocols for Justicia lanstyakii Rizz. (Acanthaceae), an ornamental Ni-accumulating subshrub of Brazilian Cerrado. **Biologia**, v.77, p.967-980, 2022. <u>https://doi.org/10.1007/s11756-021-00987-4</u>.

LINDSAY, W.L.; NORVELL, W.A. Development of a DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese, and Copper. **Soil Science Society of America Journal**, v. 42, p. 421-428, 1978. https://doi.org/10.2136/sssaj1978.03615995004200030009x. MARCHIORETTO, M. S.; MIOTTO, S. T. S.; SIQUEIRA, J. C. O gênero Pfaffia Mart. (Amaranthaceae) no Brasil. **Hoehnea**, v. 37, p. 461-511, 2010. https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8& ved=2ahUKEwjD74P9rs_oAhUuLLkGHQ7YCkUQFjABegQIChAD&url=http%3A%2F%2 Fwww.scielo.br%2Fpdf%2Fhoehnea%2Fv37n3%2Fv37n3a04.pdf&usg=AOvVaw06TTpQO1 W47rC9FN0bz_fI.

MARCHIORETTO, M. S. 2015. Pfaffia in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. <u>http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/FB26355</u>.

MESJASZ-PRZYBYLOWICZ, J.; PRZYBYLOWICZ, W.; BARNABAS, A.; VAN DER ENT, A. Extreme nickel hyperaccumulation in the vascular tracts of the tree *Phyllanthus balgooyi* from Borneo. **New Phytologist**, v. 209, p. 1513-1526, 2015. <u>https://doi.org/10.1111/nph.13712</u>.

MOORE, D. M.; REYNOLDS, R. C. X-ray diffraction and identification and analysis of clayminerais. Oxford: **Oxford University Press**, 1989. 332 p. <u>https://doi.org/10.1017/S0016756898501501</u>.

MORADI, A. B.; SWOBODA, S.; ROBINSON, B.; PROHASKA, T.; KAESTNER, A. OSWALD, S. E.; WENZEL, W. W.; SCHULIN, R. Mapping of nickel in root cross-sections of the hyperaccumulator plant Berkheya coddii using laser ablation ICP-MS. Environmental and **Experimental Botany**, v. 60, p. 24-31, 2010. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.02.001.

MORAIS, S.R.; OLIVEIRA, T.L.S.; ABDALLA, D.F.; THOMAZ, D.V.; TRESVENZO, L.M.F.; CONCEIÇÃO, E.C.; REZENDE, M.H.; FIUZA, T.S.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R. Morphoanatomical Characterization and Chemical Composition of Essential oils of *Lippia lupulina* Cham. and *Lippia pohliana* Schauer (Verbenaceae). Fronteiras: **Journal of Social**, **Technological and Environmental Science**, v. 11, p.170-184, 2022. http://dx.doi.org/10.21664/2238-8869.2022v11i4.

MUSTAFA, A.; ZULFIQAR, U.; MUMTAZ, M.Z.; RADZIEMSKA, M.; HAIDER, F. U.; HOLATKO, J.; HAMMERSHMIEDT, T.; NAVEED, M.; ALI, H.; KINTL, A.; SAEED, Q.; KUCERIK, J.; BRTNICKY, M. Nickel (Ni) phytotoxicity and detoxification mechanisms: A review. **Chemosphere**, v. 328, 2023. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138574</u>.

NAVARRETE-GUTIÉRREZ, D. M.; NKRUMAH, P.N.; VAN DER ENT, A.; POLLARD, J.; BAKER, AJ.M.; TORRALBA, F.N.; PONS, M.N.; SÁNCHEZ, J.A.C.; HERNÁNDEZ, T.G.; ECHEVARRIA, G. The potential of Blepharidium guatemalense for nickel agromining in Mexico and Central America. **International Journal of Phytoremediation**, v. 23, p. 1157-1168. 2021. <u>https://doi.org/10.1080/15226514.2021.1881039</u>.

NASCIMENTO, C. W. A.; HESTERBERG, D.; TAPPERO, R. Effects of exogenous citric acid on the concentration and spatial distribution of Ni, Zn, Co, Cr, Mn and Fe in leaves of *Noccaea caerulescens* grown on a serpentine soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 398, 2020. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122992</u>.

NASCIMENTO, C. W. A.; HESTERBERG, D.; TAPPERO, R.; NICHOLAS, S.; SILVA, F. B. V. Citric acid-assisted accumulation of Ni and other metals by *Odontarrhena muralis*: Implications for phytoextraction and metal foliar distribution assessed by m-SXRF. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 1-9, 2020. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114025.

NEINA, D. The Role of Soil pH in Plant Nutrition and Soil Remediation. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 19, p.9, 2019. <u>https://doi.org/10.1155/2019/5794869</u>.

NKRUMAH, P. N.; CHANEY, R. F.; MOREL, J. L. Agronomy of 'Metal Crops' Used in Agromining. **Agromining: Farming for Metals**, p. 19-22, 2017. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-319-61899-9_2</u>.

OLIVEIRA, R.R.; PASIN, L.A.A.P. Ocorrência de oxalato de cálcio em diferentes espécies vegetais de uso ornamental. **Revista de Ciências Ambientais**, v.11, p. 41-52, 2017. <u>http://dx.doi.org/10.18316/rca.v11i3.3571</u>.

PEDERSEN, T.M. Studies in South American Amaranthaceae-IV. Adansonia, v. 19, p. 239, 1997.

PLUMMER, J. 2022. Berkheya speciosa. **The IUCN Red List of Threatened Species 2022**: e.T184927441A188497872. https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20221.RLTS.T184927441A188497872.en.

RATIÉ, G. QUANTIN, C.; FREITAS, A.M.; ECHEVARRIA, G.; GARNIER, J. The behavior of nickel isotopes at the biogeochemical interface between ultramafic soils and Ni accumulator species. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 196, p. 182-191, 2019. <u>https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2018.10.008</u>.

REEVES, R. D.; BAKER, A. J. M.; ROMERO, R. The ultramafic flora of the Santa Elena peninsula, Costa Rica: A biogeochemical reconnaissance. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 93, p. 153-159, 2007. <u>https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2007.04.002</u>.

REEVES, R. D.; BAKER, A. J. M.; ECHEVARRIA, G.; MIRANDA, Z.J.G. The flora and biogeochemistry of the ultramafic soils of Goiás state, Brazil. The flora and biogeochemistry of the ultramafic soils of Goiás state, Brazil. **Plant and Soil**, v. 293, p.107-119, 2007. <u>https://doi.org/10.1007/s11104-007-9192-x</u>.

REEVES, R. D.; BAKER, A. J. M.; JAFFRÉ, T.; ERSKINE, P. D.; ECHEVARRIA, G.; VAN DER ENT, A. A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloid trace elements. **New Phytologist**, v. 218, p. 397-400, 2017. https://doi.org/10.1111/nph.14907.

SHAH, V.; DAVEREY, A. Phytoremediation: A multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. **Environmental Technology & Innovation**, v. 18, p. 1-16, 2020. <u>https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100774</u>.

SiBCS – **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**, 2018. <u>https://www.embrapa.br/solos/sibcs</u>.

SPIERS, K.M.; BRUECKNER, D.; GARREVOET, J.; FALKENBERG, G.; VAN DER ENT, A. Synchrotron XFM tomography for elucidating metals and metalloids in hyperaccumulator plants. **Metallomics**, v. 14, p. 1-16, 2022. <u>https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfac069</u>.

SILVA, W. R.; SILVA, F. B. V.; ARAUJO, P. R. M. NASCIMENTO, C. W. A. Assessing human health risks and strategies for phytoremediation in soils contaminated with As, Cd, Pb, and Zn by slag disposal. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 522-530, 2017. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.068</u>.

SIMONNOT, M.O.; VAUGHAN, J.; LAUBIE, B. Processing of bio-ore to products. **Agromining: Farming for metals**. Extracting unconventional resources using plants. Cham: Springer; p. 39-52, 2018. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-030-58904-2</u>.

TEIXEIRA, P.C.; DONAGEMMA, G.K.; FONTANAo, A.; TEIXEIRA, W.G. (2017). **Manual de métodos de análise do solo.** <u>http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1085209</u>.

USEPA - United States Environmental Protection Agency (1996). **Method 3050B:** Acid Digestion of Sludges, Sediments, and Soils, Revision 2. Washington DC. <u>https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/epa-3050b.pdf</u>.

USGS - The U.S. Geological Survey, 2019. Nickel Statistics and Information. **National Minerals Information Center**. <u>https://www.usgs.gov/centers/nmic/nickel-statistics-and-information</u>.</u>

VAN DER ENT, A.; BAKER, A.J.; REEVES, R.D.; CHANEY, R.L.; ANDERSON, C.W.N.; MEECH, J.A.; ERSKINE, P.D.; SIOMONNOT, M.; VAUGHAN, J.; MOREL, J.L.; ECHEVARRIA, G.; FOGLIANI, B.; RONGLIANG, Q.; MULLIGAN, D.R. Agromining: farming for metals in the future?. **Environmental Science & Technology**, v. 49, p. 4773-4780, 2015. <u>https://doi.org/10.1021/es506031u</u>.

VAN DER ENT, A.; MULLIGAN, D. Multi-element concentrations in plant parts and fluids of Malaysian nickel hyperaccumulator plants and some economic and ecological considerations. **Journal of Chemical Ecology**, v. 41, p. 396-408, 2015. <u>https://doi.org/10.1007/s10886-015-0573-y</u>.

VAN DER ENT, A.; CALLAHAN, D.L.; NOLLER, B.N.; MESKASZ-PRZYBYLOWICZ.; PRZYBYLOWICZ, W.J.; BARNABAS, A.; HARRIS, H. Nickel biopathways in tropical nickel hyperaccumulating trees from Sabah (Malaysia). Scientific Reports, v. 7, p. 1-21, 2017. <u>http://dx.doi.org/10.1038/srep4186</u>.

VAN DER ENT, A.; SPIERS, K. M.; BRUECKNER, D.; ECHEVARRIA, G.; AARTS, M. G. M.; MONTARGES-PELLETIER, E. Spatially-resolved localization and chemical speciation of nickel and zinc in Noccaea tymphaea and *Bornmuellera emarginata*. **Metallomics**, v. 11, p. 2052-2065, 2019. <u>http://dx.doi.org/10.1039/c9mt00106a</u>.

VAN DER ENT, A.; MESJASZ-PRZYBYLOWICZ, J.; PRZYBYLOWICZ, W.J.; BARNABAS, A.D. JONGE, M.D.; HARRIS, H.H. Contrasting patterns of nickel distribution in the hyperaccumulators *Phyllanthus balgooyi* and *Phyllanthus rufuschaneyi* from Malaysian Borneo. **Metallomics**, v. 14, 2022. <u>https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfac020</u>.

VITHANAGE, M.; KUMARATHILAKA, P.; OZE, C.; KARUNATILAKE, S.; SENEVIRATNE, M.; HSEU, Z.; GUNARATHNE, V.; DASSANAYAKE, M.; OK, Y. S.; RINKLEBE, J. Occurrence and cycling of trace elements in ultramafic soils and their impacts on human health: A critical review. **Environment International**, v. 131, p. 1-17, 2019. <u>https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104974</u>.

ZHANG, X.; HOUZELOT, V.; BANI, A.; MOREL, J. L.; ECHEVARRIA, G.; SIMONNOT, M. O. Selection and Combustion of Ni Hyperaccumulators for the Phytomining Process. **International Journal of Phytoremediation**, v. 16, p. 1056-1072, 2014. <u>https://doi.org/10.1080/15226514.2013.810585</u>.

ZHU, Y.; YAN, F.; ZORB, C.; SCHUBERT, S. A Link Between Citrate and Proton Release by Proteoid Roots of White Lupin (*Lupinus albus* L.) Grown Under Phosphorus-deficient Conditions? **Plant and Cell Physiology**, v. 46, p. 892-901, 2005. <u>https://doi.org/10.1093/pcp/pci094</u>.

5 AVALIAÇÃO DE RISCOS ECOLÓGICO, AMBIENTAL E À SAÚDE HUMANA POR CONSUMO DE VEGETAIS E EXPOSIÇÃO A SOLOS ULTRAMÁFICOS NO BRASIL

Resumo

Solos ultramáficos e ingestão de alimentos oriundos desses ambientes podem representar riscos para o ecossistema e para humanos devido aos altos níveis de metais pesados (principalmente Cr, Ni e Co). Os atributos químicos e mineralógicos do solo controlam a mobilidade desses elementos. Nos trópicos, as condições de intemperismo podem intensificar a mobilidade e a disponibilidade desses metais para os seres vivos. Portanto, são necessárias avaliações de risco ambiental e à saúde humana para ambientes ultramáficos. Nesse cenário, nossos objetivos foram caracterizar dois solos ultramáficos brasileiros e avaliar os teores e a mobilidade de Cr, Ni e Co nos solos para estimar os riscos ambientais, ecológicos e à saúde humana. Realizamos caracterizações petrográficas, químicas, biológicas e mineralógicas, bem como análises totais, pseudototais, disponíveis, bioacessíveis (gástricas, pulmonares e dérmicas) e de frações do solo de Cr, Ni e Co em dois solos ultramáficos de diferentes regiões do Brasil (Niquelândia - Goiás e Buenos Aires - Pernambuco). Além disso, foram estimados os riscos carcinogênicos e (não) carcinogênicos por exposição ao solo e consumo de vegetais cultivados nesses ambientes. As concentrações médias totais de metais (mg kg⁻¹) para os solos de Niquelândia e Buenos Aires, respectivamente, foram Co (373,5 e 349,2), Cr (1844,5 e 2485,5) e Ni (9597,5 e 1428,5). As concentrações disponíveis (mg kg⁻¹), por sua vez, foram Ni (220,9 e 66,1), Co (2,4 e 1,0) e Cr (< LD). O fracionamento do solo mostrou que os óxidos de Fe e Mn foram os principais reservatórios de Co em ambos os solos e de Ni no solo de Buenos Aires, enquanto o Cr em ambos os solos e o Ni na Niguelândia foram retidos principalmente em frações residuais. Nenhum risco ambiental foi associado ao Co e ao Cr nos solos, mas foram encontrados riscos ambientais baixos (1,1 %) e médios (13,0 %) em relação ao Ni nos solos de Niquelândia e Buenos Aires, respectivamente. Por outro lado, os riscos ecológicos foram estimados como altos para o solo de Buenos Aires (PERI = 522,8) e significativamente elevados em Niquelândia (PERI = 1759,9). Os filos de bactéria com maior tolerância a metais foram Proteobacteria, Bacteroidota e Firmicutes. Os metais apresentaram baixa bioacessibilidade pulmonar, gástrica e dérmica; portanto, os riscos carcinogênicos e não carcinogênicos foram aceitáveis. Entretanto, o consumo das hortaliças B. oleracea e L. sativa L. cultivadas nestes solos oferece riscos de câncer inaceitáveis. Os altos teores de óxidos de ferro e manganês nos solos provavelmente são responsáveis pela baixa disponibilidade e bioacessibilidade dos metais. Os altos riscos ecológicos encontrados sugerem que as comunidades microbianas nesses ambientes estão adaptadas às condições metalíferas e que a erosão e o transporte desses solos podem danificar comunidades microbiológicas de outras áreas. Portanto, cultivos e consumo de vegetais em solos ultramáficos não são recomendados e monitoramentos dessas áreas devem ser realizados periodicamente para garantir a sustentabilidade ambiental e segurança alimentar.

Palavras-chave: Bioacessibilidade. Metais pesados. Rochas ultrabásicas. Solos serpentinos.

ECOLOGICAL, ENVIRONMENTAL AND HUMAN HEALTH RISKS ASSESSMENT FOR VEGETABLES CONSUMPTION AND EXPOSURE TO ULTRAMAFIC SOILS IN BRAZIL

Abstract

Ultramafic soils and food ingestion from these environments can pose risks to the ecosystem and to humans due to the high levels of heavy metals (mainly Cr, Ni, and Co). The chemical and mineralogical attributes of the soil control the mobility of these elements. In the tropics, weathering conditions can intensify the mobility and availability of these metals to living beings. Therefore, environmental and human health risk assessments are needed for ultramafic environments. In this scenario, our objectives were to characterize Brazilian ultramafic soils and to evaluate Cr, Ni and Co contents and mobility in soils to estimate environmental, ecological and human health risks. We performed petrographic, chemical, biological and mineralogical characterizations, as well as total, pseudototal, available, bioaccessible (gastric, pulmonary and dermal) and soil fraction analyses of Cr, Ni and Co in two ultramafic soils from different regions of Brazil (Niquelândia - Goiás and Buenos Aires -Pernambuco). In addition, the carcinogenic and (non)-carcinogenic risks from exposure to soil and consumption of vegetables grown in these environments were estimated. The mean total metal concentrations (mg kg⁻¹) for the soils of Niquelândia and Buenos Aires, respectively, were Co (373.5 and 349.2), Cr (1844.5 and 2485.5), and Ni (9597.5 and 1428.5). The available concentrations (mg kg⁻¹), in turn, were Ni (220.9 and 66.1), Co (2.4 and 1.0), and Cr (< LD). Soil fractionation showed that Fe and Mn oxides were the main reservoirs of Co in both soils and Ni in the Buenos Aires soil, while Cr in both soils and Ni in Niguelândia were retained mainly in residual fractions. No environmental risks were associated with Co and Cr in the soils, but low (1.1 %) and medium (13.0 %) environmental risks were found for Ni in the Niquelândia and Buenos Aires soils, respectively. On the other hand, ecological risks were estimated as high for the Buenos Aires soil (PERI = 522.8) and significantly high in Niquelândia (PERI = 1759.9). The bacterial phyla with the highest metal tolerance were Proteobacteria, Bacteroidota, and Firmicutes. The metals showed low lung, gastric, and dermal bioaccessibility; therefore, the carcinogenic and noncarcinogenic risks were acceptable. However, consumption of the vegetables B. oleracea and L. sativa L. grown on these soils offers unacceptable cancer risks. The high levels of iron and manganese oxides in the soils are probably responsible for the low availability and bioaccessibility of the metals. The high ecological risks found suggest that the microbial communities in these environments are adapted to the metal conditions and that erosion and transport of these soils may damage microbiological communities in other areas. Therefore, cultivation and consumption of vegetables in ultramafic soils is not recommended and monitoring of these areas should be carried out periodically to ensure environmental sustainability and food safety.

Keywords: Bioaccessibility. Heavy metals. Serpentine soils. Ultrabasic rocks.

5.1 Introdução

Afloramentos ultramáficos foram descritos em diversos continentes do planeta, mas são considerados raros devido à baixa proporção de cobertura da superfície terrestre (1,0 - 3,0 %) (SIEBECKER; CHANEY; SPARKS, 2018; NASCIMENTO et al., 2020). A formação de solos ultramáficos ocorre pelo intemperismo de rochas ígneas ultrabásicas (< 45,0 % SiO₂), especificamente por peridotitos e piroxenitos, ou pelo produto de seus metamorfismos, serpentinitos. A mineralogia desses materiais é constituída principalmente por crisotilo, lizardita, antigorita, olivina, piroxênios, cromita e magnetita (VITHANAGE et al., 2014; GALEY et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2022). Por isso, estes solos geralmente apresentam teores elevados de níquel (Ni), cromo (Cr), e cobalto (Co), cujas concentrações podem atingir valores superiores a 70000,0; 17000,0 e 7000,0 mg kg⁻¹, respectivamente (VITHANAGE et al., 2019); superando em até 2.000 vezes os teores médios desses metais encontrados na maioria dos solos (KABATA-PENDIAS, 2011).

Apesar de serem enriquecidos naturalmente por metais, os solos ultramáficos são capazes de provocar danos ambientais e à saúde humana devido ao potencial tóxico e acumulativo desses contaminantes. A maioria dos estudos nesses ambientes são focados na geoquímica e ecologia vegetal, existindo poucas explorações sobre impactos na saúde humana e do ecossistema (TASHAKOR; MODABBERI; VAN DER ENT, 2018; VITHANAGE et al., 2019; KIERCZAK; PIETRANIK; PEDZIWIATR, 2021). Condições climáticas tropicais favorecem o intemperismo químico de minerais e, consequentemente, promovem maior liberação de metais no ambiente que podem ser transportados por erosão, ação do vento e movimento da água; entrando na cadeia trófica, provocando bioacumulação e biomagnificação (MAHURPAWAR, 2015; RAMACHANDRA et al., 2018). Adicionalmente, nos últimos 10 anos, os solos ultramáficos vêm sendo estudados como ambientes propícios para a agromineração (VAN DER ENT et al., 2015; PARDO et al., 2018; ROSENKRANZ et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2022). Dessa forma, a exposição humana crônica ou aguda a Ni, Cr e Co pode provocar efeitos deletérios à saúde como dermatites, problemas respiratórios e renais, doenças cardiovasculares, efeitos teratogênicos, danos no sistema nervoso central e câncer de pulmão (OZE et al., 2004; ATSDR, 2005; CEMPEL AND NIKEL, 2006; ATSDR, 2012; SHAHZAD et al., 2018; ATSDR, 2023).

Os seres humanos podem ser expostos nesses ambientes por três principais rotas: ingestão, inalação e contato dérmico com as partículas de solo. Os riscos podem ser estimados por modelos que avaliam a probabilidade de ocorrência de injúrias a um organismo alvo simulando condições de exposição próximas da realidade (USEPA, 1989; USEPA, 2001).

Portanto, testes de bioacessibilidade são utilizados para simular condições gástricas, dermais e pulmonares referentes às rotas de exposição, avaliando a fração solúvel do metal no organismo humano e evitando superestimação dos riscos (RUBY et al., 1996; VILLEGAS; GUNEY; ZAGURY, 2015; LI et al., 2020; LIMA et al., 2023). A bioacessibilidade é afetada pela composição do material, distribuição do tamanho de partículas e especiação química do elemento (WALRAVEN et al., 2015). Adicionalmente, apesar de limitado, o cultivo de vegetais ocorre em regiões ultramáficas e o consumo de alimentos oriundos desses ambientes pode provocar danos aos seres humanos. Por isso, o estudo das propriedades químicas e à saúde humana são importantes para o manejo seguro de ambientes ultramáficos.

Nesse sentido, o presente trabalho objetivou: (i) caracterizar química e mineralogicamente solos ultramáficos do Brasil; (ii) avaliar os teores totais, ambientalmente disponíveis, disponíveis, e a mobilidade de Co, Cr e Ni para entender a dinâmica desses metais nesses ambientes; (iii) avaliar os teores de Co, Cr, e Ni em *Lactuca sativa* e *Brassica oleracea* cultivadas em dois solos ultramáficos; (iv) avaliar a bioacessibilidade gástrica, pulmonar e dermal dos metais nos solos; (v) e estimar riscos ecológicos e potenciais (não)-carcinogênicos e carcinogênicos para a saúde pela exposição de seres humanos à solos ultramáficos e pelo consumo de hortaliças cultivadas nesses ambientes.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Áreas de estudo e coletas dos solos

As áreas de estudo estão localizadas nos estados de Goiás, no município da Niquelândia (Niq) (14° 27'28"S e 48° 27' 59"O), e Pernambuco, no município de Buenos Aires (BA) (07°45'39.4.7"S, 35°24'45.1"O) (Figura 29). A Niquelândia é conhecida como a capital do níquel por ser uma anomalia mundial quanto aos teores deste elemento (3156,0 a 73786,0 mg kg⁻¹) (GARNIER et al., 2009). O clima, segundo a classificação de Köppen é do tipo *Aw* (tropical, com inverno seco). A precipitação e temperatura médias anuais são de 1500,0 mm e 22° C, respectivamente (INMET, 2021). A região possui um dos maiores complexos máfico-ultramáfico do mundo com cerca de 350,0 km de extensão. A vegetação predominante é típica do Cerrado brasileiro composta por formações campestres, savânicas e florestais (GARNIER et al., 2009).

O município de Buenos Aires possui áreas com corpos ultramáficos inferidos (SANTOS et al., 2020) e clima segundo a classificação de Köppen do tipo *As* (tropical, com verão seco),

com precipitação e temperatura médias anuais de 1079,0 mm e 27 °C, respectivamente (APAC, 2022). Os solos estudados de ambas as áreas foram coletados na profundidade 0 - 20 cm. As ordens dos solos foram classificadas como Cambissolo Háplico (Niquelândia-GO) e Neossolo Litólico (contato lítico à 46 cm) (Buenos Aires – PE) (SiBCS, 2018).

Figura 29 - Áreas de estudo e amostragem de solos ultramáficos no Brasil (Niquelândia – GO e Buenos Aires – PE).



Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.2 Análises químicas, físicas e mineralógicas

5.2.2.1 Características químicas, físicas e teores de Cr, Co e Ni nos solos

As amostras foram secas ao ar e peneiradas em malha de abertura de 2,0 mm para a determinação da fração granulométrica pelo método do densímetro; do pH em água na relação de 1:2.5 (v/v); K⁺ e Na⁺ trocáveis extraídos com a solução de Mehlich-1 e determinados por fotometria de emissão de chama; Ca^{2+} e Mg²⁺ trocáveis determinados pelo método volumétrico por titulação com EDTA (0,025 mol L⁻¹) após a extração desses cátions pela solução de cloreto de potássio (KCl) 1 mol L⁻¹; Al³⁺ trocável determinado pelo método volumétrico por titulação com hidróxido de sódio (0,025 mol L⁻¹), após a extração com KCl 1 mol L⁻¹; acidez potencial por titulação alcalimétrica do extrato após a extração com solução de acetato de cálcio (0,5 mol L⁻¹), com pH ajustado para 7,1–7,2; fósforo disponível por colorimetria após extração com a solução de Mehlich-1; e carbono orgânico total pelo método de oxidação via–úmida Walkley–Black (TEIXEIRA, 2017). A susceptibilidade magnética das amostras foi determinada por 10 leituras utilizando susceptibilímetro magnético portátil KT-10 S/C (Terraplus Inc.).

As concentrações disponíveis de Co, Cr e Ni nos solos foram avaliadas por DTPA (LINDSAY; NORVELL, 1978). Dez gramas de solo ($\emptyset < 2,0$ mm) foram agitados por 2 h a 180 rpm em uma solução de 20 mL contendo 0,005 mol L⁻¹ DTPA + 0,1 mol L⁻¹ TEA + 0,01 mol L⁻¹ CaCl₂ (pH 7,3). Posteriormente, os extratos foram centrifugados, filtrados ($\emptyset < 2,5 \mu$ m) e armazenados a 4 °C. Para a extração dos teores ambientalmente disponíveis dos metais no solo foram utilizadas subamostras de 0,500 g de solo ($\emptyset < 2,0$ mm), os quais foram digeridos em tubos de teflon com solução ácida contendo 9,0 mL de HNO₃ + 3,0 mL de HCl a 175 °C por 4'30" em forno de micro-ondas (Ethos EZ – Milestone) (USEPA, 1998). Os extratos foram filtrados ($\emptyset < 2,5 \mu$ m); o volume aferido em balões volumétricos certificados de 25 mL (NBR ISSO/IEC) com água ultrapura; e armazenados a 4 °C para posterior análise.

A extração dos teores totais dos metais foi realizada pela digestão de 0,5000 g ($\emptyset < 2,0$ mm) das amostras de solo em beckers de teflon com solução ácida (HF + HNO₃ + HClO₄ + HCl) em chapa aquecedora a 190 °C (ALVAREZ et al., 2001); posteriormente, os extratos foram filtrados ($\emptyset < 2,5 \mu$ m); o volume aferido em balões volumétricos certificados de 25 mL (NBR ISSO/IEC) com água ultrapura; e armazenados a 4 °C para posterior análise.

5.2.2.2 Análises nas rochas e mineralogia dos solos

As análises petrográficas das amostras de Niquelândia e Buenos Aires foram realizadas seguindo a metodologia descrita por Murphy (1986). As amostras das rochas foram cortadas

em fatias planas aproximadamente de 47 x 25 x 30 mm, posteriormente aquecidas a 60°C em chapa. As fatias das amostras aquecidas foram impregnadas com uma mistura de resina (Araldite® e endurecedor) e acetona e colocadas sobre as lâminas de vidro cuja secagem ocorreu ao ar livre. O conjunto de lâminas/amostras foram preparadas na cortadora/desbastadora adiamantada. No desbaste final do conjunto lâmina/amostra tinha a espessura de 30 micra (o mesmo que 0,03 mm). As lâminas foram analisadas com o uso do microscópio petrográfico.

Para as análises químicas semiquantitativas, as amostras das rochas foram pulverizadas em moinho de panelas. Os pós das rochas foram secos em estufa a 110 °C. Uma porção das amostras secas foi prensada em cápsulas de alumínio com 30 toneladas de força. As pastilhas prensadas foram analisadas em espectrômetro de fluorescência de raios-X Rigaku modelo ZSX Primus II, equipado com tubo de Rh e 7 cristais analisadores, para os elementos de interesse. Os resultados foram recalculados para 100,0 % para incorporar o valor de perda ao fogo.

As análises mineralógicas foram realizadas nas frações areia grossa, areia fina e argila sendo determinadas por difratometria de raios x. As frações foram obtidas por meio de centrifugação (JACKSON, 1969). A fração areia foi identificada por meio da microscopia ótica, determinada de acordo com as propriedades macroscópicas, segundo Leinz & Campos (1979). Os tratamentos de saturação por K e Mg foram realizados na argila, e analisados na forma de microagregados orientados (JACKSON, 1975). As amostras saturadas com K (KCl 1 mol L⁻¹) foram analisadas em meio a sucessivos tratamentos de aquecimento, inicialmente a 25 °C e após 3 horas de aquecimento (para cada temperatura), a 110, 350 e 550 °C.

As amostras saturadas com Mg (MgCl₂ 1 mol L⁻¹) foram analisadas a temperatura ambiente e posteriormente solvatadas com glicerol. A identificação de óxidos de ferro foi determinada por difratometria de raios X, posteriormente aos tratamentos para concentração dos mesmos, usando NaOH (5 mol L⁻¹) em digestão por 2 horas, de acordo com Kampf & Schwertmann (1982), modificado por Singh & Gilkes (1991).Os critérios empregados para interpretação dos difratogramas e identificação dos minerais constituintes da fração argila foram baseados no espaçamento interplanar (d) e no comportamento dos picos de difração frente aos tratamentos de saturação e térmicos empregados, conforme apresentado por Jackson (1975), Brown & Brindley (1980) e Moore & Reynolds (1989).

5.2.3 Mobilidade de metais em solos ultramáficos

5.2.3.1 Extração sequencial de Co, Cr e Ni

A extração sequencial de Co, Cr e Ni foi realizada em 5 etapas baseadas em van der Ent et al. (2019) que por sua vez é uma adaptação dos métodos propostos por Quantin et al. (2002) e Leleyter & Probst (1999) para solos ultramáficos. Utilizou-se 1,0 g de solo ($\emptyset < 2,0$ mm) para todas as etapas. A etapa da matéria orgânica foi omitida devido à baixa associação encontrada com esses metais. As frações avaliadas e as condições de análise estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 7 – Procedimentos da extração sequencial seletiva.

Fração	Reagentes	Volume	Condições
Solúvel em água e trocável ^a	0,1 M CaCl ₂	10 mL	2 h a 20 °C
Ligados a óxidos-Mn ^a	0,1 M cloridrato de hidroxilamina	10 mL	30 min a 20 °C
Ligados a óxidos-Fe amorfos ^a	0,2 M oxalato de amônio + 0,2 M ácido oxálico	10 mL	4 h no escuro a 20 °C
Ligados a óxidos-Fe cristalinos ^b	CB: Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ , 2H ₂ O (78,4 g L ⁻¹) + NaHCO ₃ (9,82 g L ⁻¹); D: Na ₂ S ₂ O ₄ , pH 7	50 mL CB 1 g Na ₂ S ₂ O ₄	80 °C, 15 min no CB e 30 min após adicionar ditionito (D), agitação magnética
Residual ^c	$HF + HNO_3 + HClO_4 + HCl$	5+5+3+5 mL	190 °C em chapa aquecedora

^a Van der ent et al. (2019); ^b Quantin et al. (2002); ^c Alvarez et al. (2001).

Após cada etapa de extração, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 20 min e os sobrenadantes foram filtrados ($\emptyset < 0.45 \ \mu$ m) e armazenados a 4 °C para posterior análise. Os resíduos foram lavados com 20 mL de água destilada, com repetição de centrifugação, descarte da água e secagem do resíduo (40 °C) antes da etapa seguinte da extração. As perdas de solo durante a extração sequencial foram calculadas (< 0.05 g) por meio de secagem e pesagem das amostras após a etapa final do procedimento.

5.2.3.2 Código de Avaliação de Risco (RAC)

O RAC permite avaliar quantitativamente a biodisponibilidade do metal estimando o potencial risco ambiental (PARDO et al., 1990). Trata-se de uma relação entre as frações trocável e a soma das outras frações dos metais estudados e pode ser calculado usando a seguinte expressão:

$$RAC_{(\%)} = \frac{F1}{TM} \times 100$$
 (Eq. 1)
onde F1 (mg kg⁻¹) representa a concentração de cada metal investigado na fração trocável da extração sequencial (metais biodisponíveis) e TM (mg kg⁻¹) é a soma das outras frações do metal correspondente (PERIN et al., 1985). Quanto maior o percentual do RAC, maior o risco ambiental. Um percentual inferior a 1,0 % significa que não há risco ao meio ambiente pelo metal. Percentuais entre 1,0 e 10,0 % são considerados de baixo risco; enquanto percentuais entre 11,0 e 30,0 % representam um risco médio e percentuais entre 31,0 e 50,0 % revelam alto risco ao meio ambiente. As porcentagens acima de 50,0 % representam um risco extremamente alto para o meio ambiente.

5.2.4 Estimativa do potencial risco ecológico

O índice de risco ecológico potencial (PERI) proposto por Hakanson (1980) é calculado da seguinte forma:

$$PERI = \sum E_i \quad (Eq.2)$$
$$E_i = T_I \times f_I \quad (Eq.3)$$
$$f_i = \frac{C_i}{B_i} \quad (Eq.4)$$

onde PERI corresponde à soma de todos os fatores de risco dos metais nos solos, E_i é o fator de risco ecológico potencial individual, T_i é o fator de toxicidade do metal, f_i é o fator de contaminação do metal, C_i é a concentração do metal no solo (o teor ambientalmente disponível foi considerado), e B_i é o valor de referência de qualidade dos metais nos solos de Pernambuco (Co = 4,0; Cr = 35,0; Ni = 9,0 mg kg⁻¹) e Minas Gerais (Co = 6,0; Cr = 75,0; Ni = 21,5 mg kg⁻¹) (COPAM, 2011; CPRH, 2014). O fator de toxicidade de um metal depende da sensibilidade das comunidades biológicas do solo; os fatores estão na ordem seguinte: Ni (5) > Cr (2) = Co (2) (HAKANSON, 1980). Os PERIs para solos podem ser classificados em quatro grupos: PERI $\leq 150,0$ (baixo risco ecológico), $150,0 \leq PERI \leq 300,0$ (risco ecológico moderado), $300,0 \leq PERI \leq 600,0$ (elevado potencial para risco ecológico) e PERI > 600,0 (risco ecológico significativamente elevado).

5.2.5 Análise da comunidade de bactérias

Os solos ultramáficos foram submetidos a dose de ácido cítrico (40,0 mmol kg⁻¹) para avaliação da comunidade bacteriana antes e após a aplicação e degradabilidade do quelante. O

DNA total do solo foi extraído no tempo 0, 2 e 40 dias após aplicação do quelante, a partir de 0,25 g de solo, usando o kit DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN Laboratories, Carlsbad, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. A integridade do DNA extraído foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1,0 %, submetido a 100 V por 30 minutos, imerso em tampão TAE (Tris, Acetate, EDTA) 1,0 X. As amostras foram coradas com SYBR® Safe [™] (Invitrogen, Carlsbad, CA). A concentração e qualidade do DNA foram verificadas com Qubit XX Fluorometer (Thermo Fisher Scientific).

A região V3-V4 do gene 16S rRNA de bactérias foi sequenciada. Para isso, o 16S rRNA foi amplificado usando os primers 515f (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) e 806r (GGACTACNVGGGTWTCTAAT). As bibliotecas de amplicon foram construídas seguindo o protocolo da Illumina. As condições de ciclagem térmica na PCR foram: 95°C por 3 min, seguido por 25 ciclos de 95°C por 20 s, 55°C por 10 s, e 72°C por 20 s, com uma extensão final a 72°C por 5 min. Todas as reações foram conduzidas usando a KAPA High-Fidelity DNA Polymerase, com 1 μ l de DNA molde. Todas as amostras foram quantificadas usando o Qubit XX Fluorometer, reunidas em quantidades equimolares e corridas na plataforma Illumina MiSeq com 150 bases paired-end readings.

A inferência das variantes de sequências de amplicons (Amplicon Sequence Variantes – ASV) presentes em cada amostra foi realizada no software R, utilizando o pacote DADA2 (CALLAHAN et al., 2016). Devido ao baixo percentual de sobreposição observado, somente as forward single-end reads foram trimadas e filtradas. Nenhuma base ambígua foi permitida e cada read teve menos de dois erros esperados com base nos seus scores de qualidade. Sequências quiméricas foram identificadas em cada amostra, e ASVs foram removidas quando identificadas como quimeras. A afiliação taxonômica das sequências foi realizada usando o banco de dados de Silva v138 (QUAST et al., 2013).

5.2.6 Bioacessibilidade humana de Co, Cr e Ni: métodos de testes in vitro

Testes de bioacessibilidade foram realizados para as três rotas de exposição estudadas: ingestão, inalação e contato dérmico. A bioacessibilidade gástrica dos metais foi avaliada pelo teste de extração com base fisiológica (TEBF) (RUBY et al., 1996), que consiste na simulação das condições da fase gástrica do trato digestivo humano. Subamostras de 0,500 g (\emptyset < 75,0 µm) foram pesadas em erlenmeyer de 250 mL, misturadas com 50 mL da solução gástrica (1,25 g L⁻¹ de pepsina, 0,5 g L⁻¹ de citrato de sódio, 0,5 g L⁻¹ de ácido málico, 0,42 mL de ácido láctico, 0,50 mL de ácido acético) de pH 1,5 ajustado com HCl concentrado e aquecidas em banho maria 37 °C com agitação de 32 rpm por 1 h. Posteriormente, 20 mL dos extratos foram centrifugados a 3000 rpm por 20', os sobrenadantes filtrados e armazenados a 4 °C para posterior análise.

A bioacessibilidade dermal foi avaliada utilizando solução de suor sintético EN 1811. Esta solução foi criada para testes de liberação de Ni de superfícies metálicas e seu contato com a pele (CEN, 2015). Além disso, sua formulação possui os principais eletrólitos presentes no suor humano. O suor artificial foi obtido pela homogeneização de (g L⁻¹): 1,0 de CH₄N₂O; 5,0 de NaCl e 1,0 de C₃H₆O₃ (YUAN et al., 2015). O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH (0,1 %), por ser um valor médio considerado correspondente ao do suor liberado pelas glândulas sudoríparas écrinas (4,0-6,0) e apócrinas (5,5-7,0) (LEAL; GUNEY; ZAGURY, 2018). Subamostras de 2,000 g (Ø < 75,0 µm) foram pesadas em erlenmeyer de 250 mL. O diâmetro da partícula escolhido é devido a maior aderência à pele, e possibilidade de ultrapassar os corneócitos, atingindo a corrente sanguínea. 20 mL do suor sintético foram adicionados e os erlenmeyers rotacionados a 100 rpm durante 2 h a 36 °C (temperatura média da pele humana). Posteriormente, os extratos foram centrifugados a 5 000 rpm por 20', os sobrenadantes filtrados e armazenados a 4 °C para posterior análise.

A bioacessibilidade pulmonar foi avaliada pelo teste in vitro de fluidos pulmonares simulados (FPS) que consiste no uso da solução de Gamble para simular fluidos dos alvéolos pulmonares (LUO et al., 2019). A solução de Gamble (MIDANDER et al., 2007) foi realizada pela homogeneização de (g L⁻¹): 0,095 de MgCl₂; 6,019 de NaCl; 0,298 de KCl; 0,126 de Na₂HPO₄; 0,063 de Na₂SO₄; 0,368 de CaCl₂·H₂O; 0,574 de C₂H₃O₂Na; 2,604 de NaHCO₃ e 0,097 de C₆H₅Na₃O₇·₂H₂O, com o pH ajustado para 7,4 (37 °C). Subamostras de 0,30 g (Ø < 2,5 µm) foram pesadas em erlenmeyer de 250 mL. Este diâmetro foi adotado por se tratar do tamanho de partícula capaz de acessar as partes mais internas e sensíveis do sistema respiratório e atingir a corrente sanguínea. O material particulado fino (MP2,5) foi coletado por sedimentação das partículas com base na lei de Stokes (LI et al., 2020). 150 mL da solução de Gamble foram adicionados e os erlenmeyers agitados a 200 rpm por 24 h a 37 °C. Os sobrenadantes foram filtrados e armazenados a 4 °C para posterior análise.

As bioacessibilidades gástrica, pulmonar e dermal de Co, Cr e Ni nos solos ultramáficos foram calculadas de acordo com a equação 5:

$$B = \frac{C \times V}{m \times T} \times 100 \ (Eq.5)$$

onde B é a bioacessibilidade dos metais pesados nos solos ultramáficos nas fases gástrica, dermal ou pulmonar, %; C é a concentração dos metais pesados nos extratos das fases gástrica, dermal ou pulmonar, mg L⁻¹; V é o volume da solução, L; m é a massa da amostra, kg; e T é a concentração total dos metais pesados no solo ultramáfico, mg kg⁻¹.

5.2.7 Análise química das plantas

As plantas foram coletadas e separadas em raiz e parte aérea. As amostras vegetais foram lavadas com água corrente, e uma tripla lavagem com água destilada, secas em estufa a 65 °C, e maceradas num moinho tipo Wiley. Posteriormente, subamostras de 0,5 g de raízes e folhas foram digeridas com HNO₃ + H₂O₂ (3:1) num forno de micro-ondas (Milestone-Ethos Easy) a 180 °C por 10', de acordo com a metodologia 3050B modificada (USEPA, 1996). Todos os extratos obtidos das digestões foram filtrados (\emptyset < 2,0 µm), sendo o volume completado até 25 mL com água ultrapura em balões volumétricos certificados. Os extratos foram armazenados a 4 °C para posterior análise.

5.2.8 Avaliação de risco à saúde

5.2.8.1 Risco à saúde por exposição aos solos ultramáficos

Os potenciais efeitos adversos à saúde de adultos pela exposição a Co, Cr e Ni nos solos ultramáficos foram investigados de acordo com o modelo de avaliação de risco proposto pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA 1989, 2001 e 2007). Três rotas de exposição foram consideradas: (i) ingestão direta das partículas sólidas do solo (ADI_{ing}) ; (ii) inalação pela boca ou nariz de partículas ressuspensas no ar (ADI_{inh}) ; (iii) absorção dérmica dos metais pesados nas partículas aderidas a pele (ADI_{dermal}) . As ingestões médias diárias provenientes de cada uma das três rotas foram calculadas de acordo com as equações 6 - 8, respectivamente.

$$ADI_{ing} = \frac{C_i \times BA_i \times IngR \times EF \times ED}{BW \times AT} \times 10^{-6} \quad (Eq. 6)$$
$$ADI_{inh} = \frac{C_i \times InhR \times EF \times ED}{PEF \times BW \times AT} \quad (Eq. 7)$$
$$ADI_{dermal} = \frac{C_i \times SA \times SL \times ABS \times EF \times ED}{BW \times AT} \quad (Eq. 8)$$

O índice de perigo (*HI*) compreende ao risco total não carcinogênico causado pelas rotas de exposição e foi calculado de acordo com a equação 9:

$$HI = \sum_{p} HQ_{p} = \sum_{p} \frac{ADI_{p}}{RfD_{p}} \quad (Eq.9)$$

onde C_i é a concentração bioacessível do metal *i* na amostra do solo ultramáfico (mg kg⁻¹); IngR é a taxa de ingestão (mg day⁻¹); InhR é a taxa de inalação (m³ day⁻¹); EF é a frequência de exposição (days year⁻¹); ED é a duração da exposição (years); SA é a área superficial da pele exposta (cm²); SL é o fator de aderência da pele (mg cm⁻² day⁻¹); ABS é o fator de absorção dermal (unitless); PEF é o fator de emissão de partícula (m³ kg⁻¹); BW é o peso médio do corpo (kg); AT é o tempo médio de exposição (days). HQ_p (quociente de perigo) representa o risco não carcinogênico da rota de exposição *p*. ADI_p é a ingestão média diária por meio da rota de exposição *p* (mg kg⁻¹ day⁻¹). RfD_p é a dose de referência da rota de exposição *p* que significa a dose do metal *i* ingerida que não causa efeito adverso em humanos.

Considerando que o público-alvo é comumente exposto a contaminação por múltiplos metais (efeito sinérgico) e por diferentes rotas de exposição, um índice de perigo de exposição total (*TEHI*) pode ser definido pela soma dos HIs de cada rota de exposição para todos os metais pesados investigados, como descrito pela equação 10 (CHEN et al., 2016). *TEHI* < 1 representa risco não carcinogênico baixo ou aceitável e *TEHI* > 1 indicam prováveis efeitos adversos à saúde humana (USEPA, 2001).

$$TEHI = \sum HI = \sum_{i=1}^{N} \frac{ADI_{ing}^{i}}{RfD_{ing}^{i}} + \sum_{i=1}^{N} \frac{ADI_{inh}^{i}}{RfD_{inh}^{i}} + \sum_{i=1}^{N} \frac{ADI_{dermal}^{i}}{RfD_{dermal}^{i}} \quad (Eq. 10)$$

Para os metais carcinogênicos (Co, Cr e Ni), o risco total de câncer foi estimado como probabilidade individual do desenvolvimento de câncer durante a vida decorrente da exposição potencial a carcinogênicos. O risco total de câncer (*TCRI*) foi calculado usando a equação 11:

$$TCRI = \sum_{i=1}^{N} \left(ADI_{ing}^{i} \times SF_{ing}^{i} \right) + \sum_{i=1}^{N} \left(ADI_{inl}^{i} \times SF_{inl}^{i} \right) + \sum_{i=1}^{N} \left(ADI_{dermal}^{i} \times SF_{dermal}^{i} \right) (Eq.11)$$

onde ADI_{pi} é a exposição média diária pela rota de exposição *p* para o metal *i*; e SF^{i} é o valor do fator de inclinação de câncer para o elemento *i* (mg kg⁻¹ day⁻¹). Quando $10^{-6} < TCRI < 10^{-4}$, o risco está dentro da faixa aceitável. Quando $TCRI > 10^{-4}$, a tolerância humana para o risco carcinogênico é excedida (USEPA, 1989). As definições e os valores dos parâmetros utilizados na modelagem do risco foram apresentados na tabela 8.

Parâmetro	Símbolo	Valor	Unidade	Referências
Peso corporal, adulto	BW_c	65,0	kg	IBGE, 2010
Taxa de ingestão do solo, adulto	IngR _a	100,0	mg dia ⁻¹	RAIS, 2018
Taxa de inalação	InhR	15,5	m ³ dia ⁻¹	PENG et al., 2016
Frequência de exposição do residente	EF	350	dia ano ⁻¹	RAIS, 2018
Duração da exposição, adulto	ED_a	24	Ano	USEPA, 2001
Tempo de exposição, carcinogênico	AT_c	25.550	Dia	USEPA, 2002
Tempo de exposição, não-carcinogênico	AT_{nc}	365×ED	Dia	USEPA, 2002
Fator de absorção dermal	ABS	0,001	sem unidade	RAIS, 2018
Área superficial da pele exposta, adulto	SA_a	6032,0	cm^2	RAIS, 2018
Fator de aderência a pele, adulto	AF_a	0,07	mg cm ⁻² dia ⁻¹	RAIS, 2018
Fator de emissão de partícula	PEF	1,36×10 ⁹	m ³ kg ⁻¹	USEPA, 2001
Dose de referência de ingestão (Co)	$RfD_{ing(Co)}$	3,0×10 ⁻⁴	mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	RAIS, 2018
Dose de referência de ingestão (Cr)	$RfD_{ing(Cr)}$	3,0×10 ⁻³	mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	RAIS, 2018
Dose de referência de ingestão (Ni)	$RfD_{ing(Ni)}$	2,0×10 ⁻²	mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	RAIS, 2018
Dose de referência de inalação (Co)	$RfD_{inal(Co)}$	3,0×10 ⁻⁴	mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	RAIS, 2018
Dose de referência de inalação (Cr)	$RfD_{inal(Cr)}$	2,9×10 ⁻⁵	mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	RAIS, 2018
Dose de referência de inalação (Ni)	$RfD_{inal(Ni)}$	2,1×10 ⁻²	mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	RAIS, 2018
Dose de referência dermal (Co)	$RfD_{derm(Co)}$	3,0×10 ⁻⁴	mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	RAIS, 2018
Dose de referência dermal (Cr)	$RfD_{derm(Cr)}$	6,0×10 ⁻⁵	mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	RAIS, 2018
Dose de referência dermal (Ni)	$RfD_{derm(Ni)}$	5,4×10 ⁻³	mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	RAIS, 2018
Fator de inclinação para inalação (Co)	$SF_{ing(Co)}$	2,0×10 ⁻²	mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	USEPA, 2018
Fator de inclinação para ingestão(Cr)	$SF_{ing(Cr)}$	5,0×10 ⁻¹	mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	CHEN et al., 2016
Fator de inclinação para inalação (Ni)	$SF_{inal(Ni)}$	8,4×10 ⁻¹	mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	CHEN et al., 2016

Tabela 8 - Valores médios de parâmetros toxicológicos e de exposição usados na avaliação de risco à saúde humana por ingestão, inalação e contato dermal com solos ultramáficos.

5.2.8.2 Risco à saúde por consumo de hortaliças

Lactuca sativa L. e *Brassica oleracea* são algumas das hortaliças folhosas mais consumidas no Brasil, com ingestões médias diária de 1,0 a 2,6 gramas e por isso foram escolhidas para o estudo de risco (IBGE, 2020). As espécies foram germinadas em substrato comercial (Basaplant). Após 7 dias, as plântulas foram transplantadas para vasos com 2,0 kg

dos solos ultramáficos da Niquelândia e Buenos Aires e cultivadas por 45 dias. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, num delineamento experimental inteiramente casualizado e arranjo fatorial duplo 2 (espécies vegetais) x 2 (solos) x 6 (repetições), totalizando 24 unidades experimentais. As folhas e raízes das plantas foram coletadas no 45° dia, lavadas em água corrente e destilada e secas a 60 °C por 48 h. As folhas e raízes foram trituradas após a secagem. Subamostras de 0,5000 g foram digeridas com 8 mL de HNO₃ + 2 mL de H₂O₂ em bloco digestor a 180°C (USEPA, 1996). Posteriormente, os extratos foram filtrados e o volume aferido para 25 mL sendo armazenados a 4 °C para posterior análises.

Os riscos carcinogênicos e (não)-carcinogênicos para à saúde humana por exposição a Co, Cr e Ni contidos nas partes comestíveis de *Lactuca sativa* L. e *Brassica oleracea* foram estimados de acordo com parâmetros estabelecidos pela Agência de Proteção Ambiental do Estados Unidos (USEPA, 1998). As doses de exposição diária foram calculadas para os metais levando em consideração uma rota de exposição: ingestão das folhas (Eq. 12):

$$ADI_{veg} = C_{veg} \times \frac{IngR \times EF \times ED}{BW \times AT}$$
 (Eq. 12)

O quociente de perigo (HQ) foi calculado para cada metal usando a relação entre a exposição por ingestão dos vegetais e a dose de referência (RfD) respectiva para cada metal (Eq. 13). A RfD é a dose de exposição máxima sem efeito adverso à saúde humana.

$$HQ_n = \frac{ADI_n}{RfD_n} \quad (Eq. 13)$$

A interação multielementar pode ter um efeito sinérgico no receptor. Portanto, os riscos individuais dos metais foram considerados aditivos. O risco cumulativo não-carcinogênico foi calculado pelo somatório dos índices de perigo (HI) (Eq. 14). Valores de HI \leq 1 indicam risco aceitável, enquanto valores de HI \geq 1 indicam provável efeito adverso à saúde humana.

$$HI = \sum HQ_{veg Co} + HQ_{veg Cr} + HQ_{veg Ni} \quad (Eq. 14)$$

O risco carcinogênico (CR) foi calculado para os elementos Co, Cr e Ni, de acordo com a equação 15 (USEPA, 2007):

$$TCRI = \sum_{Co,Cr,Ni} (ADI_{Co} \times SF_{Co}) + (ADI_{Cr} \times SF_{Cr}) + (ADI_{Ni} \times SF_{Ni}) (Eq. 15)$$

Onde, TCRI é o risco de câncer total considerando o somatório das ingestões médias diárias dos metais pelo consumo dos vegetais multiplicadas pelo fator de inclinação de câncer do elemento (SF) (mg kg⁻¹ dia⁻¹). Valores de CR $< 1 \times 10^{-6}$ indicam um risco de câncer aceitável e CR $> 1 \times 10^{-4}$ é considerado como risco carcinogênico inaceitável (USEPA, 1989). Os valores e definições dos parâmetros utilizados na modelagem dos riscos à saúde por consumo de hortaliças estão descritos na tabela 9:

 Tabela 9 - Parâmetros toxicológicos e de exposição usados na avaliação de risco à saúde humana por consumo de vegetais cultivados em solos ultramáficos.

Parâmetros	Símbolo	Valor	Unidade	Referências
Teor total do metal no vegetal	\mathbf{C}_{veg}	-	mg kg ⁻¹	Este estudo
Ingestão diária do vegetal	IngR	0,0026 (Lactuca sativa L.); 0,0012 (Brassica oleracea)	kg dia ⁻¹	IBGE, 2020
Frequência de Exposição	EF	365	dias ano ⁻¹	ATSDR, 2012
Duração da Exposição	ED	77	ano	WBG, 2020
Peso médio corporal	BW	65	kg	WBG, 2020
Tempo médio	AT	$365 \times ED$	dia	USEPA, 2001
Dose de referência oral	RfD	$3,0 \times 10^{-2}$ (Co); $3,0 \times 10^{-3}$ (Cr) ^a ; $2,0 \times 10^{-2}$ (Ni)	mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	RAIS (2018)
Fator de inclinação (Co)	$SF_{ing(Co)}$	$2,0 \times 10^{-2}$	mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	RAIS (2018)
Fator de inclinação (Cr)	$SF_{ing(Cr)}$	$5,0 \times 10^{-1}$	mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	RAIS (2018)
Fator de inclinação (Ni)	$SF_{ing(Ni)}$	$1,7 imes 10^{0}$	mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	RAIS (2018)

^{*a*}A toxicidade do Cr depende diretamente do seu estado de valência (Cr^{+6} ou Cr^{+3}), neste estudo, a RfD de Cr^{+6} foi reperesentada por Cr total.

5.2.8.3 Fator de bioconcentração e translocação de metais

O fator de bioconcentração (BCF) avaliou o potencial de acumulação de metais nas partes comestíveis de *Lactuca sativa* e *Brassica oleracea* com a concentração total de metais do solo (SIDHU et al., 2017). O BCF foi calculado usando a equação 16:

$$BCF = \frac{MP_{(mg\,kg^{-1})}}{MS_{(mg\,kg^{-1})}} \quad (Eq.\ 16)$$

onde MP é a concentração de metal (Co, Cr, Ni) na parte comestível da cultura (mg kg⁻¹), e MS é a concentração total de metal (Co, Cr, Ni) no solo (mg kg⁻¹). Para avaliar o potencial de translocação, a equação 17 foi utilizada:

$$Translocação = \frac{MP (mg kg^{-1})}{MR (mg kg^{-1})} \quad (Eq. 17)$$

Onde, *MP* é o teor do metal na parte aérea da planta (mg kg⁻¹) e *MR* é o teor total do metal nas raízes (mg kg⁻¹) (BERNARDINO et al., 2018).

5.2.9 Determinação dos metais e controle de qualidade

Os teores totais, ambientalmente disponíveis, disponíveis, bioacessíveis e sequenciais de Co, Cr e Ni nos solos e dos metais nas plantas foram determinados por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP - OES Perkin Elmer 7000 DV). As análises foram realizadas em duplicatas e com testes em branco. Todos os materiais utilizados nas análises foram devidamente lavados, permaneceram imersos por 24 h na solução de HNO₃ (10 %) e depois foram lavados com água destilada. Um mililitro da solução de 0,5 mol L⁻¹ de Lu foi adicionado nos extratos (Lu como padrão interno para a correção dos interferentes analíticos na determinação dos metais em ICP–OES). Como padrão de qualidade para os teores totais utilizou-se dois padrões NIST (National Institute of Standards and Technology) que possui os teores dos metais certificados em solo (SRM 2710 - Montana I Soil) e planta (SRM 1570a - Trace Elements in Spinach Leaves). As informações instrumentais e analíticas do ICP-OES e as recuperações de Co, Cr e Ni para as amostras certificadas estão descritas na tabela 10.

Tabela 10 - (i) Parâmetros instrumentais do ICP-OES para a análise de Co, Cr e Ni em solo e planta; (ii) parâmetros analíticos do ICP-OES para Co, Cr e Ni em solo e planta; (iii) Resultados para medições repetitivas (n = 3) de metais pesados em materiais de referência padrão (SRM 2711a e SRM 1570a).

(1)							
Parâmetro		Valor		Parâmetro		Valor	
Tipo de nebulizador Concêntrico		de vidro (Meinhard)	Delay de leitura		30 s		
Tipo de câm	ara de pulverização	Ciclônica		Tipo de calibração]	Interceptação zero, linear	
Potência de	RF	1300 W		Purga]	Normal	
Fluxo do gá	s do plasma	15,0 L min-	1	Resolução]	Normal	
Fluxo do gá	s auxiliar	0,5 L min ⁻¹		Lavagem	-	20 s	
Vista do pla	sma	Axial/radial		Correção de fundo		Variável	
Taxa de flux	to da amostra	2,0 L min ⁻¹		Replicatas	2	3	
Fluxo de gás	s do nebulizador	0,8 L min ⁻¹		Solução de transporte		2 % HNO ₃	
Auto integra	ição	$1 \operatorname{smin} - 2$	s max	Solução limpeza		2 % HNO ₃	
Modo de pro	ocessamento	Área		Acidez dos padrões/amostr	as .	5 % HNO ₃	
(ii)							
Elementos	Linha de emissão ((nm)	Faixa de calibração (mg	g L ⁻¹) Vista do plasma	r	LDs (mg kg ⁻¹)	
	Principal	Alternativa					
Со	230,786	228,616	5,0	Axial	0,9998	1 0,1	
Cr	205,560	205,560	2,0	Axial	0,9999	8 0,4	
Ni	231,604	221,648	5,0	Axial	0,9999	8 0,4	
(iii)							
Elementos	SRM 2711a						
	Valores obtidos (m	ng kg ⁻¹)	DPR (%)	Valores certificados (mg kg	g ⁻¹) l	Recuperação (%)	
Со	8,99 ± 0,012		4,0	9,89 (9,71 - 10,07)	9	90,9	
Cr	137.8 ± 5.2		3,8	130,0 (121,0 - 139,0)		106,0	
Ni	79,9 ± 3,6 4		4,5	85,0 (83,0 - 87,0)		94,0	
Elementos	SRM 1570a						
	Valores obtidos (mg kg ^{-1}) DPR (%)		Valores certificados (mg kg	g ⁻¹) 1	Recuperação (%)		
Co	0.34 2.5		2,8	0,39 (0,36 - 0,42)	Ģ	94,4	
Ni	1,93 4,2		4,2	2,14 (2,09 - 2,19)		90,1	
·	1~ 1		. ~				

DPR Desvio padrão relativo; LDs Limites de detecção.

5.2.10 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos a métodos estatísticos univariados (média, mediana, mínimo, máximo e desvio padrão). Os procedimentos gráficos e estatísticos foram realizados usando os softwares OriginPro 2019 e STATISTICA (versão 10.0). Os índices de riqueza (Chao), diversidade (Shannon – H') e equabilidade (Pielou – J) foram calculados pelo software PASTv.4 (HAMMER; HARPER; RAYAN, 2001).

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Atributos químicos, físicos, petrográficos e mineralógicos

Os atributos químicos e físicos (pH, teores de nutrientes, acidez trocável, carbono orgânico, susceptibilidade magnética e granulometria) para os solos de Niquelândia e Buenos Aires estão descritos na Tabela 11. Os solos foram classificados em Cambissolo Háplico (Niquelândia) e Neossolo Litólico (Buenos Aires) de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS, 2018). Os valores de pH se aproximaram da neutralidade (6,5 - 6,6) e os teores de Ca, Na, K, P e Al foram considerados baixos nos dois solos. Os teores de carbono orgânico variaram de 1,2 a 2,0 %, sendo maior no solo de Buenos Aires que é adjacente a cultivo de cana-de-açúcar e habitat florestal. Os teores de matéria orgânica em solos ultramáficos temperados são na maioria das vezes considerados insignificantes. Porém, ambientes tropicais, proporcionam condições climáticas que intensificam a atividade biológica do solo, aumentando a deposição de material orgânico e acelerando sua decomposição, causando incremento nos teores de carbono orgânico (TASHAKOR et al., 2011; VAN DER ENT et al., 2019). As texturas dos solos foram semelhantes e classificadas como franca (Cambissolo) e franco argilosa (Neossolo). Os solos também apresentaram alta susceptibilidade magnética, sendo a do Cambissolo quase 3 vezes superior à do Neossolo, indicando a presença de minerais com magnetismo.

Foi observada a inversão típica da relação Ca:Mg em solos ultramáficos, sendo 1:5 para o Cambissolo e 1:30 para o Neossolo. Os altos teores de Mg são atribuídos à composição mineralógica das rochas ultramáficas que possuem elevada presença de minerais ferromagnesianos e de serpentina com fórmulas químicas generalizadas: (Mg,Fe,Ni,Mn,Zn)₂-₃(Si,Al,Fe)₂O₅(OH)₄ ou X₂-₃Si₂O₅(OH)₄ (olivinas, piroxênios, anfibólios, crisotilo, lizardita, antigorita) (GWENZI, 2020; KIERCZAK; PIETRANIK; PEDZIWIATR, 2021). Estes minerais são facilmente intemperizáveis, e por isso, o Mg é rapidamente liberado no sistema onde se torna um cátion dominante (KANELLOPOULOS, 2020). Além disso, a maior inversão Ca:Mg encontrada no Neossolo está relacionada com a presença do talco e menores taxas de intemperismo e lixiviação de bases do sistema quando comparado ao Cambissolo (VITHANAGE et al., 2019). A composição elementar dos materiais de origem dos solos estudados explica a baixa fertilidade natural e seus enriquecimentos por Mg (Tabela 12).

Atributos	Cambissolo	Neossolo
pH (H ₂ O) (1:2,5)	6,5	6,6
H+Al (cmol _c dm ⁻³)	2,3	2,6
Ca (cmol _c dm ⁻³)	0,6	1,3
Mg (cmol _c dm ⁻³)	3,0	40,0
Al (cmol _c dm ⁻³)	0,0	0,0
Na (cmol _c dm ⁻³)	0,4	0,3
K (cmol _c dm ⁻³)	0,1	0,1
$P (mg dm^{-3})$	0,0	0,0
$\cos^{a}(g \text{ kg}^{-1})$	12,0	20,0
SM ^b (adimensional)	63,0E-03	23,0E-03
Areia (g kg ⁻¹)	298,0	295,0
Silte (g kg ⁻¹)	487,0	421,0
Argila (g kg ⁻¹)	215,0	284,0

Tabela 11 - Atributos químicos e físicos dos solos ultramáficos da Niquelândia (Cambissolo) e Buenos Aires (Neossolo)

^acarbono orgânico do solo; ^bSusceptibilidade magnética.

Tabela 12 - Composição representativa (%) dos elementos maiores e traços das amostras de rochas máficas ocorrentes nas regiões estudadas

Elemento	Buenos Aires	Niquelândia
Na ₂ O	ND	1,30
MgO	32,90	22,83
Al_2O_3	2,39	14,70
SiO_2	44,99	51,50
P_2O_5	0,40	0,43
SO_3	0,09	0,04
K_2O	0,06	ND
CaO	0,03	1,68
TiO_2	1,33	0,99
V_2O_5	0,37	ND
Cr_2O_3	ND	ND
MnO	0,73	0,01
Fe_2O_3	0,21	ND
NiO	14,72	0,24
CuO	0,02	0,01
ZnO	0,22	4,45
ETRs	0,04	0,14
PF	1,50	1,68
Total	100,00	100,00

Ambas as rochas foram classificadas como serpentinitos e suas composições elementares seguiram a seguinte ordem decrescente: Si > Mg > Ni > Al > Ti > Mn > P > V > Zn > Fe > S > K > ETRs > Ca > Cu para o serpentinito de Buenos Aires e Si > Mg > Al > Zn > Ca > Na > Ti > P > Ni > ETRs > S > Mn = Cu para o serpentinito da Niquelândia. As proporções médias descritas para fósforo (0,4 %), potássio (0,03 %), cálcio (0,8 %), magnésio (27,8 %) e níquel (7,4 %) refletem na baixa fertilidade e no predomínio de Mg nos solos ultramáficos, tornando-os indesejáveis para a agricultura e ambientes hostis para a maioria das plantas devido a desequilíbrios nutricionais e teores elevados de metais pesados (VITHANAGE et al., 2019). As descrições petrográficas das lâminas confeccionadas a partir das amostras dos serpentinitos coletados, mostraram diferentes graus de serpentinização (Figura 30).

Figura 30 - Petrografias dos serpentinitos de Buenos Aires – PE (A-B) e Niquelândia -GO (C-D). (B) Detalhes em cristais de piroxênio (Px), anfibólios euédricos (Anf) e passagens de Px para Anf (Px-Anf). (D) Serpentinita com textura de alteração em forma de fibras que atravessam o mineral original, formando um padrão em rede.



O serpentinito formador do Neossolo de Buenos Aires foi composto principalmente (65,0 %) por cristais finos a médios de piroxênio distribuídos em diferentes direções no formato

prismático. Junto a eles, ocorreram em distribuição heterogênea, minerais opacos e óxidos de ferro. Os piroxênios presentes fazem parte da série clinoenstatita-clinoferrosilita. Considerando que a rocha é ferrífera, o mineral esperado é de clinohiperstênio a clinoferrossilita (DEER; HOWIE; ZUZMANN, 1966; SCHMID et al., 2004). Boa parte dos piroxênios (40,0 %) sofreu alteração para anfibólios da série cummingtonita-grunerita podendo ser encontrados ainda em coloração esverdeada ou incolores (Figuras 30A-B). Para o serpentinito formador do Cambissolo da Niquelândia foi observada maior homogeneidade do material, onde constatouse a presença de serpentina e uma textura com padrão de rede de fibras, que atravessam massas foscas do mineral original com alguns preenchimentos de cor laranja aderidos às laterais (Figuras 30C-D).

Os difratogramas da fração argila analisada por orientação em lâminas apontaram diversidade entre os solos e nas fases dos minerais, apresentando minerais primários como hornblenda; filossilicatos como caulinita, talco, clorita e esmectita; e oxi-hidróxidos de ferro, como goethita, hematita, magnetita e maghemita (Figura 31). Alguns picos observados nas lâminas saturadas com Mg, apresentaram expansividade após solvatação com etilenoglicol, atingindo d = 1,78 (ação característica de minerais do grupo da esmectita) (DIXON, 1985; MOORE; REYNOLDS, 1997).

A elevada presença de minerais primários para o Neossolo de Buenos Aires é incomum em solos tropicais, mas foram muito descritas em ambientes ultramáficos indicando herança do material parental e menor grau de intemperismo do solo (VIDAL-TORRADO et al., 2006; GARNIER et al., 2009). Para a amostra de argila referente ao solo da Niquelândia, foi observada a presença de caulinita com picos de difração de 0,35 e 0,72 nm que colapsaram após aquecimentos a 350 e 550 °C (Figura 31B). A argila caulinítica, a ausência de picos de minerais primários e a forte presença de óxidos de ferro (goethita e hematita) no Cambissolo da Niquelândia confirma o grau mais avançado do intemperismo em relação ao Neossolo de Buenos Aires. A caulinita pode ter sido formada pela liberação de Si de filossilicatos como cloritas e de argilominerais 2:1 (esmectita), se recombinando com hidróxidos de Al precipitados (VIDAL-TORRADO et al., 2006).

As altas susceptibilidades magnéticas descritas para os solos são explicadas pela presença de óxidos de ferro com magnetismo, como por exemplo, magnetita (Fe₃O₄) e maghemita (γ -Fe₂O₃). Os arranjos dos íons Fe²⁺ e Fe³⁺ nas folhas tetraedrais e octaedrais destes minerais ocasionam um desequilíbrio de cargas elétricas, e a diferença de valência provoca uma polarização magnética na estrutura cristalina (ZUBKO et al., 2011; WINSETT et al., 2019). Além disso, as texturas franca e franco argilosa dos solos são reflexo principalmente da

quantidade de argilominerais presentes e da fragmentação de alguns minerais em partículas do tamanho silte, devido ao intemperismo químico intensificado nas áreas de estudo por taxas médias de precipitação anual acima de 1000,0 mm (INMET, 2021; APAC, 2022).

Figura 31 - (A) Drx na forma de microagregados orientados sobre lâmina de vidro da argila total no solo ultramáfico de Buenos Aires – PE; (B) Drx na forma de microagregados orientados sobre lâmina de vidro da argila total no solo ultramáfico da Niquelândia – GO. (C) Difratogramas não-orientados da fração argila após concentração dos óxi-hidróxidos de ferro.



(A-B) Amostras saturadas com potássio e aquecidas às temperaturas de 25, 110, 350 e 550 °C e saturada com magnésio e etileno glicol. Ch = clorita; Sm = esmectita; K = caulinita; Hb = hornblenda; Tc = talco; Fd = feldspato; Mh/Mt = maghemita/magnetita; Gh = goethita; Hm = hematita.

5.3.2 Teores totais e disponíveis de Co, Cr e Ni nos solos ultramáficos

Os valores médios dos teores totais dos metais para os solos da Niquelândia e Buenos Aires foram (mg kg⁻¹): Co (373,5 e 349,2); Cr (1844,5 e 2485,5); e Ni (9597,5 e 1428,5), respectivamente. Para os teores disponíveis, os metais seguiram a seguinte ordem decrescente: Ni (220,9 – 66,1 mg kg⁻¹) > Co (2,4 – 1,0 mg kg⁻¹) > Cr (< LD) (Figura 32A-C). Os teores disponíveis e totais dos metais foram semelhantes nos dois solos, com exceção do Ni, aonde foram de quatro a seis vezes maiores na Niquelândia em relação a Buenos Aires (Figura 32C). Todos os metais apresentaram baixas proporções de disponibilidade relativa quando comparados com seus respectivos teores totais, sendo 0,0 % para Cr (< LD), 0,6 % para Co e 3,5 % para Ni. Contudo, as baixas proporções disponíveis descritas para Ni quando avaliadas em valores absolutos (mg kg⁻¹), superam de dezenas a centenas de vezes a disponibilidade (< 1,0 mg kg⁻¹) e o valor de background (29,0 mg kg⁻¹) relatados para solos "normais" no mundo (REVOREDO; MELO, 2006; MENDES et al., 2010; KABATA-PENDIAS, 2011).

Apesar das rochas ultramáficas conterem normalmente menos que 1,0 % de Ni, as concentrações nos solos são aumentadas significativamente durante o intemperismo. O intemperismo químico dessas rochas (ígneas e metamórficas) sob clima tropical, tende a formar filossilicatos ricos em Mg, como talco, cloritas e esmectitas onde pode ocorrer substituição isomórfica do Mg por Ni, originando minerais enriquecidos por este metal (GARNIER et al., 2009). Por isso, a alta ocorrência do Ni em minerais primários como olivina, piroxênios e anfibólios e argilominerais 2:1, como esmectitas, são responsáveis pelos teores totais e disponíveis anômalos nos solos e indicam o aporte contínuo do metal (VITHANAGE et al., 2014; KIERCZAK et al., 2016). Já as baixas disponibilidades encontradas para Co e Cr estão relacionadas com a ocorrência destes metais em minerais mais resistentes ao intemperismo, como espinélio, magnetita e cromita, ou à adsorção por óxihidróxidos de ferro e manganês que ocorrem em abundância nestes ambientes (GARNIER et al., 2013; VITHANAGE et al., 2014; ERTANI et al., 2017).

Os teores totais e disponíveis de Co, Cr e Ni também foram comparados com outros solos ultramáficos do mundo. Para isso, foram considerados 68 resultados de estudos realizados em 13 países (Figura 32D-I). Os teores totais de Co nos solos da Niquelândia e Buenos Aires superaram em média 65,0 % a mediana mundial (216,0 mg kg⁻¹). Já os teores disponíveis do metal, em ambos os solos, foram similares à mediana descrita nos outros estudos (1,8 mg kg⁻¹). O mesmo padrão de similaridade entre os teores totais e disponíveis foram observados para Cr, com medianas mundiais de 2400,0 e 0,3 mg kg⁻¹, respectivamente. Para Ni, os teores totais e disponíveis no Neossolo de Buenos Aires foram próximos aos valores descritos para o mundo

 $(2039,0 \text{ mg kg}^{-1} \text{ de teor total e 52,5 mg kg}^{-1} \text{ disponível})$. Contudo, o Cambissolo da Niquelândia, apresentou teor disponível de Ni 419,0 % acima da mediana mundial, e o teor total 470,0 % superior, sendo considerado um outlier entre os solos ultramáficos do planeta (Figura 32F).

Figura 32 - Teores totais e disponíveis de Co (A), Cr (B) e Ni (C) nos solos estudados. Gráficos de violino indicando a distribuição média dos teores totais (D-F) e disponíveis (G-I) de Co, Cr e Ni em solos ultramáficos ao redor do mundo (VITHANAGE et al., 2019). As linhas tracejadas representam os teores totais (vermelho) e disponíveis (azul) de metais para Niquelândia - GO (Niq) e Buenos Aires - PE (BA) em comparação com a mediana mundial.



A maioria dos estudos em ambientes ultramáficos são realizados em países temperados, com ocorrência de solos pouco desenvolvidos. Na Niquelândia, o regime hídrico de chuvas é

intenso durante 6 meses (> 200,0 mm mês⁻¹), provocando maior hidrólise, e consequentemente, gerando solos mais profundos e com altas quantidades de óxidos de Fe que são os principais sumidouros de Ni nesses ambientes (THORNE et al., 2012; VAN DER ENT et al., 2018).

5.3.3 Riscos ambientais

5.3.3.1 Geoquímica de Co, Cr e Ni em solos ultramáficos

Dados sobre teores totais de metais são úteis para avaliar níveis de contaminação ambiental, porém não fornecem informações sobre mobilidade e biodisponibilidade dos contaminantes. Nesse sentido, a análise de extração sequencial avalia a distribuição dos metais nas diferentes frações do solo, possibilitando uma investigação mais precisa sobre potenciais riscos ecotoxicológicos (CHENG et al., 2011; VITHANAGE et al., 2019). O intemperismo de rochas ultramáficas em ambientes tropicais tende a formação de filossilicatos, seguindo para óxidos de Fe, Cr e Mn não cristalinos ("amorfos"), e por fim, em óxidos de Fe cristalinos (VAN DER ENT et al., 2017). Condições climáticas tropicais somadas a boa drenagem podem lixiviar bases como Mg e formar minerais secundários enriquecidos por Fe (óxidos), gerando solos lateríticos com camadas subsuperficiais ricas em oxi-hidróxidos de Fe, Mn e Mg (TASHAKOR; YAACOB; MOHAMAD, 2011). Por isso, as frações consideradas neste estudo foram: trocável, óxidos de Mn, óxidos de Fe amorfo, óxidos de Fe cristalino e residual. A fração matéria orgânica foi descartada devido à distribuição insignificante dos metais (< 0,1 %). A ordem decrescente das frações geoquímicas onde Co, Cr e Ni estão ligados foi: (1) Co: óxidos de Fe e Mn > residual > trocável, para os dois solos; (2) Cr: residual > óxidos de Fe e Mn > trocável, para os dois solos; e (3) Ni: óxidos de Fe e Mn > trocável > residual para Buenos Aires e residual > óxidos de Fe e Mn > trocável para Niquelândia (Figura 33).

O Ni no Neossolo de Buenos Aires, esteve associado principalmente aos óxidos de Fe (58,5 %) e Mn (21,9 %). Resultado similar foi relatado por Garnier et al. (2006), em solo ultramáfico brasileiro, com 50,0 a 85,0 % do metal retido nesta fração. Os óxi-hidróxidos de Fe são conhecidos por serem os principais sumidouros de Ni em ambientes ultramáficos devido às interações por pontes de hidrogênio, troca iônica e ligações de coordenação. Adicionalmente, o metal pode formar complexos estáveis com os grupos funcionais hidroxila e carboxila presentes nas superfícies dos óxidos, levando a retenção e imobilização do elemento (THORNE et al., 2012; VAN DER ENT et al., 2018). Em solos ultramáficos, além dos óxidos de Fe, o Ni pode estar associado a argilas de baixa carga (serpentina, talco) e alta carga (esmectita) (VAN DER ENT et al., 2019). Apesar das altas proporções de Ni em fases mais recalcitrantes, a fração

trocável foi reservatório de 11,3 % do metal, superando significativamente relatos de outros estudos pelo mundo (0,05 – 3,8 %) (QUANTIN et al., 2002; TASHAKOR; YAACOB; MOHAMAD, 2011; VAN DER ENT et al., 2019). A maior proporção trocável de Ni neste solo ocorre possivelmente devido à alta presença de minerais primários facilmente intemperizáveis como talco e hornblenda e maiores taxas de intemperismo pelo intenso regime de chuvas. Para o Cambissolo da Niquelândia, 72,3 % do Ni esteve associado à fração residual, enquanto os óxidos de Fe foram responsáveis por 21,6 %, seguidos por 4,9 % nos óxidos de Mn e apenas 1,2 % esteve na fração trocável. A mesma tendência foi observada em estudos com solos ultramáficos tropicais da Malásia e Nova Caledônia, sendo a fração residual o reservatório de 50,0 a 90,0 % do Ni (QUANTIN et al., 2002; TASHAKOR; YAACOB; MOHAMAD, 2011).



Figura 33 - Extração sequencial de Co, Cr e Ni nos solos ultramáficos.

Cromo esteve alocado principalmente à fração residual nos dois solos com proporções médias de 70,0 %. Já a presença do metal na fase trocável foi considerada insignificante, sendo 0,007 % na Niquelândia e 0,001 % em Buenos Aires. Os óxidos de ferro cristalino retiveram cerca de 27,0 % do metal. Portanto, o elemento não é prontamente biodisponível em condições naturais, refletindo os teores disponíveis encontrados neste estudo, abaixo do limite de

detecção. O Cr, em solos ultramáficos, é encontrado principalmente em minerais lentamente hidrolisados como a cromita (FeCr₂O₄) e a magnetita (Fe₃O₄), provocando acúmulo no solo com o avanço da pedogênese. A forte resistência da cromita ao intemperismo torna este mineral, traçador de processos pedogenéticos (GARNIER et al., 2009; VITHANAGE et al., 2019; GWENZI, 2020).

Para Co, os óxidos de Fe e Mn foram reservatórios importantes nos dois solos, principalmente em Buenos Aires, com retenções de 62,3 % e 27,8 % do metal, respectivamente. Cobalto é um elemento siderófilo que apresenta fortes associações com Fe e Mn, reforçando a baixa disponibilidade do metal no ambiente, apesar dos altos teores totais (MISTIKAWY et al., 2020). A alta afinidade entre Co e Mn é atribuída a características químicas semelhantes, visto que ambos são elementos de transição com massas atômicas e raios iônicos similares.

As maiores proporções relativas de Ni e Co nas frações trocáveis e em óxidos de Mn no Neossolo de Buenos Aires, sugerem a necessidade de maior atenção em relação ao Cambissolo da Niquelândia (mesmo com teores totais superiores). Além disso, a combinação destes resultados com os dados mineralógicos indica que a maior parte de Cr, Ni e Co, está ligada fortemente em minerais recalcitrantes dos solos ultramáficos como silicatos (clorita) e espinélios (magnetita e cromita). Contudo, mudanças redox do sistema podem mobilizar os metais ligados à fração de óxidos de Fe e Mn e a liberação destas fases pode se tornar uma importante fonte natural de contaminação.

5.3.3.2 Código de Avaliação de Risco (RAC)

A figura 6 mostra os resultados do RAC para Ni, Cr e Co nos dois solos ultramáficos estudados. A ordem decrescente do coeficiente de risco médio para cada metal foi Ni > Co > Cr. As amostras não apresentaram riscos ambientais para Co e Cr nos dois solos (< 1,0 %). Para Ni, foram encontrados riscos baixo para o solo da Niquelândia (1,1 %) e médio para o solo de Buenos Aires (13,0 %). Portanto, não houve mobilidade significativa para os metais pesados acima. A alta proporção de Ni na fração trocável no solo de Buenos Aires (Figura 34) foi responsável pelo maior RAC relativo encontrado. Os resultados de RAC refletem a análise de extração sequencial dos solos que indicaram alta presença dos metais em formas residuais (cromita e magnetita) ou adsorvidas em óxidos de Fe e Mn, reduzindo a mobilidade ambiental. Contudo, a variabilidade na composição mineralógica dos solos ultramáficos e das condições climáticas entre regiões estão diretamente relacionadas com taxas de intemperismo e consequentemente com a disponibilização dos metais. Por isso, apesar das baixas mobilidades

de Co, Cr e Ni descritas, manejos que aumentem a labilidade de metais de forma abrupta podem representar sérios problemas ao ecossistema.



5.3.4 Riscos ecológicos

5.3.4.1 Avaliação do risco ecológico em solos ultramáficos

O índice de risco ecológico potencial (PERI) foi desenvolvido pelo pesquisador sueco Hakanson em 1980 com o intuito de classificar poluições de solos e sedimentos por metais pesados, identificando áreas com prioridade de monitoramento (MAANAN et al., 2014; LIU et al., 2021). Os riscos ecológicos foram considerados elevado para o solo de Buenos Aires (PERI = 522,8) e significativamente elevado na Niquelândia (PERI = 1759,9) (Tabela 13). Os fatores de risco individuais dos metais seguiram a seguinte ordem decrescente: Ni > Co > Cr para a Niquelândia e Ni > Cr > Co em Buenos Aires. O Ni apresentou fatores de contaminação e risco individual de 5 a 75 vezes superiores aos de Co e Cr nos dois solos estudados e foi responsável por 89,0 e 95,0 % dos PERIs encontrados em Buenos Aires e Niquelândia, respectivamente. A alta contribuição do Ni para os elevados riscos ecológicos encontrados ocorre devido à elevada presença de minerais primários e secundários enriquecidos pelo metal e pouco resistentes ao intemperismo, como apresentado nas análises petrográficas e mineralógicas (Figuras 30 e 31). A localização de Ni nestes minerais ocasionou maior teor ambientalmente disponível médio para o metal (4011,6 mg kg⁻¹) quando comparado ao de Cr (694,3 mg kg⁻¹) e Co (125,7 mg kg⁻¹). O PERI da Niquelândia foi três vezes superior ao de Buenos Aires. Isto pode ser atribuído principalmente ao teor ambientalmente disponível de Ni na Niquelândia (7185,0 mg kg⁻¹) ser oito vezes maior que o de Buenos Aires (838,2 mg kg⁻¹). Os altos PERIs sugerem que as comunidades microbianas presentes nesses ambientes são adaptadas às condições metalíferas e que a erosão desses solos pode provocar danos a micro-organismos em outros locais.

Niquelândia						
	Co ^a	Cr	Ni	PERI		
Fator de contaminação do metal (fi)	33,4	11,0	334,1			
Fator de toxicidade do metal (Ti)	2,0	2,0	5,0			
Fator de risco ecológico individual (E _i)	66,9	22,1	1670,9	1759,9		
Buenos Aires						
	Co ^a	Cr	Ni	PERI		
Fator de contaminação do metal (fi)	12,2	15,9	93,1			
Fator de toxicidade do metal (Ti)	2,0	2,0	5,0			
Fator de risco ecológico individual (E _i)	25,3	31,9	465,6	522,8		

Tabela 13 - Risco ecológico integrado para os solos ultramáficos.

^aFator de toxicidade para Co foi considerado igual ao Cr devido a propriedades similares de toxidez e disponibilidade nos solos estudados (ATSDR, 2022).

5.3.4.2 Composição da comunidade bacteriana nos solos ultramáficos

Os teores anômalos de metais pesados tornam os solos ultramáficos ambientes com condições de estresses e alta pressão seletiva de organismos, gerando níveis altos de endemismo na macro, meso e microfauna e nas comunidades microbianas do solo (KITAGAMI; KAWAI; EKINO, 2021). Foi identificado um total de 20 filos para os dois solos avaliados, sendo eles: Elusimicrobiota, Entotheonellaeota, Desulfobacterota, Bdellovibrionota, WPS-2, Patescibacteria. Armatimonadota, Cyanobacteria, Bacteroidota, Methylomirabilota, Crenarchaeota, Firmicutes. Gemmatimonadota, Myxococcota, Verrucomicrobiota, Chloroflexi, Planctomycetota, Proteobacteria, Acidobacteriota e Actinobacteriota (Figura 35).

Os filos dominantes para o Cambissolo da Niquelândia foram: Actinobacteriota (27,2 %) > Proteobacteria (20,9 %) > Cyanobacteria (8,5 %) > Acidobacteriota (8,1 %) > Gemmatimonadota (7,0 %). Para o Neossolo de Buenos Aires, a dominância filogenética seguiu a seguinte ordem decrescente: Actinobacteriota (32,0 %) > Acidobacteriota (13,8 %) > Proteobacteria (12,5 %) > Planctomycetota (12,0 %) > Chloroflexi (9,9 %). Os filos Actinobacteriota, Proteobacteria e Acidobacteriota foram abundantes em ambos os solos. Dose

de ácido cítrico (40 mmol kg⁻¹) foi aplicada nos solos ultramáficos para avaliar a comunidade bacteriana após mudanças abruptas de pH e aumentos significativos na disponibilidade de Co, Cr e Ni.





BA Solo ultramáfico de Buenos Aires – PE; Niq Solo ultramáfico da Niquelândia – GO.

Os teores disponíveis de Ni aumentaram em 87,0 % (412,8 mg kg⁻¹) na Niquelândia e 277,0 % (260,9 mg kg⁻¹) em Buenos Aires, após aplicação do quelante. Para Cr e Co, em ambos os solos, os incrementos da disponibilidade foram em média de 12 vezes, atingindo teores disponíveis de 3,0 e 13,0 mg kg⁻¹, respectivamente. Já o pH dos solos, reduziu drasticamente após 2 dias de aplicação do ácido cítrico, alcançando 5,4 (Niquelândia) e 4,9 (Buenos Aires), com retorno à condição inicial após 40 dias da aplicação. De forma geral, a aplicação do ácido cítrico reduziu a abundância relativa bacteriana em 22,5 % para Buenos Aires e 59,6 % para Niquelândia. O maior efeito negativo na Niquelândia pode ser atribuído aos maiores teores disponíveis relativos de metais encontrados pós aplicação do quelante. Nenhum efeito significativo foi observado para os índices de diversidade e equitabilidade.

As modificações na disponibilidade dos metais afetaram significativamente a abundância em Actinobacteriota, Acidobacteriota, Planctomycetota, Chloroflexi e Cyanobacteria, com reduções médias de 52,2 %, 66,9 %, 70,3 %, 81,5 % e 88,1 %, respectivamente. Já os filos Verrucomicrobiota, Myxococcota e Gemmatimonadota, apresentaram abundâncias constantes mesmo diante das variações de pH e teores dos metais. Em contrapartida, as abundâncias relativas dos filos Proteobacteria, Bacteroidota e Firmicutes foram incrementadas em 256,7 %, 1117,3 % e 2105,0 %, respectivamente. Estudos com amostras de água, solo e sedimento enriquecidos por Ni e Co coletados no Brasil, no município da Niquelândia, indicaram a presença das espécies Acinetobacter baumannii, Acinetobacter ursingii, Acinetobacter sp., Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus cereus, Bacillus methylotrophicus, Exiguobacterium sp., Microbacterium sp. e Ochrobactrum sp. Estas espécies são pertencentes aos principais filos descritos neste estudo (Proteobacteria, Actinobacteriota, Acidobacteriota, Firmicutes e Bacteroidota), indicando um padrão da ocorrência e tolerância às altas concentrações de metais no ambiente (ARAÚJO et al., 2019; SAÊTA et al., 2021). Adicionalmente, estudo realizado na Nigéria em águas residuais poluídas industrialmente por Co e Ni, indicaram degradação eficiente (> 94 %) de hidrocarbonetos aromáticos por Bacillus subtilis (Firmicutes), além da alta resistência aos teores elevados dos metais (OYETIBO et al., 2017).

A alta tolerância existente em alguns filos bacterianos pode estar relacionada a mecanismos das espécies como exclusão por barreiras de permeabilidade, sequestro intracelular e extracelular, bombas de efluxo que removem os metais das células, produção de proteínas de ligação a metais, desintoxicação enzimática do metal para formas menos tóxicas e redução da sensibilidade ao metal nos alvos celulares, indicando alto potencial biotecnológico para remediação ambiental (OYETIBO et al., 2017; SAÊTA et al., 2021).

5.3.5 Bioacessibilidade gástrica, pulmonar e dermal de Co, Cr e Ni

Os teores bioacessíveis médios para os solos ultramáficos foram (mg kg⁻¹): 17,9 (Co), 0,2 (Cr) e 16,5 (Ni) para o cenário gástrico; 0,2 (Co), 0,02 (Cr) e 1,3 (Ni) para o cenário dermal; 134,5 (Co), 58,5 (Cr) e 402,0 (Ni) para o cenário pulmonar. Os teores bioacessíveis de Co, Cr e Ni foram até 78.000 vezes inferiores aos teores totais, indicando baixa solubilização dos metais durante as análises.

Tratando-se de frações bioacessíveis, os valores para os metais nos solos da Niquelândia e Buenos Aires foram, respectivamente: 1,3 e 8,7 % (Co), 0,02 e 0,002 % (Cr), 0,1 e 1,3 % (Ni), para a abordagem gástrica; 0,002 e 0,1 % (Co), 0,001 e 0,0002 % (Cr), 0,001 e 0,1 % (Ni), para a abordagem dermal; 39,3 e 34,9 % (Co), 4,6 e 1,3 % (Cr), 3,7 e 31,3 % (Ni), para a abordagem pulmonar (Figura 36). De forma geral, ambos os solos apresentaram baixas bioacessibilidades para os metais, com frações residuais médias de 57,6 % para Co, 97,0 % para Cr e 81,5 % para Ni. Os baixos valores de bioacessibilidade estão relacionados com a localização dos metais em frações mais recalcitrantes do solo, como óxidos de Fe e Mn e nas frações residuais na forma de minerais como cromita que são abundantes nesses ambientes e resistentes às soluções utilizadas para simulação gástrica, dermal e pulmonar (GARNIER et al., 2013; VITHANAGE et al., 2014; ERTANI et al., 2017).

As maiores bioacessibilidades (acima de 30,0 %) ocorreram para Co nos dois solos e Ni no solo de Buenos Aires apenas na abordagem pulmonar. Além disso, todos os metais apresentaram maior bioacessibilidade nesta fase, seguindo a seguinte ordem decrescente: pulmonar > gástrica > dermal. Isto pode ser atribuído ao tamanho de partícula considerado na abordagem de exposição por inalação ($\emptyset < 2,5 \mu m$) ser muito inferior ao usado nas abordagens gástrica e dermal ($\emptyset < 75,0 \mu m$). A maior área superficial específica em partículas menores, proporciona uma alta quantidade de sítios de adsorção. Adicionalmente, a maior presença de argila está diretamente relacionada com a atividade coloidal e a quantidade de cargas elétricas que podem reter os metais catiônicos, e consequentemente enriquecer as partículas dos solos (UCHIMIYA et al., 2011; IKEGAMI et al., 2014).

Comparando as abordagens gástricas e dermais onde utilizou-se o mesmo tamanho de partícula dos solos ultramáficos, foi possível observar que todos os elementos apresentaram maior bioacessibilidade na fase gástrica. Os teores bioacessíveis gástricos foram de 8 a 600 vezes maiores que os dermais. Isto ocorre devido ao pH da solução gástrica, que simula a condição estomacal, muito ácida (1,5), o que favorece a maior solubilidade dos metais em relação ao pH do suor sintético utilizado na abordagem dermal (6,5) (ABUHELWA et al., 2017; HUANG et al., 2018; LEAL; GUNEY; ZAGURY, 2018).



Figura 36 - Bioacessibilidade gástrica, pulmonar e dermal de Co, Cr e Ni nos solos ultramáficos estudados.

5.3.6 Riscos à saúde humana

5.3.6.1 Risco à saúde humana por exposição a solos ultramáficos

As principais vias de exposição aos solos ultramáficos foram: ingestão > dermal > inalação. Os valores das doses médias diárias acidentais (ADI) por ingestão superaram em 34 e 8.000 vezes as ADIs por contato dérmico e inalação, respectivamente. Além disso, o Ni foi o metal com as maiores ADIs encontradas, seguido por Cr e cobalto. Normalmente, avaliações de riscos indicam a ingestão de partículas como a principal contribuinte (acima de 80,0 %) para os efeitos carcinogênicos e não-carcinogênicos por exposição a solos e sedimentos (MEN et al., 2018; SKRBIC et al., 2018). A avaliação dos riscos não-carcinogênicos indicou que apesar dos maiores valores de ADI serem para Ni, o Cr foi o metal responsável pela maior proporção dos índices de perigo (HI) encontrados (45,0 - 60,0 %) (Figura 37A). Isto ocorre devido aos altos teores totais de Cr nos solos e por suas doses de referência serem menores que as de Ni e cobalto, resultando em maiores valores de HI. Além disso, os riscos não-carcinogênicos estimados sem a utilização da bioacessibilidade foram inaceitáveis (TEHI > 1,0) para os dois solos estudados, sendo 1,69 para Niquelândia e 1,71 em Buenos Aires. Contudo, quando os teores bioacessíveis foram considerados na modelagem, os riscos não-carcinogênicos

reduziram em 183 vezes para o solo da Niquelândia (TEHI = 0,01) e em 32 vezes para o solo de Buenos Aires (TEHI = 0,05), sendo de 20 a 100 vezes inferiores ao limite aceitável (TEHI = 1,0). O mesmo padrão de superestimação ocorreu para os riscos totais de câncer (TCRI), onde ambos os solos apresentaram níveis inaceitáveis (> $1,0 \times 10^{-4}$) quando os teores totais dos metais foram considerados. Porém, após o uso da bioacessibilidade, os valores foram reduzidos em 4.000 vezes para Niquelândia (TCRI = $1,2 \times 10^{-7}$) e 23.000 para Buenos Aires (TCRI = $2,7 \times 10^{-8}$), sendo considerados seguros (Figura 37B).

Figura 37 - (A) Valores médios do índice de risco não carcinogênico por ingestão, inalação e contato dérmico a Co, Cr e Ni nos solos ultramáficos; (B) Risco de câncer total por exposição a Co, Cr e Ni em solos ultramáficos.



Os heatmaps apresentam as doses diárias acidentais de ingestão, inalação e contato dérmico dos solos. Os riscos foram estimados considerando abordagens com e sem bioacessilbidade.

Os limites seguros estimados para exposição ao solo são atribuídos às formas não biodisponíveis de Ni, Cr e Co nos ambientes ultramáficos, e principalmente, à utilização da abordagem de bioacessibilidade para todas as rotas de exposição, indicando baixa preocupação com efeitos adversos à saúde humana e reforçando a importância do uso de teores bioacessíveis

em todas as modelagens de riscos, evitando superestimações e tomadas de decisões errôneas no gerenciamento ambiental.

5.3.6.2 Risco à saúde humana por consumo de vegetais

As concentrações médias de Co, Cr e Ni em *B. oleracea* foram de 3,2 mg kg⁻¹, 3,3 mg kg⁻¹ e 221,7 mg kg⁻¹, respectivamente. Para L. sativa L., os teores médios dos metais atingiram 1,65 mg kg⁻¹ (Co), 1,90 mg kg⁻¹ (Cr) e 132,2 mg kg⁻¹ (Ni). Os acúmulos de Co, Cr e Ni em B. oleracea foram de 63,0 a 576,0 % superiores aos de L. sativa L. (Figura 38). A alta disponibilidade relativa de Ni nos solos estudados $(66, 1 - 220.9 \text{ mg kg}^{-1})$ comparadas as de Co $(1,0-2,4 \text{ mg kg}^{-1})$ e Cr (< LD) é responsável pelo maior acúmulo encontrado para o metal. Esta tendência também foi observada comparando o efeito dos solos para o acúmulo de Ni em B. oleracea, que foi 212,0 % superior no solo da Niquelândia onde a disponibilidade do metal é quatro vezes maior que no solo de Buenos Aires (Figura 38C). Por outro lado, os teores de Cr e Co nas hortaliças foram baixos e não diferiram estatisticamente em relação ao fator solo, visto que ambos os solos possuem disponibilidades similares para estes metais. Além disso, B. oleracea possui maior biomassa, com produtividade média de 600,0 g de folhas por planta em relação a 370,6 g de folhas por planta de L. sativa L (MEIRELLES; BALDOTTO; BALDOTTO, 2017; MOURA et al., 2018). O volume de folhas é diretamente relacionado com maiores transpiração e absorção de água, e consequentemente, absorção de metais por fluxo de massa (ALFARO et al., 2021). O padrão de maior acúmulo em espécies folhosas como couve, mostarda, espinafre, chicória e alface também foi relatado em diversos estudos que compararam folhas, raízes, tubérculos e frutos de plantas crescidas sobre solos contaminados (FAN et al., 2017; PELFRÊNE et al., 2019; ZHENG et al., 2020; ALFARO et al., 2021).

Tratando-se do acúmulo radicular de metais, as espécies apresentaram os seguintes teores médios (mg kg⁻¹): 15,7 (Co), 49,1 (Cr) e 527,5 (Ni) para *B. oleracea* e 12,7 (Co), 20,6 (Cr) e 250,1 (Ni) para *L. sativa* L. Ambas as espécies apresentam teores relativamente altos de Cr nas raízes considerando que a disponibilidade do metal esteve abaixo do limite de detecção. Alfaro et al. (2021) relataram o mesmo padrão para absorção de Cr por *L. sativa* L. e atribuíram aos exsudados radiculares e às comunidades de micro-organismos rizosféricos capazes de liberar ácidos orgânicos de baixo peso molecular como o ácido cítrico e oxálico, aumentando a disponibilidade dos metais e consequentemente seus acúmulos. Os altos teores totais dos metais nos solos, a natureza não hiperacumuladora das espécies e o relativo alto acúmulo radicular geraram fatores de translocação e bioconcentração baixos (0,06 – 0,59). Contudo, as concentrações foliares de Ni descritas foram preocupantes, por se tratar de um micronutriente

e pelas espécies alimentícias normalmente apresentarem teores do metal entre 0,06 e 2,0 mg kg⁻¹ (KABATA-PENDIAS, 2011). Nesse sentido, os riscos não-carcinogênicos e carcinogênicos aos seres humanos por ingestão das hortaliças foram estimados.



Figura 38 - Concentrações médias (± desvio padrão) de Co, Cr e Ni (A-C) e heatmap dos fatores de bioconcentração (BCF) e translocação (TF) nas hortaliças cultivadas em solos ultramáficos (D).

As concentrações de Co foram analisadas separadamente. Para Ni e Cr, o efeito da interação (solo x espécie) foi considerado. Letras maiúsculas iguais comparam as diferentes espécies no mesmo solo e não diferem pelo teste Tukey ($p \le 0,05$). Letras minúsculas iguais comparam as mesmas espécies em solos diferentes e não diferem pelo teste Tukey ($p \le 0,05$).

As ingestões médias diárias de Co, Cr e Ni pelo consumo dos vegetais, variaram entre 0,9 - 4,1, 0,4 - 4,0 e 113,2 - 386,9 mg kg⁻¹, respectivamente. De forma geral, os teores de Co, Cr e Ni nas plantas ultrapassaram de 3 a 1220 vezes os limites máximos permitidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA) em *L. sativa* L e *B. oleracea* (< 0,3 mg kg⁻¹) (ANVISA, 2021). Considerando parâmetros internacionais, os valores de ingestão diária para Co e Cr foram próximos as doses máximas toleráveis estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde e pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (2,5 mg kg⁻¹ dia⁻¹) (ALFARO et al., 2021). Porém, para Ni, a dose máxima tolerável (5 mg kg⁻¹ dia⁻¹) foi superada de 22 vezes por ingestão de *L. sativa* L até 77 vezes para o consumo de *B. oleracea*.

Os valores médios dos índices de perigo (HI) seguiram a ordem Ni > Cr > Co. Tanto os valores de HI individuais quanto o efeito sinérgico dos metais (TEHI) foram menores que o limite inaceitável (> 1,0), indicando baixa probabilidade de efeito adverso à saúde humana (Figura 11A). Entretanto, as estimativas de riscos totais de câncer (TCRI) indicaram valores inaceitáveis para ambas as espécies, superando entre 44 e 82 vezes o nível de segurança (< 10^{-4}). Apesar dos menores riscos encontrados para *L. sativa* L em relação a *B. oleracea*, o consumo para ambas as espécies cultivadas em solos ultramáficos não é recomendado.

Figura 39 - (A) Valores médios dos índices de risco não carcinogênico (A) e carcinogênico (B) por consumo de *B. oleracea* e *L. sativa L.* cultivadas em solos ultramáficos.



5.4 Conclusão

Os teores de Ni, Co e Cr descritos neste estudo, reforçam a necessidade de monitoramento de áreas ultramáficas quanto à mobilidade e disponibilidade de metais no solo para garantir a segurança alimentar e a saúde humana. Os altos teores de óxidos de ferro e manganês nos solos são responsáveis pela baixa mobilidade dos metais. Contudo, riscos ecológicos significativamente elevados indicam danos potenciais a organismos em outras regiões. Adicionalmente, manejos do solo que provoquem erosão e aumento da disponibilidade de metais afeta a comunidade bacteriana do solo a longo prazo. Espécies dos filos Proteobacteria, Bacteroidota e Firmicutes podem ser ferramentas biotecnológicas interessantes para a remediação de áreas contaminadas. Avaliações de riscos à saúde humana devem estar associadas a testes de bioacessibilidades para todos os metais e em todas as rotas de exposição consideradas para evitar superestimação das estimativas. Além disso, a exposição ocupacional desses ambientes deve ser reduzida e cultivos alimentícios evitados.

Referências bibliográficas

ABUHELWA, A. Y.; WILLIAMS, D. B.; UPTON, R. N.; FOSTER, D. J. R. Food, gastrointestinal pH, and models of oral drug absorption. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 112, p. 234-248, 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.11.034.

ALFARO, M.R.; UGARTE, O.M.; LIMA, L.H.V.; SILVA, J.R.; SILVA, F.B.V.; LINS, S.A.S, NASCIMENTO, C.W.A. Risk assessment of heavy metals in soils and edible parts of vegetables grown on sites contaminated by an abandoned steel plant in Havana. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 44, p. 43-56, 2021. <u>https://doi.org/10.1007/s10653-021-01092-w</u>.

ALVAREZ, J. R. E.; MONTERO, A. A.; JIMÉNEZ, N. H.; MUÑIZ, U. O.; PADILLA, A. R.; MOLINA, R. J.; VERA, S. Q. de. Nuclear and related analytical methods applied to the determination Cr, Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in a red ferralitic soil and Sorghum samples. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 247, n. 3, p. 479-486, 2001. https://link.springer.com/article/10.1023/A:1010640009301.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2021). **INSTRUÇÃO NORMATIVA** - **IN N° 88**, DE 26 DE MARÇO DE 2021 Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. <u>https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-88-de-26-de-marco-de-2021-311655598</u>.

APAC - Agência Pernambucana de Águas e Clima. **Monitoramento pluviométrico**, 2022. <u>http://old.apac.pe.gov.br/meteorologia/monitoramento-pluvio.php</u>.

ARAÚJO, A. C. M.; MARINHO, P. H. O.; DEL AQUILA HOFFMANN, N. K. S. Avaliação do potencial de biorremediação de níquel por bactérias isoladas de área de mineração. In: 30° **Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Natal, Brasil, ABES, 2019.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005. Toxicological profile for Nickel. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. <u>https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp15.pdf.</u>

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2012. Toxicological profile for Chromium. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. <u>https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp7.pdf.</u>

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2022. **Substance Priority List**. <u>https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2022spl</u>.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2023. Toxicological Profile for Cobalt (Draft for Public Comment). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp33.pdf.

BERNARDINO, C.A.R.; MAHLER, C.F.; SILVA, E.F.; NOVO, L.A.B. Fitotecnologias: situação atual e perspectivas futuras. **Acta Brasiliensis**, v. 2, p. 63-68, 2018. <u>https://doi.org/10.22571/2526-433877</u>. BROWN, G.; BRINDLEY, G.W. X-ray Diffraction Procedures for clay mineral Identification. In: BRINDLEY, G.W; BROWN, G. London: **Mineralogical Society**, chapter 5, p.305-360, 1980. <u>https://doi.org/10.1180/mono-5.5</u>.

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016. <u>https://doi.org/10.1038/nmeth.3869</u>.

CEMPEL, M.; NIKEL, G. Nickel: A Review of Its Sources and Environmental Toxicology. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, p. 375-382, 2006. <u>http://www.pjoes.com/Nickel-A-Review-of-Its-Sources-and-Environmental-Toxicology,87881,0,2.html</u>.

CEN - European Committee for Standardization, 2015. Reference test method for release of nickel from all post assemblies which are inserted into pierced parts of the human body and articles intended to come into direct and prolonged contact with the skin. **EN 1811:2015**. <u>https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/41a5da69-b1e3-43b5-ae8d-89b8f0688f1a/en-1811-2011a1-2015</u>.

CHEN, H.; TENG, Y.; LU, S.; WANG, Y.; WU, J.; WANG, J. Source apportionment and health risk assessment of trace metals in surface soils of Beijing metropolitan, China. **Chemosphere**, v. 144, p. 1002–1011, 2016. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.081.

CHENG, C.H.; JIEN, S.H.; IIZUKA, Y.; TSAI, H.; CHANG, Y.; HSEU, Z. Pedogenic Chromium and Nickel Partitioning in Serpentine Soils along a Toposequence. **Soil Science Society of America Journal**, v. 75, p. 659-668, 2011. <u>https://doi.org/10.2136/sssaj2010.0007</u>.

COPAM - Conselho Estadual de Política Ambiental. **Deliberação Normativa COPAM nº 166 de 2011**. Limites de concentração de contaminantes no solo e água subterrânea, 2011. <u>https://geosam.com.br/copam-166-valores-referencia-qualidade-solos/</u>.

CPRH - AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE. **Instrução Normativa CPRH n. 007/2014**, n. 244, p. 13, 2014. <u>http://www.jusbrasil.com.br/diarios/82838343/doepe-31-12-2014-pg-13/pdfView</u>.

DEER W.A.; HOWIE, R.A.; ZUZMANN, J. Minerais constituintes das rochas - uma introdução. **Fundação Calouste Gulbenkian**, 727p, 1966. <u>https://minerva.ufrj.br/F/?func=direct&doc_number=000639839&local_base=UFR01.</u>

DIXON, J. B. Kaolin and Serpentine Group Minerals. In: Minerals in Soil Environments Second Edition, DIXON, J.B; WEED, S.B. **Soil Science Society of America**, Inc. 1985, p. 467.

ERTANI, A.; MIETTO, A.; BORIN, M.; NARDI, S. Chromium in agricultural soils and crops: a review. **Water Air Soil Pollution**, v. 228, p.190, 2017. <u>https://doi.org/10.1007/s11270-017-3356-y</u>. FAN, Y.; LI, H.; XUE, Z.; ZHANG, Q.; CHENG, F. Accumulation characteristics and potential risk of heavy metals in soil-vegetable system under greenhouse cultivation condition in Northern China. **Ecological Engineering**, v. 102, p. 367–373, 2017.

GALEY, M.L.; VAN DER ENT, A.; IQBAL, M.C.M.; RAJAKARUNA, N. Ultramafic geoecology of South and Southeast Asia. **Botanical studies**, v. 58, p. 1-28, 2017. <u>https://doi.org/10.1186/s40529-017-0167-9</u>.

GARNIER, J.; QUANTIN, C.; MARTINS, E. S.; BECQUER, T. Solid speciation and availability of chromium in ultramafic soils from Niquelândia, Brazil, **Journal of Geochemical Exploration**, v. 88, p. 206-209, 2006. <u>https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2005.08.040</u>.

GARNIER, J.; QUANTIN, C.; GUIMARÃES, C.; GARG, V.K.; MARTINS, E.S.; BECQUER, T. Understanding the genesis of ultramafic soils and catena dynamics in Niquelândia, Brazil. **Geoderma**, v. 151, p. 204-214, 2009. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.04.020.

GARNIER, J.; QUANTIN, C.; GUIMARÃES, E.M.; VANTELON, D.; MONTARGES-PELLETIER, E.; BECQUER, T. Cr (VI) genesis and dynamics in Ferralsols developed from ultramafic rocks: The case of Niquelândia, Brazil. **Geoderma**, v. 193, p. 256-264, 2013. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.08.031</u>.

GWENZI, W. Occurrence, behaviour, and human exposure pathways and health risks of toxic geogenic contaminants in serpentinitic ultramafic geological environments (SUGEs): A medical geology perspective. **Science of The Total Environment**, v. 700, p. 1-16, 2020. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134622</u>.

HAKANSON, L. An ecological risk index for aquatic pollution control. A sedimentological approach. **Water Research**, v. 14, p. 975–1001, 1980. <u>https://doi.org/10.1016/0043-1354(80)90143-8</u>.

HAMMER, O.; HARPER, D.; RAYAN, P. D. Past: **Paleontological Statistics Software** Package for Education and Data Analysis. <u>https://www.nhm.uio.no/english/research/infrastructure/past/</u>.

HUANG, J.; GUO, S.; ZENG, G. M.; LI, F.; GU, Y.; SHI, Y.; SHI, L.; LIU, W.; PENG, S. A new exploration of health risk assessment quantification from sources of soil heavy metals under different land use. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 49-58, 2018. <u>https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.038</u>.

IBGE - Institudo Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. **Censo demográfico**. <u>https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/saude/9662-censo-demografico-2010.html?=&t=</u><u>destaques.</u>

IBGE - Institudo Brasileiro de Geografia e Estatística, 2020. **Pesquisa de orçamentos familiares 2017–2018: análise de consumo alimentar pessoal no Brasil**. https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101742.pdf. IKEGAMI, M.; YONEDA, M.; TSUJI, T.; BANNAI, O.; MORISAWA, S. Effect of Particle Size on Risk Assessment of Direct Soil Ingestion and Metals Adhered to Children's Hands at Playgrounds. **Risk Analysis**, v. 34, p. 1677-1687, 2014. <u>http://dx.doi.org/10.1111/risa.12215</u>.

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. **Estações Meteorológicas**, 2021. <u>https://mapas.inmet.gov.br/</u>.

JACKSON, M.L. **Soil chemical analysis: advanced course**. Madison, University of Wisconsin, 1969. 894p. <u>https://worldcat.org/pt/title/1127712461</u>.

JACKSON, M. L. **Soil chemical analysis: advance Course**. 29. ed. Madison, 1975. 895 p. <u>https://worldcat.org/pt/title/4478948</u>.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, A. K. **Trace elements in soils and plants**, 4th edn. CRC, Ann Arbor, MI, USA, 2011. <u>https://doi.org/10.1201/b10158</u>.

KÄMPF, N.; SCHWERTMANN, U. The 5 M-NaOH concentration treatment for iron oxides in soils. **Clays and Clay Minerals**, v. 30, p. 401-408, 1982. <u>https://doi.org/10.1346/CCMN.1982.0300601</u>.

KANELLOPOULOS, C. Influence of ultramafic rocks and hot springs with travertine depositions on geochemical composition and baseline of soils. Application to eastern central Greece. **Geoderma** v. 380, p. 1146-1149, 2020. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114649.

KIERCZAK, J.; PIETRANIK, A.; PEDZIWIATR, A. Ultramafic geoecosystems as a natural source of Ni, Cr, and Co to the environment: A review. **Science of The Total Environment**, v. 755, p.1-18, 2021. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142620</u>.

KITAGAMI, Y.; KAWAI, K.; EKINO, T. Soil physicochemical properties shape distinct nematode communities in serpentine ecosystems. **Pedobiologia - Journal of Soil Ecology**, v. 85, p. 1-8, 2021. <u>https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2021.150725</u>.

LEAL, L.T.C.; GUNEY, M.; ZAGURY, G.J. In vitro dermal bioaccessibility of selected metals in contaminated soil and mine tailings and human health risk characterization. **Chemosphere**, v. 197, p. 42-49, 2018. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.008</u>.

LEINZ, V.; CAMPOS, J.E.S. **Guia para determinação de minerais**. 8.ed. São Paulo: Nacional, 1979. 149 p. <u>https://www.estantevirtual.com.br/lunalivros/viktor-leinz-joao-</u> <u>ernesto-de-souza-campos-guia-para-determinacao-de-minerais-</u> <u>3655944121?show_suggestion=0</u>.

LELEYTER, L.; PROBST, J. A New Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Elements in River Sediments. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 73, p. 109-128, 1999. <u>https://doi.org/10.1080/03067319908032656</u>.

LI, X.; GAO, Y.; ZHANG, M.; ZHANG, Y.; ZHOU, M.; PENG, L.; HE, A.; ZHANG, X.; YAN, X.; WANG, Y.; YU, H. In vitro lung and gastrointestinal bioaccessibility of potentially toxic metals in Pb-contaminated alkaline urban soil: The role of particle size fractions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, p. 1-11, 2020. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110151.

LIMA, L.H.V.; NASCIMENTO, C.W.A.; SILVA, F.B.V.; ARAÚJO, P.R.M. Baseline concentrations, source apportionment, and probabilistic risk assessment of heavy metals in urban street dust in Northeast Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 858, p. 1-15, 2023. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022159750</u>.

LINDSAY, W.L.; NORVELL, W.A. Development of a DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese, and Copper. **Soil Science Society of America Journal**, v. 42, p. 421-428, 1978. https://doi.org/10.2136/sssaj1978.03615995004200030009x.

LIU, D.; WANG, J.; YU, H.; GAO, H.; XU, W. Evaluating ecological risks and tracking potential factors infuencing heavy metals in sediments in an urban river. **Environmental Sciences Europe**, v. 33, p. 1-13, 2021. <u>https://doi.org/10.1186/s12302-021-00487-x</u>.

MAANAN, M.; SADDIK, M.; MAANAN, M.; CHAIBI, M.; ASSOBHEI, O.; ZOURARAH, B. Environmental and ecological risk assessment of heavy metals in sediments of Nador lagoon, Morocco. **Ecological Indicators**, v. 48, 616-626, 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.09.034.

MAHURPAWAR, M. Effects of heavy metals on human health. **International Journal of Research**, p. 1-7, 2015. http://granthaalayah.com/Articles/Vol3Iss9SE/152_IJRG15_S09_152.pdf.

MEN, C.; LIU, R.; XU, F.; WANG, Q.; GUO, L.; SHEN, Z. Pollution characteristics, risk assessment, and source apportionment of heavy metals in road dust in Beijing, China. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 138-147, 2018. http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.123.

MENDES, A.M.S.; DUDA, G.P.; NASCIMENTO, C.W.A.; LIMA, J.A.G.; MEDEIROS, A.D.L. Acúmulo de metais pesados e alterações químicas em Cambissolo cultivado com meloeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p.791-796, 2010. https://doi.org/10.1590/S1415-43662010000800001.

MEIRELLES, A.F.M.; BALDOTTO, M.A.; BALDOTTO, L.E.B. Produtividade da alface (*Lactuca sativa* L.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas, em condições de campo. **Ceres**, v.64, p.553-556, 2017. <u>https://doi.org/10.1590/0034-737X201764050014</u>.

MIDANDER, K.; PAN, J.; WALLINDER, I. O.; LEYGRAF, C. Metal release from stainless steel particles in vitro—influence of particle size. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 9, p. 74-81, 2007. <u>https://doi.org/10.1039/b613919a</u>.

MISTIKAWY, J.A.; MACKOWIAK, T.J.; BUTLER, M.J.; MISCHENKO, I.C.; CERNAK, R.S.; RICHARDSON, J.B. Chromium, manganese, nickel, and cobalt mobility and bioavailability from mafic-to-ultramafic mine spoil weathering in western Massachusetts, USA. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 42, p. 3263-3279, 2020. https://doi.org/10.1007/s10653-020-00566-7.

MOORE, D. M.; REYNOLDS, R. C. X-ray diffraction and identification and analysis of clayminerais. **Oxford University Press**, 1989. 332 p. ISBN 0195087135. MOURA, C.S.; BISOGNIN, R.P.; SILVA, D.M.; GUERRA, D.; BIANCHETTO, R.; SOUZA, E.L. Produtividade de Brassica oleracea em sistema de transição orgânica no Sul do Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 13, p. 138-145, 2018. <u>https://doi.org/10.18378/rvads.v13i2.5462</u>.

MURPHY, C.P. Thin Section Preparation of Soils and Sediments. **AB Academic Publishing**, Berkhamsted, 149p, 1986.

NASCIMENTO, C. W. A.; HESTERBERG, D.; TAPPERO, R.; NICHOLAS, S.; SILVA, F. B. V. Citric acid-assisted accumulation of Ni and other metals by Odontarrhena muralis: Implications for phytoextraction and metal foliar distribution assessed by m-SXRF. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 1-9, 2020.https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114025.

NASCIMENTO, C.W.A.; LIMA, L.H.V.; SILVA, Y.A.J.B.; BIONDI, C.M. Ultramafic soils and nickel phytomining opportunities: A review. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.1, p.1-17, 2022. <u>https://doi.org/10.36783/18069657rbcs20210099</u>.

OYETIBO, G. O.; CHIEN, M.F.; IKEDA-OHTSUBO, W.; SUZUKI, H.; OBAYORI, O. S.; ADEBUSOYE, S. A.; ENDO, G. Biodegradation of crude oil and phenanthrene by heavy metal resistant Bacillus subtilis isolated from a multi-polluted industrial wastewater creek. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 120, p. 143-151 2017. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.02.021.

OZE, C.; FENDOR, S.; BIRD, D.K.; COLEMAN, R.G. Chromium Geochemistry of Serpentine Soils. **International Geology Review**, v. 46, p. 97-126, 2004. <u>https://doi.org/10.2747/0020-6814.46.2.97</u>.

PARDO, T.; RODRÍGUEZ-GARRIDO, B.; SAAD, R.F.; SOTO-VÁZQUEZ, J.; LOUREIRO-VINAS, M.; PRIETO-FERNANDEZ, A.; ECHEVARRIA, G.; BENIZRI, E.; KIDD, P.S. Assessing the agromining potential of Mediterranean nickel-hyperaccumulating plant species at field-scale in ultramafic soils under humid-temperate climate. **Science of the Total Environment**, v. 630, P. 275-286, 2018. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.229</u>.

PARKS, D. H.; BEIKO, R. G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, v. 26, n. 6, p. 715–721, 2010. <u>https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq041</u>.

PELFRÊNE, A.; SAHMER, K.; WATERLOT, C.; DOUAY, F. From environmental data acquisition to assessment of gardeners' exposure: Feedback in an urban context highly contaminated with metals. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 107–120, 2019. <u>https://doi.org/10.1007/s11356-018-3468-y</u>.

PENG, C.; CAI, Y.; WANG, T.; XIAO, R.; CHEN, W. Regional probabilistic risk assessment of heavy metals in different environmental media and land uses: an urbanization–affected drinking water supply area. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-9, 2016. <u>https://doi.org/10.1038/srep37084</u>.

PERIN, G.; CRABOLEDDA, L.; LUCCHESE, M.; CIRILLO, R.; DOTTA, L.; ZANETTE, M.L.; ORO, A. Heavy metal speciation in the sediments of Northern Adriatic sea – A new approach for environmental toxicity determination. In T. D. Lekkas (Ed.), **Heavy metal in the environment**, vol. 2 (pp. 454–456), 1985.

QUANTIN, C.; BECQUER, T.; ROUILLER, J.H.; BERTHELI, J. Redistribution of Metals in a New Caledonia Ferralsol After Microbial Weathering. **Soil Science Society of America Journal**, v. 66, p. 1797-1804, 2002. <u>https://doi.org/10.2136/sssaj2002.1797</u>.

QUAST, C. PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLOCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 590–596, 2013. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gks1219</u>.

RAIS - The Risk Assessment Information System (RAIS), 2018. RAIS **Chemical PRG Calculator**. <u>https://rais.ornl.gov/cgi-bin/prg/PRG_search?select=chem</u>.

RAMACHANDRA, T. V.; SUDARSHAN, P. B.; MAHESH, M. K.; VINAY, S. Spatial patterns of heavy metal accumulation in sediments and macrophytes of Bellandur wetland, Bangalore. **Journal of Environmental Management**, v. 206, p. 1204-1210, 2018. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.10.014.

REVOREDO, M.D.; MELO, W.J. Disponibilidade de níquel em solo tratado com lodo de esgoto e cultivado com sorgo. **Bragantia**, v. 65, p. 679-685, 2006. https://doi.org/10.1590/S0006-87052006000400019.

ROSENKRANZ, T.; HIPFINGER, C.; RIDARD, C.; PUSCHENREITER, M. A nickel phytomining trial using *Odontarrhena chalcidica* and *Noccaea goesingensis* on an Austrian serpentine soil. **Journal of Environmental Management**, v. 242, p. 522–528, 2019. https://doi.org/10.1016/j.envman.2019.04.073.

RUBY, M. V.; DAVIS, A.; SCHOOF, R.; EBERLE, S.; SELLSTONE, C. M. Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test. **Environmental science & technology**, v. 30, p. 422-430, 1996. <u>https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es950057z</u>.

SAÊTA, V.P.; GAMA, A.R.; OLIVEIRA, T.R.; SAIKI, P.T.O.; ROCHA, T.L.; CARNEIRO, L.C. Bactérias tolerantes a metais. **Research, Society and Development**, v. 10, p. 1-11, 2021. <u>http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15831</u>.

SCHMID, R.; FETTES, D.; HARTE, B.; DAVIS, E.; DESMONS, J. Recommendations by the IUGS Subcommission on the Systematics of Metamorphic Rocks, 1. **How to Name a Metamorphic Rock**, 2004. <u>https://www.ugr.es/~agcasco/personal/IUGS/pdf-IUGS/scmr_how_r4_Howtonameametamorphicrock.pdf</u>.
SHAHZAD, B.; TANVEER, M.; REHMAN, A.; CHEEMA S. A.; FAHAD, S.; REHMAN, S.; SHARMA, A. Nickel; whether toxic or essential for plants and environment - A review. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 132, p. 641-651, 2018. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.10.014.

SIDHU, G.P.S.; SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Appraising the role of environment friendly chelants in alleviating lead by *Coronopus didymus* from Pb-contaminated soils. **Chemosphere**, v. 182, p. 129–136, 2017. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.026.

SIEBECKER, M. G.; CHANEY, R. L.; SPARKS, D. L. Nickel speciation in several serpentine (ultramafic) topsoils via bulk synchrotron-based techniques. **Geoderma**, v. 298, p. 35-45, 2017. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.03.008</u>.

SiBCS – **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**, 2018. <u>https://www.embrapa.br/solos/sibcs</u>.

SINGH, B; GILKES, R. J. Concentration of iron oxides from clays by 5 M NaOH: the complete removal of sodalite and kaolin. **Clays Minerals**, Twickenham v.26, p.463-472, 1991. <u>https://doi.org/10.1180/claymin.1991.026.4.02</u>.

SKRBIC, B. D.; BULJOVCIC, M.; JOVANOVIC, G.; ANTIC, I. Seasonal, spatial variations and risk assessment of heavy elements in street dust from Novi Sad, Serbia. **Chemosphere**, v. 205, p. 452-462, 2018. <u>http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.124</u>.

TASHAKOR, M.; YAACOB, W.Z.W.; MOHAMAD, H. Speciation and Availability of Cr, Ni and Co IN Serpentine Soils of Ranau, Sabah. **American Journal of Geosciences**, v. 2, P. 4-9, 2011. <u>https://doi.org/10.3844/ajgsp.2011.4.9</u>.

TASHAKOR, M.; MODABBERI, S.; VAN DER ENT, A. Impacts of ultramafic outcrops in Peninsular Malaysia and Sabah on soil and water quality. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, 2018. <u>https://doi.org/10.1007/s10661-018-6668-5</u>.

TEIXEIRA, P.C.; DONAGEMMA, G.K.; FONTANAO, A.; TEIXEIRA, W.G. (2017). **Manual de métodos de análise do solo**. <u>http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1085209</u>.

THORNE, R.L.; ROBERTS, S.; HERRINGTON, R. Climate change and theformation of nickel laterite deposits. **Geology**, v. 40, p. 331-334, 2012. <u>https://doi.org/10.1130/G32549.1</u>.

UCHIMIYA, M.; KLASSON, K.T.; WARTELLE, L.H.; LIMA, I.M. Influence of soil properties on heavy metal sequestration by biochar amendment: 1. Copper sorption isotherms and the release of cations. **Chemosphere**, v. 82, p. 1431-1437, 2011. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.050.

USEPA - United States Environmental Protection Agency (1989). **Risk assessment guidance for Superfund, vol. I: human health evaluation manual**. Office of Solid Waste and Emergency Response. <u>EPA/540/1–89/002</u>.

USEPA - United States Environmental Protection Agency (1996). **Method 3050B: Acid Digestion of Sludges, Sediments, and Soils**, Revision 2. Washington DC. <u>https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/epa-3050b.pdf</u>.

USEPA - United States Environmental Protection Agency (1998). **SW-846 EPA method 3051A**. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. In: Test methods for evaluating solid waste, 3rd Update. Washington: US Environmental Protection Agency. <u>https://www.epa.gov/esam/us-epa-method-3051a-microwaveassisted-acid-digestion-</u> <u>sediments-sludges-and-oils</u>.

USEPA - United States Environmental Protection Agency (2001). **Risk assessment guidance for Superfund: volume III** — **part A**, process for conducting probabilistic risk assessment. Washington, D.C.:US Environmental Protection Agency. <u>EPA 540-R-02-002</u>.

USEPA - United States Environmental Protection Agency (2002). **Child specific exposure factors handbook**. Washington, DC: National Center for Environmental Assessment. <u>EPA-600-P-00-002B</u>.

VAN DER ENT, A. BAKER, A.J.M.; REEVES, R.D.; CHANEY, R.L.; ANDERSON, C.W.N.; MEECH, J.A.; ERSKINE, P.D.; SIMONNOT, M.O.; VAUGHAN, J.; MOREL, J.L. Agromining: farming for metals in the future? **Environmental Science & Technology**, v. 49, p. 4773–4780, 2015. <u>https://doi.org/10.1021/es506031</u>.

VAN DER ENT, A.; CARDACE, D.; TIBBETT, M.; ECHEVARRIA, G. Ecological implications of pedogenesis and geochemistry of ultramafic soils in Kinabalu Park (Malaysia). **Catena**, v. 160, p. 154-169, 2018. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.catena.2017.08.015</u>.

VAN DER ENT, A.; SPIERS, K. M.; BRUECKNER, D.; ECHEVARRIA, G.; AARTS, M. G. M.; MONTARGES-PELLETIER, E. Spatially-resolved localization and chemical speciation of nickel and zinc in Noccaea tymphaea and Bornmuellera emarginata. **Metallomics**, v. 11, p. 2052-2065, 2019. <u>https://doi.org/10.1039/c9mt00106a</u>.

VAN DER ENT, A.; NKRUMAH, P. N.; TIBBETT, M.; ECHEVARRIA, G. Evaluating soil extraction methods for chemical characterization of ultramafic soils in Kinabalu Park (Malaysia). Journal of Geochemical Exploration, v. 196, p. 235-246, 2019. https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2018.10.004.

VIDAL-TORRADO, P.; MACIAS, F.; CALVO, R.; CARVALHO, S.G.; SILVA, A.C. Gênese de solos derivados de rochas ultramáficas serpentinizadas no sudoeste de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 523-541, 2006. <u>https://doi.org/10.1590/S0100-06832006000300013</u>.

VILLEGAS, C.A.M.; GUNEY, M.; ZAGURY, G.J. Comparison of five artificial skin surface film liquids for assessing dermal bioaccessibility of metals in certified reference soils. **Science of the Total Environment**, v. 692, p. 595-601, 2019. https://doi.org/10.1016/j.scitoten.2019.07.281.

VITHANAGE, M.; RAJAPAKSHA, A.U.; OZE, C.; RAJAKARUNA, N.; DISSANAYAKE, C.B. Metal release from serpentine soils in Sri Lanka. **Environmental Monitoring and assessment**, v. 186, p. 3415-3429, 2014. <u>https://doi.org/10.1007/s10661-014-3626-8</u>.

VITHANAGE, M.; KUMARATHILAKA, P.; OZE, C.; KARUNATILAKE, S.; SENEVIRATNE, M.; HSEU, Z.; GUNARATHNE, V.; DASSANAYAKE, M.; OK, Y. S.; RINKLEBE, J. Occurrence and cycling of trace elements in ultramafic soils and their impacts on human health: A critical review. **Environment International**, v. 131, p. 1-17, 2019. <u>https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104974</u>.

WALRAVEN, N.; BAKKER, M.; VAN, B. J. H.; KLAVER, G. T.; MIDDLEBURG, J. J.; DAVIES, G. R. Factors controlling the oral bioaccessibility of anthropogenic Pb in polluted soils. **Science of the Total Environment**, v. 506, p. 149-163, 2015. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.118</u>.

WBG - World Bank Group. **Strategy for Fragility, Conflict, and Violence 2020–2025** (English). Washington, D.C.: World Bank Group. <u>http://documents.worldbank.org/curated/en/844591582815510521/World-Bank-Group-Strategy-for-Fragility-Conflict-and-Violence-2020-2025</u>.

WINSETT, J.; MOILANEN, A.; PAUDEL, K.; KAMALI, S.; DING, K.; CRIBB, W.; SEIFU, D.; NEUPANE, S. Quantitative determination of magnetite and maghemite in iron oxide nanoparticles using Mössbauer spectroscopy. **SN Applied Sciences**, v.1, p. 1-8, 2019. https://doi.org/10.1007/s42452-019-1699-2.

ZHENG, S.; WANG, Q.; YUAN, Y.; SUN, W. Human health risk assessment of heavy metals in soil and food crops in the Pearl River Delta urban agglomeration of China. **Food Chemistry**, v. 316, 2020. <u>https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126213</u>.

ZUBKO, P.; GARIGLIO, S.; GABAY, M.; GHOSEZ, P.; TRISCONE, J. Interface Physics in Complex Oxide Heterostructures. **Annual Review of Condensed Matter Physics**, v. 2, p. 141-165, 2011. <u>http://dx.doi.org/10.1146/annurev-conmatphys-062910-140445</u>.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O investimento em tecnologias portáteis para determinação de metais e o aperfeiçoamento de métodos com FRXp é uma opção economicamente e ambientalmente interessante à substituição de métodos convencionais como ICP-OES.

Investigações em herbários e áreas ultramáficas são fundamentais para identificação de espécies com alto potencial de utilização na agromineração.

A avaliação da distribuição espacial de metais em plantas pode auxiliar na produção de espécies hiperacumuladoras mais eficientes.

O uso de cultura de tecido, e estudos com sementes de hiperacumuladoras são necessários para aumentar a taxa de germinação e produzir mudas em larga escala e em curto espaço de tempo.

Testes com ácidos orgânicos, doses e períodos de aplicação devem ser realizados para identificar manejos mais eficientes e seguros no uso de quelantes para agromineração em solos ultramáficos.

Avaliações de riscos ambientais e à saúde humana são imprescindíveis em todas as áreas ultramáficas e os cultivo e consumo de alimentos nesses ambientes devem ser evitados.

Prospecção de bactérias em solos ultramáficos podem ser ferramentas biotecnológicas interessantes para a remediação de áreas contaminadas.

Estudos aquáticos e com biomagnificação no cenário ultramáfico ou próximos dessas localidades são necessários para a manutenção da qualidade ambiental e segurança alimentar.

Testes de campo com agromineração de Ni devem ser iniciados no Brasil.