

Bioensaio de toxicidade aguda com o oligoqueta *Eisenia foetida* utilizando o Cromo (VI) como substância-teste

Karen Pereira Marmello Santos Muniz

Bolsista de Iniciação Científica, Ciências Biológicas, CEDERJ- UFRJ

Zuleica C. Castilhos

Orientadora, Farmacêutica, D. Sc.

Silvia Gonçalves Egler

Co-orientador, Bióloga, M. Sc.

Resumo

O Serviço de Desenvolvimento Sustentável (SEDS), do Centro de Tecnologia Mineral (CETEM/MCT), implantou o Laboratório de Ecotoxicologia (LECOMIN), desenvolvendo inicialmente, testes com o oligoqueta *Eisenia foetida*. As normas adotadas no LECOMIN para teste de toxicidade aguda com substâncias são da Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD –207-84). O objetivo geral deste estudo foi avaliar o risco ecotoxicológico da contaminação de solos por cromo(VI), utilizando *Eisenia foetida* como organismo teste. Foram observados os efeitos de imobilidade e de letalidade em 48 e 72 horas e os dados foram analisados utilizando-se abordagem de dose-resposta com probitos. Os resultados obtidos resultaram em CL_{50} de 13,58mg/L, ou seja, foi determinada a concentração letal a 50% dos organismos expostos. A concentração efetiva para a imobilidade (CE_{50}) mostrou uma baixa correlação ($R^2 = 0,1165$), o que não permitiu estimar este parâmetro. Serão realizados ensaios para identificar-se o valor da CE_{50} para imobilidade e testes crônicos sobre a reprodução.

1. Introdução

O cromo é um elemento químico encontrado naturalmente no solo, na poeira e em gases de vulcões. No meio ambiente são três os números de oxidação do cromo: cromo(0), cromo(III) e cromo(VI). Porém as formas Cr(III) e Cr(VI) são as mais estáveis e provocam efeitos à saúde fundamentalmente diferentes. Na forma trivalente o cromo é essencial ao metabolismo humano e, sua carência causa doenças. Enquanto que na forma hexavalente é tóxico e cancerígeno. A dose diária de exposição via oral a partir da qual o elemento passa a ser nocivo à saúde é dada como $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para o Cr(VI) e $1,000 \text{ mg.Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para o Cr(III). Em geral, as concentrações atmosféricas de cromo são menores que $0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$, na água não contaminada os valores estão na faixa de $0,1 \mu\text{g}/\text{L}$ e na maioria do solo é encontrado a baixas concentrações, de 12 a 60 mg/Kg e somente uma parte está disponível para as plantas (WHO,1998). Os limites máximos de exposição humana são estabelecidos em função do Cr(VI). Os valores nacionais disponíveis (CETESB, 2001) indicam teores de 40 mg/kg para solo e 50 mg/L para águas subterrâneas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda, desde 1958, uma concentração máxima de 0,05 mg/L de cromo (VI) na água de consumo. A Resolução CONAMA 357 de 2005 recomenda a concentração máxima de 0,05 mg/L de cromo total para água de consumo humano.

Os compostos de cromo no estado de oxidação +6 são oxidantes fortes, a maioria destes compostos irritam os olhos, a pele e as mucosas, podendo quando a exposição é crônica, provocar danos permanentes nos olhos (Giling & Pérez, 2001).

O cromo VI existente no meio ambiente, é quase todo proveniente das atividades humanas, originando-se de emissões das fabricações de cimento, fundições, soldagem, mineração de cobre, lixos urbanos e industriais, incineração, utilização em curtumes e fertilizantes, entre outros. Nestas regiões o solo pode apresentar teores acima do permitido, principalmente, devido ao mau descarte desse elemento pelas atividades industriais. Os resíduos possuem alto poder de contaminação, quando não são convenientemente tratados e simplesmente abandonados em corpos d'água, aterros industriais ou mesmo lixeiras clandestinas. Com facilidade, o cromo atinge o lençol freático ou mesmo reservatórios ou rios que são as fontes de abastecimento de água das cidades. O resíduo no solo pode ser absorvido por plantas que posteriormente servirão de alimento diretamente ao homem ou a animais, podendo por este caminho também atingir o ser humano. Testes de toxicidade avaliam potenciais efeitos tóxicos de substâncias químicas sobre organismos, possibilitando o estabelecimento de limites permissíveis de várias substâncias e seus impactos nos organismos (CETESB, 2005). Testes de toxicidade crônica permitem avaliar efeitos adversos por um longo período e avalia diversos efeitos sobre a reprodução dos organismos. Testes simples de curto prazo são utilizados para avaliação de toxicologia aguda e, na maioria das vezes, são os primeiros a serem realizados como testes preliminares.

Segundo a OECD(Organisation for Economic Co-operation and Development), a concentração letal média (CL₅₀), ou seja, a dose letal para 50% dos organismos – teste determinação de efeitos agudos de uma substância. Normalmente utilizam-se pequenos mamíferos, peixes, oligoqueta ou microrganismos para o estabelecimento desses indicadores, que são de grande importância para se conhecer e se dimensionar a importância de uma contaminação. O oligoqueta *Eisenia foetida* (minhoca vermelha californiana) tem se mostrado muito eficaz na avaliação da qualidade do solo, pois possui várias características desejáveis para organismo - teste: tempo de geração curto, alta taxa reprodutiva, facilmente coletada em fontes naturais, de ótimo cultivo em laboratório, ingerem grande quantidade de solo, possuem estreita relação com outros compartimentos do solo, são importantes na cadeia trófica, por ser uma fonte de recurso para diversos organismos e os dados de crescimento, sobrevivência e reprodução podem ser obtidos em bioensaio (ASTM E-1676-95, Ramos et al., 2006).

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o risco ecotoxicológico da contaminação por cromo em solos, tendo como objetivos específicos:

I – Avaliar o emprego de testes agudos de 48-72 h com minhocas da espécie *Eisenia foetida*, como teste preliminar.

II –Determinação da CL₅₀ (Concentração letal para 50% dos organismos testados) do Cr(VI).

III–Determinação da CE₅₀ (Concentração que causa imobilidade em 50% dos organismos testados) do Cr(VI).

3. Material e Métodos

Para o teste preliminar dos efeitos agudos do Cr(VI), foi utilizado o dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) como substância-teste. O teste seguiu a norma da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD-207,1984) para teste agudo de 48-72 h. Como substrato foi utilizado papel filtro embebido com cinco diferentes soluções-teste nas concentrações: 0,001 - 0,01 - 0,1 - 1,0 e 10 mg/L. Cada concentração foi testada em 10 réplicas, com uma minhoca por réplica. As minhocas eram adultas, com peso superior a 300 mg e clitelo desenvolvido (estrutura reprodutiva, onde são depositados os óvulos). Béqueres de 50 mL foram utilizados como recipiente-teste e a lateral recoberta pelo papel filtro umedecido com 1 mL de solução-teste e 1 mL de água deionizada. Durante o teste os béqueres são colocados apoiados nas laterais e tampados com filme plástico perfurado. O teste foi mantido no escuro à temperatura de 20° ± 2°C. A primeira verificação é realizada após 48h, com anotações dos efeitos e o número de letalidade observados. Uma segunda verificação é realizada após 24h, completando às 72h, quando o teste é encerrado.

Foram utilizados para a estimativa da CL₅₀, o método gráfico para dose-resposta – Probit (Castilhos al et., 2001). A relação dose-resposta avalia a resposta, definido como o percentual de organismos afetados no bioensaio, em relação aos organismos expostos às diferentes doses ou concentrações. As concentrações foram transformadas em logaritmos e as frequências das respostas foram transformadas em unidades do probito. A partir da equação da reta obtida é possível estimar-se a concentração na qual 50% dos organismos testados mostram o efeito observado, neste caso letalidade ou a imobilidade.

3. Resultados e Discussão

Edwards (1983, apud Spurgeon & Hopkin, 1995) desenvolveu os testes de toxicidade aguda, contato com papel filtro e com solo artificial, com minhocas, principalmente, para avaliações de risco de novos agroquímicos. Posteriormente, estes testes foram adotados pela OECD (1984), sendo largamente utilizados em testes em laboratório, principalmente, o com solo artificial, por simular condições de solo em laboratório (Spurgeon & Hopkin, 1995). Resultados diferentes de toxicidade entre testes realizados com solo artificial e de campo foram atribuídos a biodisponibilidade das substâncias testadas (Rombke et al., 2005; Spurgeon & Hopkin, 1995). O teste com contato com papel filtro parece ser mais utilizado por indústrias (DuPont, <http://www.antecint.co.uk/MAIN/ffsenv-portuguese.htm>).

A Tabela 1 e a Figura 1 apresentam a letalidade e a imobilidade no controle em cada uma das concentrações testadas.

Tabela 1: Número de organismos mortos ou imóveis no controle (0 mg/L) e nas cinco diferentes concentrações de $K_2Cr_2O_7$ no teste agudo segundo OECD 207-87, utilizando 10 oligoquetas para cada concentração.

$K_2Cr_2O_7$ (mg/kg)	0		0,001		0,01		0,1		1,0		10,0	
	48 h	72h	48 h	72h	48 h	72h	48 h	72h	48 h	72h	48 h	72h
Letalidade	-	-	01	02	01	01	-	02	-	04	04	01
Letalidade Total (48h e72h)	0		03		02		02		04		05	
Imobilidade	-	-	-	01	03	01	01	03	03	02	-	02
Imobilidade Total (48h e72h)	0		01		04		04		05		02	

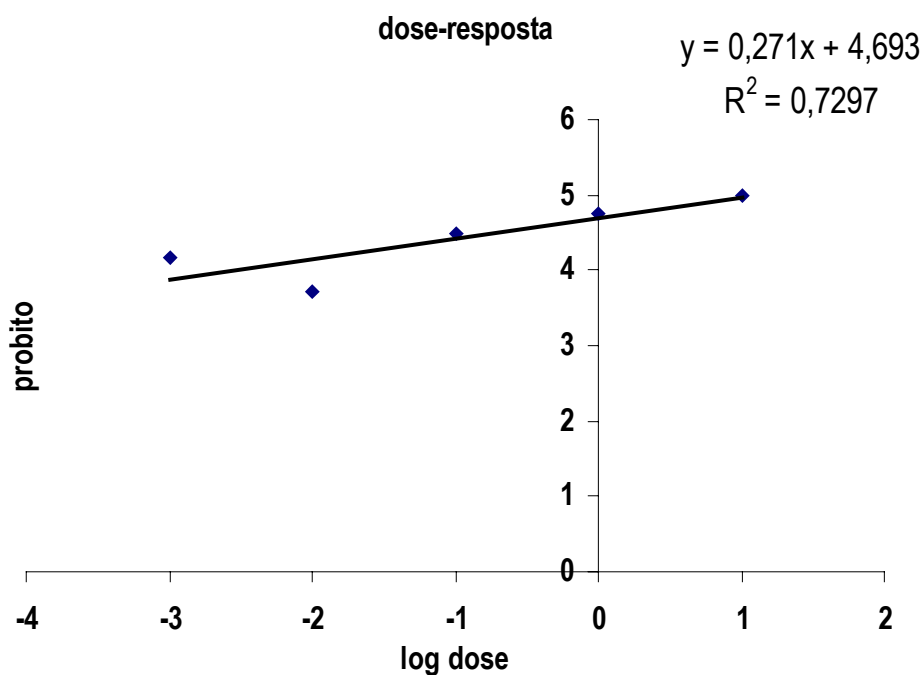


Figura 1. Relação dose-resposta de letalidade de *E.foetida* a diferentes dose de cromo(VI).

A Fig 1. mostra a relação dose-resposta para letalidade de *Eisenia foetida* exposta a diversas concentrações. A equação da reta ($y = 0,271x + 4,693$ $R^2=0,7297$) permitiu a estimativa da CL_{50} , resultando em 13,58 mg/L. Para a imobilidade, a relação dose-resposta mostrou uma baixa correlação ($R^2 =0,1165$) e portanto, não foi possível

estimar-se a CE_{50} a partir destes dados. Por isto, futuros trabalhos serão desenvolvidos para determinar-se a CE_{50} .

5. Conclusão

A CL_{50} apresentou uma boa correlação ($R^2=0,7297$) resultando em 13,58 mg/Kg a concentração letal a 50% dos organismos, porém a concentração efetiva medida como imobilidade (CE_{50}) mostrou uma baixa correlação ($R^2=0,1165$), portanto não sendo possível estimar a CE_{50} .

Numa segunda fase, teste com contato com papel filtro podem ser utilizados como preliminares para a determinação das concentrações iniciais a serem testadas para a determinação da CE_{50} , CEO e CENO. CENO (maior concentração que não causa efeitos tóxicos) não foi obtido, pois não houve nenhuma concentração com 0% de letalidade. O CEO (menor concentração que causa efeito tóxico) foi na concentração 0,001 mg/L que apresentou 20% de letalidade.

Testes com solos artificiais são mais indicados por reproduzirem melhor as condições de campo em estudos comparativos devido diferenças na biodisponibilidade das substâncias.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pela bolsa de iniciação concedida, ao CETEM pela oportunidade Ao CNPq pela bolsa concedida, ao G. Alexandre da COAM pela ajuda nas concentrações do Cr(VI), ao motorista Marcio pela ajuda nos trabalhos de campo, a todos meus amigos (Ana Paula, Beto, Alinne, Jacqueline, Elton, Cíntia e Luzia) pelo carinho, ajuda e apoio na elaboração do trabalho, e as minha orientadora Zuleica Castilhos e co-orientadora Sílvia Egler pelo carinho, paciência e ensinamentos.

Referências Bibliográficas

- ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS) Informação e Documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2000. Disponível em: [http://www.cenpro.feb.unesp.br/download/nbr NBR 6023-2002.pdf](http://www.cenpro.feb.unesp.br/download/nbr_NBR_6023-2002.pdf), ACESSADO EM 20 DE MAIO DE 2006.
- **AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, STANDARD DESIGNATION.** Standard Guide for Conducting a Laboratory Soil Toxicity Test with Lumbricid Earthworm *Eisenia foetida*, ASTM E1676-95, 1995
- AZEVEDO, F. A., CHASIN, A.A.M., **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**, SÃO CARLOS, RIMA P.147-151, SÃO PAULO, 2003
- CASTILHOS, Z.C., BIDONE, E.D., HARTZ, S.M.; **Bioaccumulation of Mercury by Tucunará (*Cichala ocellaris*) from Tapajós River Regions, Brazilian Amazon: A Field Dose-Response Approach**, Bull. Environmental Contamination and Toxicology . 66, P. 631-637, 2001

- CECHINATTO, J.L.; DIAS, M.L.; VIGOLO, S.M. **Manual de Elaboração de Referências Bibliográficas (Norma ABNT 6023/2000) e Citações (Norma ABNT 10520/92)**. UFRGS. Porto Alegre, Jan. 2001. disponível em: < <http://wwwsr.unijui.tche.br/ambienteinteiro/manual.pdf> > Acesso em: 21.maio. 2006
- CETESB (COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL). Método de Avaliação da Toxicidade de Poluentes a Organismos Aquáticos, V. 01, 312 P., 2005
- **Directiva 96/12/CE da Comissão, de 8 de março de 1996, que altera a directiva 91/414/CEE do Conselho Relativa à Colocação dos Produtos Fitofarmacêuticos no Mercado (Texto relevante para efeitos do EEE)** *Jornal Oficial N° L 065 de 15/03/1996 P. 0020 – 0037*. Disponível em <<http://europa.eu.int/eur-lex/lex/lexuriserv/lexuriserv.do?uri=celex:31996l0012:pt:html>> Acesso em: 19 de maio, 2006
- EFROYMSON, R.A., WILL, M.E., SUTER II, G.W. **Toxicological Benchmarks for Contaminants of Potential Concern for Effects on Soil and Litter Invertebrates and Heterotrophic Process: 1997 Revision**. U.S. Department of Energy, Office of Environmental Management, ES/ER/TM-126/R2, 1997, 151 p.
- GILLING, P.A., PÉREZ, Y.G. Evaluación Toxicológica del Dicromato de Potasio en Plantas de Lechuga, *Lactuca Sativa*, L, **Anuario Toxicología**, **98**, P.103,2001. Disponível em: www.bvs.sld.cu/revista/anu/vol1_1_01/anu1601.htm. Acessadoem: 21 de maio,2006
- NETO, J.G.M. **Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde**, UNESP, São Paulo 2005. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download/deptos/fitossanidade/joaquim_machado/13aula/13peixdaph1105.pdf> Acesso em: 19 de maio de 2006
- OECD (**Organisation for Economic Co-operation and Development**) 207, Earthworm, Acute Toxicity Tests, Guideline for Testing of Chemicals, P.1-9, 1984.
- RAMOS, A. S. **Avaiiação Ecotoxicologica de Solo Contaminados por Mercúrio Metálico Utilizando o Oligoqueta *Eisenia Foetida***, 2006 XIV (Jornada de Iniciação Científica) – CETEM (Centro de Tecnologia mineral – Rio de Janeiro)
- ROMBKE, J, JANSCH, S, DIDDEN, W. The Use of Earthworm in Ecological Soil Classification and Assessment Concepts. **Ecotoxilogy and Environmental Safety**, V62, P249-265, 2005
- SIVAKUMAR, S. & SUBBHURAAM, C.V. Toxicity of Chromium (III) and Chromium (VI) to the Earthworm *Eisenia Fetida*. **Ecotoxicol.Environm.Saf.**, 62, P. 93-98, 2005.
- SPURGEON, D.J., HOPKIN, S.P. Extrapolation of the Laboratory-based OECD Earthworm Toxicity Test to Metal-Contaminated Field Sites. **Ecotoxicology**, 4, 190-205, 1995.

- SPURGEON, D.J., WEEKS, J.M., VAN GESTEL, C.A.M. **A Summary of Eleven Years Progress in Earthworm Ecotoxicology** in: The 7th International Symposium on Earthworm Ecology. Cardiff. Wales. 2002, *Pedobiologia* 47. P. 588-606, 2003.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION CHROMIUM). Environmental Health Criteria, 61-P, GENEVA, 1998.