

Avaliação da ecotoxicidade de mercúrio em três classes de solos tropicais utilizando ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas

Juan Pereira Colonese

Bolsista de Iniciação Científica, Engenharia Ambiental, UFRJ

Zuleica Carmen Castilhos

Orientadora, Farmacêutica, D. Sc.

Ricardo Gonçalves Cesar

Co-orientador, Geógrafo, M. Sc.

Luiz Carlos Bertolino

Co-orientador, Geólogo, D. Sc.

Resumo

O mercúrio (Hg) é um metal altamente tóxico e conhecido pela capacidade de causar sérios danos à saúde humana e ambiental. O presente trabalho propõe a avaliação da biodisponibilidade de Hg em três classes de solo tropicais, utilizando bioensaios com *Eisenia andrei*. Para tanto, amostras de Chernossolo, Latossolo Amarelo e Latossolo Vermelho foram contaminadas artificialmente em laboratório. Ensaios de toxicidade aguda, de comportamento, e de bioacumulação foram realizados para avaliação dos efeitos letais, comportamentais e incorporação de Hg pelos organismos. Os resultados dos testes comportamentais e de toxicidade aguda indicaram que as propriedades dos solos, associadas a forças biológicas, desempenharam papel fundamental nos mecanismos de biodisponibilidade, sendo o maior potencial tóxico atribuído ao Latossolo Amarelo. O ensaio de bioacumulação revelou que as oligoquetas foram capazes de bioacumular o contaminante, podendo ser utilizados como bioindicadores de poluição mercurial em solos.

INTRODUÇÃO

O mercúrio (Hg) é um metal altamente tóxico e amplamente conhecido pela capacidade de causar sérios danos à saúde humana e ambiental. As fontes de contaminação antropogênica estão usualmente relacionadas ao seu emprego na mineração, odontologia, indústrias soda-cloro, confecção de lâmpadas fluorescentes, produtos cosméticos, farmacêuticos, barômetros, termômetros e baterias recarregáveis (WHO, 1990). A toxicidade do Hg depende de sua forma química no ambiente. As formas inorgânicas possuem importância secundária quando comparadas à espécie química metilada (metilmercúrio - MeHg), uma vez que esta última provoca danos irreversíveis ao organismo, além de ser neurotóxica e teratogênica (WHO, 1990). Entretanto, é importante ressaltar que o Hg inorgânico corresponde à forma química capaz de ser biotransformada em MeHg.

A maior parte dos estudos geoambientais está baseada em análises químicas totais, extrações sequências, e/ou extrações seletivas de frações geoquímicas de elevado potencial de mobilidade e/ou biodisponibilidade. Contudo, embora extremamente importantes, essas abordagens analíticas não levam em consideração a ecotoxicidade e seus efeitos ao nível do ecossistema. Neste sentido, a abordagem ecotoxicológica pode complementar os resultados da geoquímica analítica através da investigação dos efeitos letais e sub-letais. Ainda, a determinação dos teores de contaminantes em tecidos de organismos expostos auxilia na confirmação das frações biodisponíveis usualmente identificadas/quantificadas por métodos consagrados em geoquímica.

No caso dos solos, os oligoquetas têm sido largamente utilizados como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos (Nahmani et al. 2007). Seu amplo emprego em bioensaios se justifica pelo simples cultivo em laboratório, ingerem grande quantidade de solo, representam até 92% da pedo-biomassa (quando presentes), servem de alimento para diversas espécies de animais (elo importante da cadeia trófica terrestre) e são extremamente sensíveis à presença de xenobiontes (Liu et al. 2005; Nahmani et al. 2007).

A resolução 420 do CONAMA (2009), que estabelece as diretrizes para qualidade de solos no Brasil, estipula para Hg valores de prevenção (0,5 mg/kg), intervenção agrícola (12 mg/kg), intervenção residencial (36 mg/kg) e intervenção industrial (72 mg/kg). No entanto, estes padrões não representam as diferenças inerentes à variedade espacial das ocorrências pedológicas brasileiras, bem como a influência das propriedades dos solos sobre os mecanismos de ecotoxicidade e biodisponibilidade, tornando extremamente importante a realização de estudos relacionados ao tema. O presente trabalho objetiva avaliar a ecotoxicidade de Hg em solos tropicais com características diversas, utilizando testes ecotoxicológicos com oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostragem e determinação do mercúrio total

Para realização deste estudo, foram estudados os latossolos amarelos, latossolos vermelhos e os chernossolos. O latossolo amarelo (Horizonte A) e latossolo vermelho (Horizonte A) foram coletados no município de Pinheiral (RJ) e Dourados (MS), respectivamente, pela equipe da EMBRAPA-Solos. O Chernossolo (Horizonte B) foi coletado no Rio de Janeiro (RJ), em parceria com o Departamento de Geologia da UFRJ. Em laboratório, os solos foram secos à temperatura ambiente, desagregados e peneirados a 10 malhas, para remoção de raízes e partículas maiores. Após essa etapa, procedeu-se com a contaminação dos solos a partir de uma solução mãe de 1000 mg/L (Merck). Após 24 horas de contaminação, os solos foram utilizados para os testes. A determinação do Hg total em amostras bióticas e abióticas foi efetuada por uma absorção atômica [(LUMEX (R A 915 +)]. Antes de serem analisados, os oligoquetas foram previamente congelados e liofilizados.

2.2 Testes de ecotoxicidade aguda

Os oligoquetas utilizados para a realização do teste de toxicidade foram cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia (LECOMIN) do CETEM. O ensaio de ecotoxicidade aguda foi realizado conforme os procedimentos propostos por ASTM (2004). Para tanto, o experimento foi executado com 200 gramas de solo e 10 organismos adultos de peso semelhante (para garantia de populações mais homogêneas) por réplica (três). Para o controle, foram preparados solos artificiais de acordo com as recomendações de Garcia (1994). Após 14 dias de testes, o número de organismos sobreviventes em cada réplica foi verificado. A estimativa da concentração de Hg em solos capaz de provocar a mortandade de 50% dos organismos (CL50) foi estimada com o emprego do software *Trimed Spearman Karben Method*. A seleção das concentrações de Hg a serem testadas foi baseada nos teores de intervenção agrícola (12 mg/kg), residencial (36 mg/kg) e industrial (72 mg/kg) estipulados pela Resolução 420 do CONAMA (2009). Dessa forma, testes exploratórios foram inicialmente executados com solos artificiais. De acordo com a CL50 obtida em solos artificiais, foram definidas as concentrações para contaminação dos solos naturais, para identificação e emprego de doses não letais.

2.2 Teste de toxicidade aguda com papel de contato

Estes ensaios foram executados conforme os procedimentos propostos por OECD (1984). O teste consiste na exposição de oligoquetas adultos a papéis de filtro umedecidos com uma solução de Hg, a fim de avaliar a biodisponibilidade potencial através de contato dérmico. O preparo das soluções-teste foi realizado por meio de diluição de padrão de 1000 mg/L de cloreto de Hg (Merck). O ensaio foi realizado com 10 réplicas, contendo um organismo. O experimento foi realizado na ausência de luz e à temperatura de 20 ± 2 °C. O papel de filtro (5 x 10 cm²) foi umedecido com 2mL de substância teste. Um pedaço deste papel foi acomodado às paredes de um béquer de 50mL, e em seguida os organismos foram introduzidos. A verificação do grau de mortalidade dos organismos foi efetuada após 72 horas de exposição.

2.3 Teste de bioacumulação

Estes experimentos foram realizados de acordo com ASTM (2004). O ensaio é composto por duas etapas: bioacumulação e depuração, ambos com 28 dias de duração. O teste foi realizado com 3600 g de solo e 90 organismos adultos de peso semelhante para cada réplica (3). O teor de umidade do solo foi ajustado de acordo com capacidade de campo. Ao longo da etapa de bioacumulação, 10 organismos foram retirados de cada réplica em dias definidos (4º, 7º, 14º, 21º e 28º dias de teste), e enviados para a determinação do Hg total, previamente deixados por 24 h sobre um papel umedecido com água destilada, para o purgamento do conteúdo intestinal.

Após a etapa de bioacumulação, os organismos restantes foram transferidos para um solo artificial, onde permaneceram por mais 28 dias (etapa de depuração). Ao longo desta etapa, 10 organismos de foram novamente retirados de cada réplica em dias estabelecidos (7º, 14º, 21º e 28º dias de teste) e enviados para a determinação do Hg total. Este teste foi somente realizado com o latossolo vermelho.

2.4 Teste de comportamento

O teste de comportamento ou fuga (*“avoidance test”*) foi realizado conforme o procedimento proposto por ISO (2008). Para a execução do ensaio, recipientes plásticos (20cm de comprimento, 12cm de altura, e 5cm largura) foram divididos em duas seções de mesma área, com o auxílio de um cartão plástico. Uma das seções foi preenchida com solo teste, e a outra com a mesma quantidade de solo controle (solo natural não contaminado).

Após a remoção do cartão plástico, 10 indivíduos adultos foram colocados sobre a linha que divide os solos. Durante as 48 horas de teste, os oligoquetas foram mantidos sob temperatura de 22°C em incubadora, com ciclos de luz e escuridão de 12 horas. Ao final do ensaio, verificou-se a porcentagem de oligoquetas presentes no solo-teste e no solo controle. Quando menos de 20% dos organismos eram encontrados no solo teste, considerava-se que o solo tinha *“função de habitat limitada”* (ISO, 2002). As concentrações de Hg a serem testadas nestes ensaios foram selecionadas de acordo com os resultados obtidos com os bioensaios agudos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Testes de toxicidade aguda

Estes bioensaios agudos incluem ambas as vias de exposição: ingestão e contato dérmico. Os resultados possibilitaram a obtenção de valores de CL50 para os diferentes tipos de solo (Tabela 1). Relações de

interdependência dose e resposta (mortalidade) foram identificadas para todos os solos estudados ($p < 0,05$). Com base nos resultados obtidos em solos artificiais, foram definidas as concentrações a serem testadas em solos naturais: chernossolo (5, 10, 12, 15, 18 e 20 mg/kg), latossolo amarelo (2, 5, 6, 8, e 10 mg/kg) e latossolo vermelho (5, 10, 15, 20 e 25 mg/kg). No caso do solo artificial, níveis significativos de mortalidade (>20%) foram somente observados para teores acima do limite de intervenção agrícola (12 mg/kg) (CONAMA, 2009). Entretanto, no latossolo amarelo níveis letais de toxicidade foram observados para concentrações de 8 mg/kg. Com os resultados de CL50, pode-se sugerir maior toxicidade do mercúrio em latossolo amarelo.

Tabela 1. Concentração letal a 50% dos organismos (CL50 – mg/kg de Hg) e intervalos de 95% de confiança obtidos para as classes de solos estudadas.

Solo	Limite Inferior	CL50	Limite Superior
Artificial	15,27	15,86	16,48
Latossolo Vermelho	18,63	19,51	20,44
Chernossolo	15,42	16,07	16,74
Latossolo Amarelo	6,5	7,03	7,59

Os resultados de CL50 revelam que a toxicidade potencial do Hg em latossolo amarelo é duas a três vezes maior do que nos demais solos testados. No caso deste tipo de solo, sugere-se que a ausência de sítios mais efetivos de adsorção e/ou complexação (mineralogia essencialmente caulínica e baixos níveis de matéria orgânica – Kede, 2006), associada à quase ausência de alimento (baixos níveis de fertilidade), pode ter estimulado a ocorrência de maiores níveis de mortandade neste solo.

No latossolo vermelho, altos teores de matéria orgânica e de oxi-hidroxidos de ferro (Kede, 2006) possivelmente funcionaram como importantes sítios de adsorção e/ou complexação do Hg, diminuindo sua biodisponibilidade para a solução do solo e acarretando na obtenção da maior CL50 dentre as classes de solo estudadas.

No chernossolo, a presença de argilominerais expansivos (Cesar et al. 2008) possivelmente teve papel importante nos processos de biodisponibilidade, devido ao seu elevado potencial de adsorção de cátions, diminuindo a disponibilidade de Hg para a solução do solo. Matske et al. (2008) também observaram comportamento semelhante ao estudarem a influência de argilominerais 2:1 na fito-toxicidade de substâncias orgânicas para vegetais. Outro aspecto que pode ter corroborado para a diminuição da ecotoxicidade são os elevados níveis de fertilidade desta classe de solo, que indicam maior disponibilidade de alimento para os organismos.

3.2 Testes de toxicidade aguda com papel de contato

Para avaliação somente da exposição dérmica, os resultados destes ensaios revelaram níveis significativos de mortandade (>20%) somente para as concentrações acima ou igual a 8 mg/L, com CL50 estimada em 8,71 mg/L (intervalo de 95% de confiança = 10,42 a 12,47 mg/L). Relações significativas de interdependência dose e resposta (mortalidade) foram também detectadas ($p < 0,01$). É importante notar que a CL50 obtida neste ensaio é semelhante àquela obtida com o latossolo amarelo em teste agudo tradicional (ver item 3.1), sugerindo que a via dermal de exposição desempenha papel fundamental na ecotoxicidade e biodisponibilidade do mercúrio.

É importante destacar que estes ensaios foram realizados com uma solução de Hg iônico e, dessa forma, não levam em consideração a influência das propriedades dos solos sobre os mecanismos de biodisponibilidade. Por outro lado, este teste simula a absorção via dermal do metal pelos oligoquetas e, dessa forma, fornece uma estimativa da concentração de Hg na solução do solo capaz de provocar efeitos letais aos organismos. Em trabalhos futuros, será testada a toxicidade aguda dos lixiviados destes solos (elutriatos), de forma a investigar o papel das propriedades dos solos sobre a ecotoxicidade.

3.3 Testes de bioacumulação

A dose de Hg utilizada neste ensaio corresponde ao CENO (concentração de efeito não observado) de letalidade determinada nos ensaios agudos para todas as classes de solos estudadas (5mg/kg). Ao final da etapa de bioacumulação, não foi constatada mortalidade de organismos. Por outro lado, foi observada a ausência de casulos no solo-teste, sugerindo que a presença do Hg foi capaz de inibir a reprodução dos oligoquetas. Os resultados referentes à determinação dos teores de Hg total (Figura 1) demonstraram fatores de bioconcentração (FBCs - razão entre o teor do metal no tecido pela concentração no solo) variando de aproximadamente 2 a 20 unidades, indicando que os animais bioacumularam o contaminante (Liu et al. 2005).

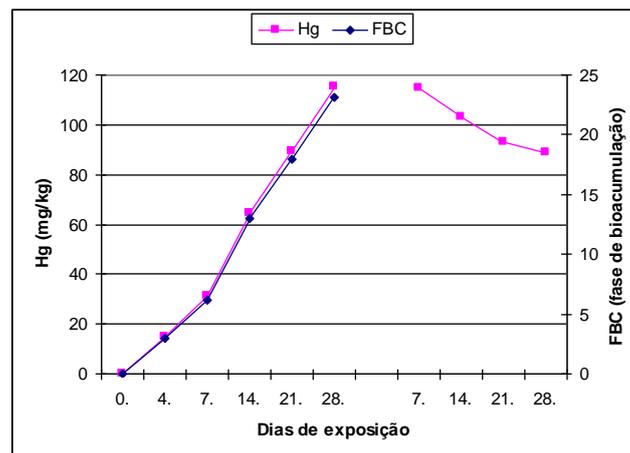


Figura 1 – Teores de mercúrio total em tecidos de oligoquetas expostas a dose de 5 mg/kg em latossolo vermelho e os respectivos fatores de bioconcentração (FBC).

Veiga & Hinton (2002) apontam para FBCs nessa faixa de variação e sugerem o emprego destes organismos como biondicadores de poluição mercurial. Outro aspecto importante dos nossos resultados diz respeito ao fato de que os organismos não foram capazes de depurar o mercúrio incorporado durante a etapa de bioacumulação, indicando a ocorrência de mecanismos de fixação interna. De fato, a concentração de mercúrio no tecido dos animais incrementou aproximadamente 120 vezes, enquanto a depuração observada foi de apenas 4 vezes da taxa bioacumulada.

3.4 Testes de comportamento

Os resultados referentes ao teste de comportamento estão demonstrados na Tabela 2. Embora a concentração de 5 mg/kg não tenha causado qualquer efeito letal sob exposição aguda, esta dose foi capaz de provocar efeitos comportamentais significativos em todas as classes de solo estudadas, indicando a “*função de habitat*

limitada” destes solos com esta concentração. Estas constatações concordam com aquelas obtidas com o bioensaio agudo, que indicam níveis maiores de toxicidade para o latossolo amarelo. Na dose de 1 mg/kg, os resultados mostram efeitos no comportamento de fuga apenas para o latossolo amarelo. Aspecto interessante deste resultado que a dose de 1 mg/kg corresponde à concentração de prevenção proposta pelo CONAMA, bem como ao CENO de comportamento para o latossolo amarelo.

Tabela 2. Resultados do teste de fuga em função de distintas doses e em diferentes tipos de solo: percentual de organismos nos solos-teste após 48 horas de exposição.

Dose (mg/kg)	Lat. Vermelho	Chernossolo	Lat. Amarelo
0,5	-	-	47%
1	43%	46%	0%
5	0%	0%	0%
10	0%	0%	0%

4. CONCLUSÕES

Dentre os bioensaios empregados neste trabalho, o teste de comportamento foi o mais sensível à presença de Hg, podendo funcionar como uma ferramenta importante no monitoramento preliminar da biodisponibilidade de Hg em solos. As propriedades dos solos estudados desempenharam papel fundamental nos mecanismos de toxicidade do mercúrio para os oligoquetas, com níveis de maiores de toxicidade para o latossolo amarelo. Estes resultados poderão subsidiar o estabelecimento de valores de referência tóxica capazes de refletir a realidade das principais ocorrências pedológicas brasileiras, fornecendo suporte fundamental a futuras avaliações do risco ecológico associado à biota edáfica tropical em áreas contaminadas. Em trabalhos futuros, será monitorada a perda de biomassa em testes de bioacumulação com outros solos, para comparação com o latossolo vermelho.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela bolsa concedida; às equipes do LEMA e LECOMIN; à Dra. Helena Polivanov (Geologia/UFRJ) pelo auxílio nas coletas dos chernossolos; ao Dr. Daniel Filho da EMBRAPA por ceder as amostras de Latossolos.

6. BIBLIOGRAFIA

ASTM.- American Society for Testing and Materials. 2004. Standard Guide For Conducting Laboratory Soil Toxicity Or Bioaccumulation Tests With The Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the enchytraeid potworm *enchytraeus albidus*.

CESAR, R. G.; EGLER, S. G.; ALAMINO, R.; POLIVANOV, H.; SILVA, R.; CASTILHOS, Z.; ARAÚJO, P. Avaliação do potencial tóxico de latossolos e chernossolos acrescidos de lodo de esgoto utilizando bioensaios com oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*. **Anuário do Instituto de Geociências**, v.31(2), p.53-60, 2008

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2009. **Resolução nº 420 de 28 de dezembro de 2009**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=506>>. Acesso em: 19 abr. 2010.

Garcia, M. (2004) Effects of pesticides on soil fauna: Development of ecotoxicology test methods for tropical regions. In: P.L.G Vlek, et al. (Eds.). Ecology and Development Series, v. 19, Cuvillier Verlag Göttingen, 282 p.

HINTON, J.; VEIGA, M. Earthworms as bioindicators of mercury pollution from mining and other industrial activities. **Geochemistry, Exploration, Environment, Analysis**, v. 2, p.269-274, 2002

ISO. (2008). Soil Quality -. Avoidance Test for Determining the Quality of Soils and Effects of Chemicals on Behaviour – Part 1: Test with Earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). Geneva, ISO 17512-1.

KEDE, M. L. M. **Comportamento do chumbo em latossolos após aplicação de rocha fosfatada brasileira: subsídio para remediação ambiental de áreas contaminadas**. Tese de Doutorado (Saúde Pública), Fundação Oswaldo cruz (FIOCRUZ), 2006.

LIU, X.; CHENGXIAO, H.; ZHANG, S. Effects on earthworm activity on fertility and heavy metals bioavailability in sewage sludge. **Environment International**, v.31, p.874-879, 2005.

MATZKE, M., STOLTE, S., ARNING, J., UEBERS, U., FILSER, J. Imidazolium based ionic liquids in soils: effects of the side chain length on wheat (*Triticum aestivum*) and cress (*Lepidium sativum*) as affected by different clays and organic matter. **Green Chemistry**, v.10, p.584-591, 2008.

NAHMANI, J., HODSON, M. E., BLACK, S. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. **Environmental Pollution**, v.145, p.402-424, 2007.

OECD, 1984. Earthworm, Acute Toxicity Tests. In: OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 207, OECD, Paris.

WHO (World Health Organization). (1990). Environmental Health Criteria for Methylmercury. Geneva, p.