

---

---

**JBSE**

---

---

**JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF**  
**Ecotoxicology**

**VOLUME 1, NUMBER 2, 2006**

**EDITORS**

**Evaldo Luiz Gaeta Espíndola**  
**University of São Paulo**  
**Brazil**

**Gilberto Fillmann (Editor-in-Chief)**  
**University Foundation of Rio Grande**  
**Brazil**

**José Maria Monserrat**  
**University Foundation of Rio Grande**  
**Brazil**

**Maria Beatriz C. Bohrer-Morel**  
**IPEN-CNEN/SP**  
**Brazil**



*SETAC - Brazil*

**JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF  
ECOTOXICOLOGY**

**ISSN 1809-8401**

*A quarterly publication of the Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia (SETAC Brazil)*

---

**EDITORS**

*Evaldo Luiz Gaeta Espíndola  
University of São Paulo  
Brazil*

*Gilberto Fillmann (Editor-in-Chief)  
University Foundation of Rio Grande  
Brazil*

*José Maria Monserrat  
University Foundation of Rio Grande  
Brazil*

*Maria Beatriz C. Bohrer-Morel  
IPEN-CNEN/SP  
Brazil*

---

**EDITORIAL BOARD  
(PROVISIONAL)**

Dr. Francesco Regoli  
University of Ancona  
Italy

Dr. Juan López-Barea  
University of Córdoba  
Spain

Dr. Ricardo Barra  
University of Concepción  
Chile

Dr. G. Allen Burton  
Wright State University  
USA

Dr. Maria João Bebianno  
University of Algarve  
Portugal

Dr. Richard J. Wenning  
ENVIRON Int. Corporation  
USA

Dr. James W. Readman  
Plymouth Marine Laboratory  
England

Dr. Paule Vasseur  
University of Metz  
France

Dr. Rui Ribeiro  
University of Coimbra  
Portugal

---

**BRAZILIAN SOCIETY OF ECOTOXICOLOGY (2004-2006)**

President: Adalto Bianchini (FURG)  
1<sup>o</sup> Vice-President: Evaldo L. G. Espíndola (USP)  
2<sup>o</sup> Vice-President: Afonso C. D. Bairy (UFSC)  
1<sup>o</sup> Director: Sueli Borrely (IPEN)  
2<sup>o</sup> Director: Alexandre Arenzon (UFRGS)  
1<sup>o</sup> Secretary: Vera Vargas (FEPAM)  
2<sup>o</sup> Secretary: Eduinety Ceci P. M. de Sousa (USP)  
1<sup>o</sup> Treasurer: Gilberto Fillmann (FURG)  
2<sup>o</sup> Treasurer: Fabio Berto X. da Silva (Tribel)

**Permanent Financial Board**

Eduardo Bertoletti (CETESB)  
Cintia Badaró-Pedroso (UNIMONTE)  
Eduardo Platte (PETROBRAS)

**Substitute Financial Board**

Paulo S. M. Carvalho (CETESB)  
Anne Leonor Vieira (FATMA)  
Regina Sawaia Sáfaci (TECAM)

**SPECIAL ISSUE ON THE VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA  
(VIII ECOTOX, 17-20 October 2004, Florianópolis, SC, Brazil)**

**EDITORIAL**

It is with great satisfaction that the Editorial Board publishes papers presented at the VIII *Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia* (Brazilian Conference of Ecotoxicology) – ECOTOX, which took place at Praiatur Hotel, Ingleses Beach, Florianópolis (SC, Brazil), between October 17<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup>, 2004.

The ECOTOX Conference has been serving as a forum for presentation and discussion of several aspects related to ecotoxicology studied by the Brazilian scientific community. An increase in the diversity of the related subjects presented in the conference was observed throughout the years, and several of them are published in this special issue.

The publication of these papers represents a very precious moment to our Society, since fulfills an objective aimed for a long time. In addition, this publication is even more special because these selected papers put together the first two issues of the journal of our Society.

The Editorial Board, together with the Conference Scientific Board, believes to have reached its aim and thank all authors for their contributions.

Editorial Board of the VIII ECOTOX

**EDITORIAL**

É com grande satisfação que a Comissão Editorial publica trabalhos apresentados no VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia – ECOTOX, o qual foi realizado no Praiatur Hotel, Praia dos Ingleses, Florianópolis (SC, Brasil), no período de 17 a 20 de outubro de 2004.

O ECOTOX tem sido o fórum para apresentação e discussão de temas que vêm sendo estudados pela comunidade científica brasileira no âmbito da Ecotoxicologia. Ao longo dos anos, foi possível observar um incremento na diversidade dos assuntos apresentados nos congressos ECOTOX, muitos dos quais estão publicados nesta edição especial.

Acreditamos que a publicação destes trabalhos representa um momento muito importante para a nossa Sociedade, pois concretiza um objetivo estabelecido há muito tempo. Além disso, esta publicação representa um marco especial, pois os trabalhos aqui apresentados fazem parte dos dois primeiros volumes da revista da nossa Sociedade.

A Comissão Editorial, juntamente com a Comissão Científica do Evento, espera ter cumprido sua missão e agradece a contribuição de todos os autores.

Comissão Editorial do VIII ECOTOX

---

**CONFERENCE ORGANIZING COMMITTEE (2003-2004)**

Afonso Celso Dias Bairy (UFSC) – bairy@mbox1.ufsc.br  
Anne Leonor Vieira (FATMA) – annelv@ig.com.br  
Alcir Luiz Dafré (UFSC) – aldafre@ccb.ufsc.br  
Maria Risoleta Freire Marques (UFSC) – risomar@mbox1.ufsc.br  
Paulo Sérgio Martins de Carvalho (UFSC) – pcarvalho@ccb.ufsc.br

**EDITORIAL BOARD OF THE SPECIAL ISSUE**

*Abílio de Oliveira Neto*  
State University of Campinas  
Brazil

*Maria Beatriz C. Bohrer-Morel*  
(President)  
IPEN-CNEN/SP  
Brazil

*Eduinetty Ceci P. M. de Sousa*  
University of São Paulo  
Brazil

*Regina Sawaia Sáfyadi*  
TECAM  
Brazil

---

**SCIENTIFIC BOARD OF THE SPECIAL ISSUE**

Alexandre Arenzon  
UFRGS – Brazil

Fábio B. Xavier da Silva  
TRIBEL – Brazil

Pedro Zagatto  
BIAGRI – Brazil

Charrid Resgalla Júnior  
UNIVALI – Brazil

Helena Cristina S. Assis  
UFPR – Brazil

Roberta A. V. C. Jorge  
USP – Brazil

Dênis Moledo S. Abessa  
UNESP – Brazil

José M. Monserrat  
FURG – Brazil

Tuiskon Dick  
UFRGS – Brazil

Eduardo Bertoletti  
CETESB – Brazil

Leonardo Rubi Rörig  
UNIVALI – Brazil

Vera Maria F. Vargas  
FEPAM – Brazil

Eduardo Mendes da Silva  
UFBA – Brazil

Maria T. R. Rodriguez  
UFRGS – Brazil

Secretary: Angélica M. da Silva (IPEM-CNEN/SP – Brazil)/Acknowledgement: Roberta A. V. C. Jorge (USP – Brazil)

CONTENTS

Volume 1

September, 2006

Number 2

*This Special Issue contains paper presented at the VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia – ECOTOX (Brazilian Conference of Ecotoxicology), Florianópolis, SC, Brazil, 17-20 October 2004.*

<b>Aplicação do Teste de Assimilação e Dissimilação (A-D) para Observação de Efeitos Tóxicos em Águas Superficiais</b> .....	97
C. G. Chiochetta & M. Chiochetta	
<b>Redução da Toxicidade do Surfactante LAS Tratado com o Feixe de Elétrons</b> .....	103
M. F. Romanelli, G. P. Silva & S. I. Borrely	
<b>Estudos Laboratoriais de Acúmulo e Toxicidade de Arsênio em <i>Eichhornia crassipes</i> e <i>Salvinia auriculata</i></b> .....	109
F. P. Guimarães, C. Q. Gomes, A. B. S. Magalhães, T. V. Freitas, J. A. Oliveira & R. Aguiar	
<b>Método Multigeração para Avaliação dos Efeitos de Poluentes sobre a Reprodução de Caramujos de Água Doce</b> .....	115
E. C. Oliveira-Filho, B. R. Geraldino, C. K. Grisolia & F. J. R. Paumgarten	
<b>Avaliação Ecotoxicológica do Sedimento do Arroio Sapucaia, RS, Brasil, através de Ensaio de Toxicidade Utilizando Diferentes Amostradores e Organismos-teste</b> .....	119
C. M. S. Portela, A. Arenzon & M. T. Raya-Rodriguez	
<b>Fertilidade e Sensibilidade de <i>Daphnia similis</i> e <i>Daphnia magna</i> Submetidas a Diferentes Cultivos</b> .....	123
A. C. Beatrici, A. Arenzon, N. J. Coimbra & M. T. Raya-Rodriguez	
<b>Efeito Modulador do Extrato de <i>Stryphnodendron adstringens</i> Mart. (Barbatimão) Contra Danos Induzidos pela Mitomicina C em Camundongos</b> .....	127
L. Silva-de-Andrade, D. Barros-de-Castro & L. Chen-Chen	
<b>Distribuição Espacial das Concentrações de Mercúrio em Sólidos em Suspensão no Alto Rio Madeira, Rondônia</b> .....	131
J. P. de O. Gomes, E. L. do Nascimento, R. de Almeida, W. R. Bastos, J. V. E. Bernardi & P. R. H. B. de Barros	
<b>Ensaio de Comportamento com Minhocas (<i>Eisenia fetida</i>) para Avaliação de Áreas Contaminadas: Resultados Preliminares para Contaminação por Hidrocarbonetos</b> .....	137
C. L. S. Sisinho, M. R. M. Bulus, A. C. Rizzo & J. C. Moreira	
<b>Estudo Comparativo da Qualidade dos Sedimentos dos Reservatórios do Rio Tietê (SP)</b> .....	141
C. A. de Almeida & O. Rocha	
<b>Avaliação das Atividades Tóxicas e Mutagênicas da Água e do Sedimento do Arroio Estância Velha, Região Coureira-calçadista, Utilizando <i>Allium cepa</i></b> .....	147
H. Mitteregger-Júnior, J. Ferraz-Dias, M. Lúcia-Yonema, A. Arenzon, J. Silva & J. A. Pegas-Henriques	
<b>Avaliação da Toxicidade de Amostras de Águas Superficiais Preservadas de Diferentes Formas: Refrigeração e Congelamento</b> .....	153
M. A. Aragão & E. Bertoletti	
<b>Avaliação de Metais Pesados na Baía de Paranaguá, PR, Brasil, sob Influência das Atividades Antrópicas</b> .....	157
D. M. Santos, J. A. T. Bossini, K. H. Preussler, E. C. Vasconcelos, F. S. Carvalho-Neto & M. A. S. Carvalho-Filho	
<b>Comparação de Bioensaios Laboratoriais e “in situ” Utilizando <i>Chironomus xanthus</i> na Avaliação da Toxicidade de Sedimentos do Rio Monjolinho (São Carlos, SP)</b> .....	161
C. B. Dornfeld, E. L. G. Espíndola, R. Fracácio, B. K. Rodrigues & A. Novelli	
<b>Avaliação Ecotoxicológica do Ácido Hexadecanóico e do <math>\beta</math> Sitosterol para <i>Daphnia similis</i> Claus 1876 (Cladocera, Crustacea)</b> .....	167
R. Galvani-Sobreira, T. Heid-Furley, J. I. Effigen & A. C. de Oliveira-Filho	
<b>Toxicidade e Genotoxicidade do Sulfato de Cobre em Planárias de Água Doce e Camundongos</b> .....	171
D. Prá, T. Guecheva, S. I. R. Franke, T. Knakievicz, B. Erdtmann & J. A. P. Henriques	
<b>Impacto Automotivo em Populações de <i>Ctenomys minutus</i> na Planície Costeira do RS: Avaliação do Teor de Metais Tóxicos e Medição de Lipoperoxidação</b> .....	177
M. T. Raya-Rodriguez, C. J. S. Ferreira & J. C. F. Moreira	
<b>Um Estudo sobre a Utilização de Agrotóxicos e os Riscos de Contaminação num Assentamento de Reforma Agrária no Norte Fluminense</b> .....	185
M. A. Pedlowski, S. L. de Aquino, M. C. Canela & I. L. A. da Silva	
<b>Como o Produtor Rural Usa Agrotóxicos</b> .....	191
L. M. Scatena & R. de G. Duarte	
<b>Avaliação do Teor de Chumbo em Mexilhões da Espécie <i>Perna perna</i> na Região Metropolitana da Cidade do Rio de Janeiro</b> .....	195
C. B. Maia, A. C. M. Almeida & F. R. Moreira	

# INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS

## JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF ECOTOXICOLOGY

### Aims and Scope

The *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* (JBSE), published by SETAC Brazil, is a scientific journal committed to serve its readers as a forum for discussion of several aspects related to the advancement of ecotoxicology. The JBSE publishes original research papers in English (preferably), Portuguese or Spanish every three months, covering all fields of environmental chemistry, environmental toxicology and risk assessment.

### Editorial Policy

The Journal, which issues four numbers a year (March, June, September, and December), publishes manuscripts preferably in English (with an optional additional abstract in Portuguese or Spanish). Alternatively, manuscripts in Portuguese or Spanish (with a mandatory additional abstract and key words in English) may be accepted. Original manuscripts should be sent to the Editor-in-Chief or any of the Editors. Those submitted and authored by more than one author should present the agreement of the co-authors.

Papers should comply with the instructions listed below. (Otherwise they will be sent back to the authors for reformulation.) After being checked for presentation and style, they will then be evaluated by the advisors, i.e., specialists analyzing for originality, scientific quality, and relevance. Approved papers are sent to outside referees. The Editors decide for acceptance or rejection on the basis of the referees' assessment.

### Submission and review of manuscripts

#### Submission of manuscripts

Manuscript should be submitted electronically (MS Word files) at <http://www.rimaeeditora.com.br/JBSE.asp>. Full instructions on how to use the electronic submission will be available at the above site or can be requested by e-mail from the JBSE Editorial Office (jbsecotox@gmail.com). During the submission process, authors are asked to select an appropriate section of JBSE and to provide names and address (including e-mail) of at least five researchers of recognized competence who may be considered as reviewers.

**Revision of manuscripts:** Revised manuscripts must be submitted within two months of the authors' receipt of the referees' reports. Otherwise they will be considered as new submissions.

**Proofs:** The corresponding author will receive proof by e-mail. Proofs must be checked immediately and returned to the JBSE. Corrections to the proofs should be restricted to printer's errors only. Substantial alterations may be charged to the author. The JBSE will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

**Reprints:** Electronic reprints (pdf files) will be sent to the corresponding author.

**Page charges:** JBSE has no page charges for members of SETAC Brazil. A publication charge of US\$ 10.00 per printed page for the first six pages, US\$ 30.00 per page thereafter, will be assessed on manuscripts published by non-members.

#### Preparation of manuscripts

**Sections:** Manuscripts should be divided into the following sections: Title page, abstract, introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgements, references, captions to figures, tables.

**Formats:** All sections of the manuscript must be typed using MS Word (or compatible), letter Times New Roman 12, double-spaced on A4 paper with 2.5 cm margins. To aid reviewers, **number the lines** of the text (go to files, page setup, layout, lines numbering). Pages should be numbered consecutively (at bottom right-hand corner) and footnotes must be avoided. Mark the position of each figure and table in the margin. The full Latin names of all species used in this study must be supplied.

**Length:** Authors should keep the length of research papers below 10 journal pages (approximately 3.2 double-spaced typewritten pages equal one page of printed type) and limit the number of references (maximum of 40), figures and tables.

**Title pages:** The title should be sort, concise and informative. Consult a recent issue of JBSE for author format. The author's name should be followed by his/her department, institution, city, and country. Indicate the author to whom correspondence and proofs should be addressed and supply full postal address, phone and fax numbers and e-mail address.

**Abstract:** The second page of the manuscript must contain only the abstract and the key words. The abstract should be a single paragraph not exceeding 200 words. Non-standard abbreviations and reference citations should be avoided.

**Key words:** Up to eight key words, which may or may not appear in the title, should be listed in alphabetic order after the abstract.

**Tables:** Each table, including headings and legend (at the top), should be on a separate page. Number tables consecutively using Arabic numerals. Do not duplicate information in the text or data presented in graphic forms. Very long tables are discouraged and very short ones should be combined, when possible. Insert rules at the head, below column headings and foot of each table.

**Illustrations:** Photographs, charts and diagrams (limited to 6) are to be referred to as "Figures" and should be ordered consecutively. Figures should not duplicate information found in tables. Include titles and explanatory legends for all illustrations on a separate sheet placed before the figures. Label multipart figures with consecutive letters of the alphabet. Line drawings should be intensely black on white. Halftones do not reproduce well and must be submitted as photographs with good contrast and sharp focus throughout. Authors must assume the costs of printing color photographs or prints on glossy stock. Avoid small dotted lines, shading, and stippling, which do not reproduce well. Be certain that symbols and lettering will be legible after reduction.

**References:** All publications cited in the text should be presented in alphabetic order in a list following the manuscript. In the text refer to the author's name and year of publication (i.e. Reis (1998) or (Reis, 1998)). For two authors, use the ampersand (&); for more than two authors the name of the first author should be followed by "et al.". References cited together in the text should be arranged chronologically. The List of references (on a separate sheet) should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. Names of all authors must be included. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2000a, 2000b, etc. Unpublished work will not be listed in this section unless it is "in press". Abbreviations should follow the "World List of Scientific Periodicals" published by Butterworths, London.

References must follow the relevant examples below.

AXELSSON, M. & FARRELL, A. P., 1993, Coronary blood flow in vivo in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Am. J. Physiol.*, 264: 963-971.

MROSOVSKY, N. & YNTEMA, C. L., 1981, Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: implications for conservation. In: K. A. Bjorndal (ed.), *Biology and conservation of sea turtles*. Smithsonian, Inst. Press in Coop. World, Wildlife Fund. Inc., Washington, D.C.

REIS, J., 1998, Microbiologia, pp. 3-31. In: M. G. Ferri & Shozo Motoyama (orgs.), *História das ciências no Brasil*. EDUSP e EPU, São Paulo, 2ª vol., 468p.

RIZZINI, C. T., 1979, *Tratado de fitogeografia do Brasil. Aspectos sociológicos e florísticos*. HUCITEC, São Paulo, 2ª vol., 374p.

## AIMS AND SCOPE

The development of Ecotoxicology in Brazil deserves not only scientific but also educational and economical consideration. Existing data indicate a modest investment in research and development in Latin American countries, with the exception of Brazil where it represents almost 1% of the gross domestic product, and Mexico where the investments in research were doubled between 1990 and 2003 (Hermes-Lima & Navas, 2006. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 142:157-162). However, the development of scientific areas (such as Ecotoxicology) depends not only on investments but also on the availability of qualified personal (Hermes-Lima & Navas, 2006). Even though critical in this region, the scientific knowledge is showing an improvement in Latin America. In some countries (i.e. Brazil), the number of scientific papers published has exponentially increased between 1998 and 2001 (de Meis et al., 2003. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 36: 1135-1141), whilst in others it has almost doubled during the same period (Hermes-Lima & Navas, 2006). This trend is expected to continue in the future and is reflected by the creation of specialized journals. Thus, the *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* (JBSE), published by SETAC Brazil, is a scientific journal committed to work as a forum for discussion of several aspects related to the development of Ecotoxicology, covering all fields of environmental chemistry, environmental toxicology and risk assessment. Through peer-reviewed research papers, short communications, and review articles, the JBSE publishes original research in English (preferably), Portuguese or Spanish every three months, furthering scientific knowledge and disseminating valuable information that can be used for the development of ecologically acceptable practices and principles, enhancing the ecological health and human welfare in the region.

### **Editorial, publishing, subscription and advertising offices**

Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, FURG/DOc, Av. Itália km 8 s/no, Carreiros, Rio Grande, RS, Brazil, 96201-900. Tel. +55 53 32336738; FAX: +55 53 32336601; E-mail: [jbsecotox@gmail.com](mailto:jbsecotox@gmail.com).

**Manuscripts:** For manuscript preparation guidelines, see the "Instructions to Contributors" published in Vol. 1, No 1 and, also available at [www.rimaeditora.com.br/jbse.asp](http://www.rimaeditora.com.br/jbse.asp).

**Proofs and reprints:** Galley proofs are sent by the Editorial Office to the author who submitted the manuscript. Proofs should be checked and returned as soon as possible (preferably within 48 hours). Electronic reprints (pdf file) are sent to author who published a manuscript.

**Annual subscription rates – 2006:** Members of SETAC Brazil: Professionals – free of charge (in Brazil) and US\$ 30.00 (other countries). Students – R\$ 20.00 (in Brazil) and US\$ 30.00 (other countries). Non-members: Professionals – R\$ 100.00 (in Brazil) and US\$ 80.00 (other countries). Students – R\$ 80.00 (in Brazil) and US\$ 80.00 (other countries). Institutions – R\$ 150.00 (in Brazil) and US\$ 80.00 (other countries).

**Back issues:** Back issues of all previously published volumes are available directly from the Subscription Office.

Copyright © 2006 SETAC Brazil.

**Copyright notice:** It is a condition for publication that manuscripts submitted to this journal have not yet been published and will not be simultaneously submitted or published elsewhere. By submitting a manuscript, the authors agree that copyright for their article is transferred to the Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia (SETAC Brazil) if and when the article is accepted for publication. The copyright covers the exclusive rights to reproduce and distribute articles, including reprints, photographic reproductions or any other reproduction of a similar nature, including translations. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without permission of the publisher.

**Photocopying information:** In the USA, users may clear permissions and make payments through the Copyright Clearance Center, Inc., 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA; phone: (+1) 978 7508400; fax: (+1) 978 7504744; and in the UK through the Copyright Licensing Agency Clearance Service (CLARCS), 90 Tottenham Court Road, London, W1P 0LP, UK; phone: (+44) 20 7631 5555; fax: (+44) 20 7631 5500. Other countries may have a local reprographic rights agency for payments.

**Notice:** While every effort is made by the JBSE, editors and editorial board to see that no inaccurate or misleading data, opinions or statements appear in this journal, they wish to make it clear that the contents of the articles and advertisements published herein are the sole responsibility of the contributors or advertisers concerned. Accordingly, the JBSE, the editorial board and editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any inaccurate or misleading data, opinion or statement.

The paper used in this publication meets the requirements of ANSI/NISO Z39.48-1992 (Permanence of paper).

Printed in Brazil

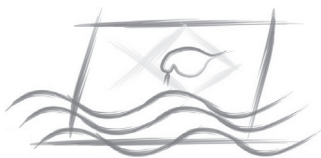
Graphics production: RiMa Editora

Print: Gráfica e Editora Vida e Consciência

### **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**

FURG/DOc, Av. Itália Km 8 s/no, Carreiros, Rio Grande, RS, Brazil

CEP 96201-900. Tel. +55 53 32336738; FAX: +55 53 32336601; E-mail: [jbsecotox@gmail.com](mailto:jbsecotox@gmail.com)



SETAC – Brazil

## Aplicação do Teste de Assimilação e Dissimilação (A-D) para Observação de Efeitos Tóxicos em Águas Superficiais

C. G. CHIOCHETTA<sup>1\*</sup> & M. CHIOCHETTA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS

<sup>2</sup>Universidade de Passo Fundo, Campus 1, km 171, BR 285, Bairro São José, C. P. 611, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS

### RESUMO

O Teste A-D é uma combinação de testes de orientação, baseado nos efeitos tóxicos dos processos autotróficos e heterotróficos básicos em um ecossistema aquático. São utilizadas culturas mistas de Clorofíceas em solução nutritiva específica e culturas de bactérias aeróbias adaptadas ao consumo de Peptona. O presente trabalho tem por objetivo a interpretação da inibição da produção e do consumo de oxigênio como critério da avaliação toxicológica de águas superficiais. No Teste de Assimilação os valores de inibição da produção de oxigênio aumentam em dependência da concentração da água do arroio e da presença de substâncias em suspensão. Nos Testes de Dissimilação os valores de inibição do CBO das bactérias ficam dentro da faixa de  $\pm 10\%$ , considerado NOEL no Teste A-D. A conclusão sugere, então, a necessidade de adaptação e aperfeiçoamento do Teste de Dissimilação.

*Palavras-chave:* inibição, oxigênio, alga, bactéria.

### ABSTRACT

#### Application of the Assimilation and Dissimilation (A-D) Test to observe the toxic effect in superficial waters

The A-D Test is a combination of orientation tests, based on the toxic effects of basic the autotrophic and heterotrophic processes in an aquatic ecosystem. The present work has as objective the interpretation of the oxygen production inhibition in Chloroficeas mixing cultures and the oxygen consumption in bacterium cultures, as a toxicity superficial water evaluation criterion. The inhibition values of oxygen production increase according to the concentration of water in the stream and the substance presence in suspension. In the Dissimilation Tests the values of CBO inhibition of the bacterium are about 10%, considered NOEL in the A-D Test. Then the conclusion suggests the necessity of an adaptation and improvement of the Dissimilation Test.

*Key words:* inhibition, oxygen, algae, bacteria.

### INTRODUÇÃO

Os testes de caráter ecotoxicológicos, também chamados bioensaios, utilizam organismos vivos como indicadores de efeitos tóxicos (Diamond & Daley, 2000). Alguns dos organismos utilizados incluem as algas, *Daphnia*, bactérias e protozoários, pois são simples, econômicos, de resultado rápido e acontecem num período que varia entre 24 e 48 horas.

Têm sido usados, principalmente, para quantificar as toxicidades relativas do tratamento de efluentes de esgoto residencial e industrial, com a finalidade de orientação sem a obrigação de sua quantificação e identificação específica de substância (Sponza, 2003). Tais testes de curto prazo (agudo) possibilitam detectar e avaliar a capacidade inerente de um agente em produzir efeitos deletérios sobre a sobrevivência (mortalidade ou imobilidade) dos organismos

\*Corresponding author: Claudete Gorczewski Chiochetta, e-mail: cgchioch@ucs.br.

expostos (Gunatilleka & Poole, 2000). Possibilitam, por exemplo, a exposição de organismos a diferentes concentrações de substâncias químicas e efluentes por determinado período de tempo (Gherardi-Goldstein *et al.*, 1990). Dentro dessa visão, entre os organismos mais recomendados para os testes de avaliação da toxicidade aquática estão as algas, pois são produtores primários dominantes na cadeia alimentar no ambiente aquático e sensíveis a uma variedade de outros compostos fitotóxicos (Fent, 2003). Outro motivo importante para utilizar algas como organismo-teste deve-se ao fato de que as algas apresentam rápida resposta fisiológica, assim, efeitos deletérios provocados por compostos tóxicos podem ser detectados num curto período de tempo. Para Ma *et al.* (2003), a grande variedade de substâncias químicas existentes e a composição indefinida encontrada nos efluentes irão influenciar a capacidade das algas de realizarem fotossíntese, o crescimento e, conseqüentemente, a redução da produção de oxigênio.

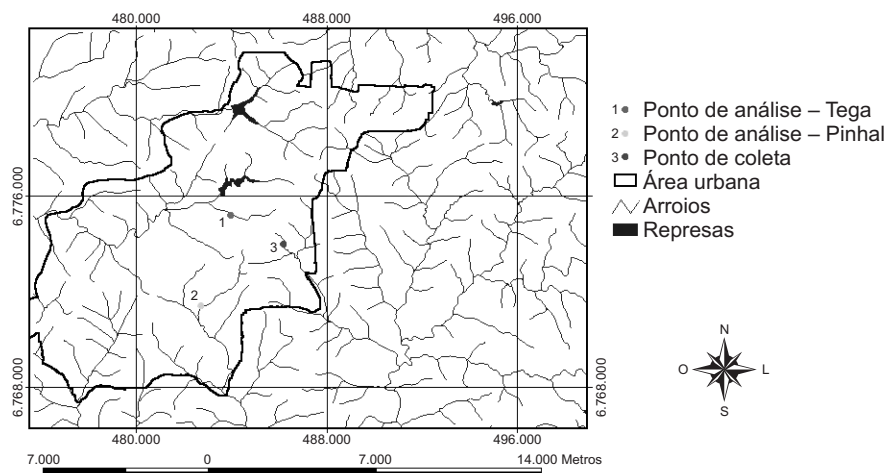
A base metodológica do teste de orientação aplicado neste estudo foi desenvolvida nos anos 50 e 60 do século XX na República Federal da Alemanha e foi chamado de “Potencial de Produção e de Consumo de Oxigênio”. As experiências positivas levaram à proposta de uma norma de avaliação ecotoxicológica de águas superficiais baseada na inibição dos processos de Assimilação e Dissimilação. Krebs (1983) concluiu os resultados de um projeto solicitado pelo Ministério Federal do Interior da República Federal da Alemanha para a criação

de uma norma nacional, chamada de “Teste de Assimilação e Dissimilação como critério de uma avaliação ecotoxicológica da qualidade da água”. O presente trabalho tem por objetivo investigar o efeito de amostras de águas poluídas de dois arroios do município de Caxias do Sul, RS, na taxa de produção de oxigênio de uma cultura mista de Clorofíceas e no consumo de oxigênio por bactérias aeróbias heterotróficas adaptadas ao consumo de Peptona.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todas as análises foram realizadas no laboratório de Limnologia e Toxicologia do Instituto de Biotecnologia na Universidade de Caxias do Sul.

a) *Área de Estudo e Amostra.* Caxias do Sul localiza-se no divisor de água de duas bacias hidrográficas: uma abrange sul, sudeste e nordeste da cidade, através do arroio Pinhal, que deságua no rio Caí; a outra abrange as regiões norte, nordeste e sudeste, através do arroio Tega, que após atravessar toda a cidade, no sentido leste-oeste, deságua no rio das Antas, que se junta ao rio Jacuí e, em seguida, ao Guaíba. A Figura 1 indica a localização dos pontos de coleta das amostras de águas dos arroios Tega e Pinhal para a realização do Testes A-D, assim como o ponto onde foram coletadas as bactérias mantidas no aquário de Dissimilação, para realização de Teste de Dissimilação.



- : coordenadas do ponto de coleta para análise das amostras de águas do arroio Tega para a realização dos Testes A-D: X 484024 Y 6775212.
- : coordenadas do ponto de coleta para análise das amostras de águas do arroio Pinhal para a realização dos Testes A-D: X 482761 Y 6771393.
- : coordenadas do ponto de coleta de águas para a cultura das bactérias usadas na manutenção do aquário de Dissimilação: X 485948 Y 6773971.

**Figura 1** — Mapa hidrográfico do município de Caxias do Sul.

b) *Teste de Assimilação*. Tanto a cultura permanente como a pré-cultura são mantidas sob as mesmas condições padronizadas. A cultura permanente é mantida aerada, com iluminação contínua e troca de meio a cada semana para manter a cultura em crescimento constante. Três dias antes do teste, a pré-cultura é retirada da cultura permanente e deve atingir o crescimento exponencial para a realização do teste. A solução nutritiva utilizada na preparação e realização do Teste A segue a ISO 8692 (1989). Na preparação dos testes coloca-se água destilada correspondendo a  $\frac{3}{4}$  do volume do balão volumétrico de dois litros. Após, são adicionados 200 ml da solução nutritiva de concentração 10 vezes maior que a da pré-cultura, mais o volume do meio a ser testado e o volume da suspensão de pré-cultura de algas necessário para obter concentração de 50000 cél/ml e, finalmente, o volume de 2 litros é completado com água destilada. O controle é feito com água destilada. Tanto o controle como as diluições são distribuídos em seis frascos de Winkler. Para cada diluição, três frascos são colocados em uma câmara climatizada com iluminação de 120  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  a 20°C de temperatura e três são mantidos no escuro, também à temperatura de 20°C. O teor de oxigênio é medido em todos os frascos antes e depois da exposição de 24 horas. As diluições são de 10, 20, 30, 40 e 50% do efluente. A *Produção Bioquímica de Oxigênio* (PBO) em 24 horas ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) =  $\text{O}_2$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) final claro –  $\text{O}_2$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) final escuro. A inibição da produção de oxigênio é calculada através de:

$$I_p (\%) = \frac{(\text{PBO}_n - \text{PBO}_c) * 100}{\text{PBO}_c}$$

em que:

$I_p$  = inibição da produção de oxigênio (%);  
 $\text{PBO}_n$  = produção de oxigênio na diluição n;  
 $\text{PBO}_c$  = produção de oxigênio no controle.

c) *Teste de Dissimilação*. As bactérias são obtidas a partir de uma incubação com populações de água superficial não poluída e adaptadas ao consumo regular de 0,1  $\text{mg.L}^{-1}$  de Peptona. A água de Dissimilação deve ser aerada e mantida em sala climatizada com temperatura de 20°C e sem iluminação. O objetivo é a manutenção de uma água com potencial de consumo de oxigênio baixo. Para a realização do teste é adicionada uma quantidade de Peptona 100 vezes maior do que na água de Dissimilação, nas séries de diluição e no controle, isso para atingir um valor de  $5 \pm 1$   $\text{mg.L}^{-1}$ . As diluições são as mesmas do Teste de Assimilação e feitas com água de dissimilação. As soluções preparadas e o controle são distribuídos em três frascos de Winkler. Calcula-se o valor de inibição. O *Consumo Bioquímico de Oxigênio* (CBO) em 24 horas ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) =  $\text{O}_2$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) inicial –  $\text{O}_2$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) final. A inibição do consumo de oxigênio é calculada através de:

$$ID (\%) = \frac{(\text{CBO}_n - \text{CBO}_c) * 100}{\text{CBO}_c}$$

em que:

$I_D$  = inibição do consumo de oxigênio (%);  
 $\text{CBO}_n$  = consumo de oxigênio na diluição n;  
 $\text{CBO}_c$  = consumo de oxigênio no controle.

A medição do teor de oxigênio é realizada através do oxímetro WTW Oxi 330.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A manutenção das culturas permanentes e mistas de algas Clorófitas foi observada diariamente através de medidas de absorvância no espectrofotômetro. Verificou-se, através de curvas de crescimento das culturas, que as pré-culturas atingem, na média, a sua fase exponencial em três dias a partir da incubação (Figura 2). Esse padrão de crescimento já observado por outros autores é o recomendado por métodos oficiais de ensaios de toxicidade com algas (ISO, 1989; Reginatto, 1998). Já a manutenção das bactérias do aquário de Dissimilação, com potencial de CBO contínuo em torno de 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$ , foi obtida com a adição diária de 0,1  $\text{mg.L}^{-1}$  de Peptona seca e granulada.

As amostras foram aeradas durante 24 a 48 horas por ter sido constatada ausência de oxigênio, provavelmente devido à alta poluição orgânica por esgotos domésticos não tratados e intensa descarga industrial. Os testes com água homogeneizada e decantada foram realizados devido à alta quantidade de material em suspensão nas águas dos arroios, considerado como mais importante matriz para fixação de substâncias tóxicas, como metais pesados e agrotóxicos.

O Teste de Assimilação utiliza culturas de algas multi-específicas e avalia a inibição da Produção Bioquímica de Oxigênio (PBO) dessas culturas em relação ao meio a ser testado. Ocorreu uma tendência comum em todas as amostras. Após a aeração das amostras constatou-se que as águas dos arroios de Caxias do Sul inibem a PBO das algas Clorófitas. Entretanto, a inibição mais forte ocorreu nas amostras homogeneizadas e coletadas em final de semana: observou-se situação mais crítica devido ao lançamento clandestino de esgotos industriais. O resultado evidencia as diferenças dos ensaios em dependência da aeração das amostras (Figura 3). O que pode levar à conclusão de que a presença de substâncias em suspensão nas amostras aeradas e homogeneizadas são responsáveis pelo aumento da inibição da produção de oxigênio pelas algas. A diferença parece não se dever à limitação da luz, tendo em vista que houve precipitação da suspensão durante o teste.

Como não foram realizadas análises de água para metais pesados, não se pode concluir sobre as causas. Oanh & Bengtsson (1995) também verificaram que os maiores valores de toxicidade para *Selenastrum capricornutum* ocorrem em amostras de águas de rios testados em dias de maior despejo de dejetos industriais e de menor controle ambiental pelas autoridades, como aconteceu na amostra coletada em finais de semana.

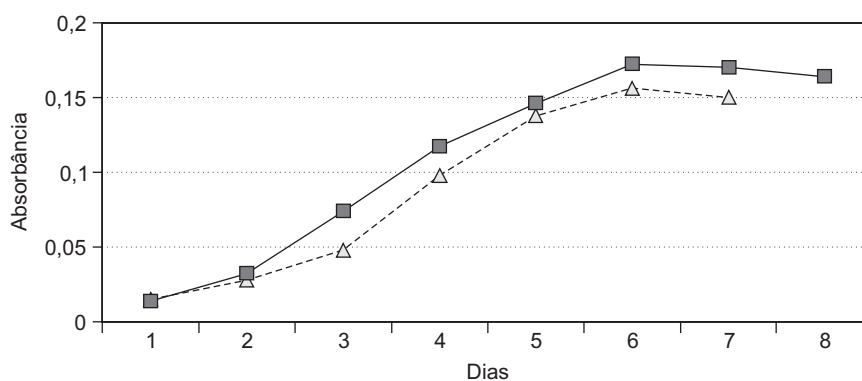


Figura 2 — Curvas de crescimento de duas culturas mistas de Clorofíceas.

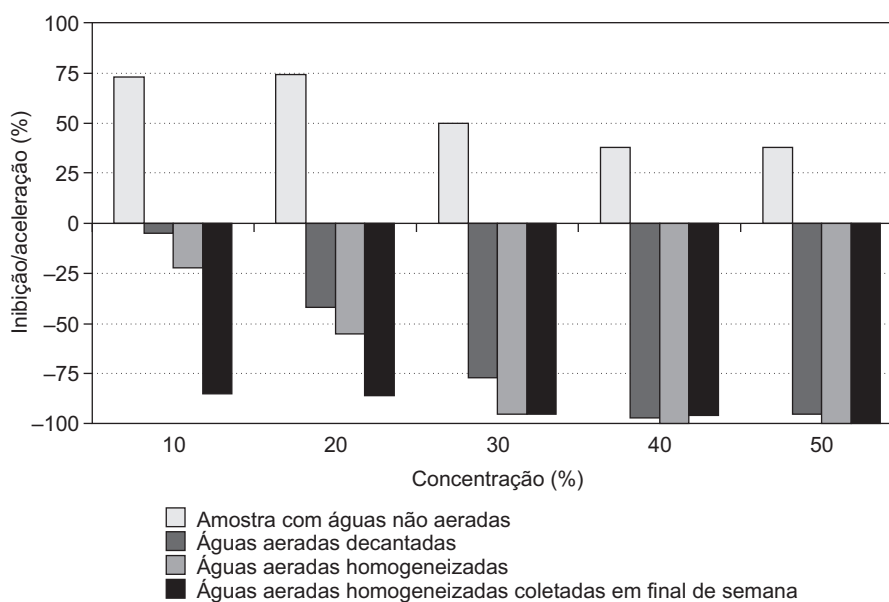


Figura 3 — Inibição/aceleração (%) da Assimilação em Clorofíceas com diferentes amostras.

O Teste de Dissimilação utiliza culturas de bactérias aeróbias adaptadas ao consumo de Peptona e avalia a inibição do Consumo Bioquímico de Oxigênio (CBO) dessas bactérias em relação ao meio a ser testado. As águas superficiais do município de Caxias do Sul mostraram alta taxa de DBO, mesmo diluída, que tornou impossível detectar qualquer inibição na decomposição da Peptona. Para reduzir ou até evitar um provável efeito da DBO nos testes, foram feitos ensaios após cinco dias de aeração da amostra ( $DBO_5$ ). O resultado mostra reação muito fraca, dentro dos limites de 10%, considerados como NOEL no Teste A-D (Figura 4).

As experiências realizadas com águas dos arroios do município de Caxias do Sul mostram que a aplicação do teste de Dissimilação deve ser aprimorada ou talvez até modificada para possibilitar a sua aplicação como teste de orientação em águas poluídas por esgotos cloacais e com taxas elevadíssimas de DBO. Pode-se concluir, então, que em locais com alta DBO não há inibição das bactérias *in situ*, conseqüentemente, não pode haver efeito negativo nas bactérias do teste. Mais estudos em águas superficiais de distintos níveis de poluição e contaminação poderão contribuir para esclarecer a função da DBO e dos nutrientes na aplicação do Teste de Assimilação e Dissimilação.

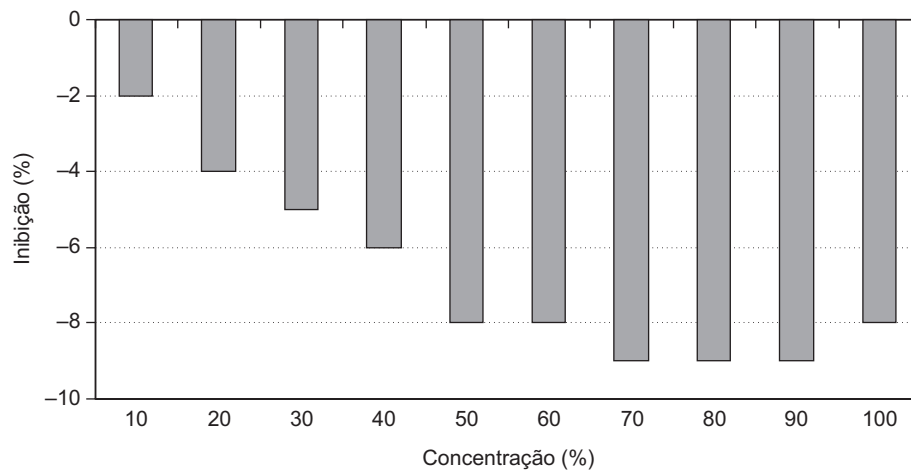


Figura 4 — Inibição da Dissimilação em diferentes concentrações da água do arroio aerada durante 5 dias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DIAMOND, J. & DALEY, C., 2000, What is the relationship between whole effluent toxicity and instream biological condition? *Environ. Toxicol. Chem.*, 9: 158-168.
- FENT, F., 2003, Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol. Lett.*, 140-141: 353-365.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E., BERTOLETTI, E., ZAGATTO, P. A., ARAÚJO, R. P. A. & RAMOS, M. L. L. C., 1990, *Procedimentos para a utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*. CETESB, São Paulo, 17p.
- GUNATILLEKA, A. D. & POOLE, C. F., 2000, Models for estimating the non-specific toxicity of organic compounds in short-term bioassays. *Analyst.*, 125: 127-132.
- ISO 8692, 1989, International Standardization Organization. *Water quality – fresh algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* e *Selenastrum capricornutum**. Geneva.
- KREBS, F., 1983, Der Assimilations-Zehrungstest (A-Z Test): Durchführung und apparative Ausstattung. *Gewässerschutz, Wasser und Abwasser*, 63: 125-171.
- MA, M., ZHU, W., WANG, Z. & WITKAMP, G. J., 2003, Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. *Aquat. Toxicol.*, 63: 221-228.
- OANH, N. T. K. & BENGTTSSON, B-E., 1995, Toxicity to microtox, microalgae and duckweed of effluents from the bai bang paper company (BAPACO), a vietnamese bleached kraft pulp and paper mill. *Environ. Pollut.*, 90: 391-399.
- REGINATTO, V., 1998, *Avaliação do ensaio de toxicidade com a alga *Scenedesmus subspicatus* para o estudo de efluentes industriais*. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- SPONZA, D. L., 2003, Application of toxicity tests into discharges of the pulp-paper industry in Turkey. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 54: 74-86.



SETAC – Brazil

## Redução da Toxicidade do Surfactante LAS Tratado com o Feixe de Elétrons

M. F. ROMANELLI,\* G. P. SILVA & S. I. BORRELY

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN-SP, Centro de Tecnologia das Radiações – CTR,  
Laboratório de Ensaio Biológicos Ambientais, Av. Professor Lineu Prestes, 2.242, Cidade Universitária, São Paulo, SP

### RESUMO

Os surfactantes, princípio ativo dos detergentes, são importantes causadores de poluição do ambiente aquático, freqüentemente encontrados em efluentes industriais e domésticos. A presença de surfactantes pode causar sérios distúrbios ecológicos, afetando organismos aquáticos, inclusive peixes. Alguns estudos têm demonstrado a eficiência do tratamento de efluentes com feixe de elétrons, que apresentam compostos orgânicos contaminantes, observando-se importante redução desses compostos após o tratamento. Neste trabalho foram realizados testes de toxicidade aguda e crônica com os organismos *Daphnia similis*, *Vibrio fischeri* e *Ceriodaphnia dubia* para a avaliação da toxicidade causada pelo surfactante ácido dodecil p-benzenosulfonato, o LAS, que é o surfactante aniônico mais utilizado mundialmente. As soluções de LAS, em água destilada, foram tratadas com feixe de elétrons para o estudo da degradação desse surfactante pela radiação ionizante e do conseqüente percentual de redução da toxicidade aguda e crônica. Os resultados obtidos demonstraram redução da toxicidade aguda entre 30,04% e 68,94% e entre 47,50% e 64,99% da toxicidade crônica, utilizando-se as doses de radiação 3,0 kGy, 6,0 kGy, 9,0 kGy e 12,0 kGy. As doses 3,0 kGy e 6,0 kGy foram as mais efetivas na redução da toxicidade do LAS. A redução da concentração do LAS, em mg/L, a partir da quebra da molécula do surfactante pela radiação ionizante, foi acompanhada pelo Método do Azul de Metileno, também conhecido como MBAS. A radiação ionizante demonstrou elevada eficiência na redução da concentração e da toxicidade do surfactante estudado.

*Palavras-chave:* LAS, toxicidade, radiação ionizante, MBAS.

### ABSTRACT

#### Linear Alkylbenzene Sulfonate toxicity removal when this surfactant is treated by electron beam radiation

Surfactants, as detergent active substances, are also an important source of pollution causing biological adverse effects to aquatic organisms. The presence of surfactants may cause serious ecological disturbances, so affecting aquatic organisms, including fishes. Several studies have demonstrated the efficiency of effluent treatment with electron beam that can contain organic compounds as contaminants, and a big reduction being observed after the treatment. In the present work acute and chronic toxicity tests were performed with the organisms *Daphnia similis*, *Vibrio fischeri* and *Ceriodaphnia dubia* for the toxicity evaluation caused by the surfactant dodecyl p-benzenesulphonate acid, LAS, that is the most used anionic surfactant worldwide, in distilled water. The LAS solution was treated with electron beam in order to study the degradation of this surfactant by the ionizing radiation and the percentage of the acute and chronic toxicity reduction. The results obtained showed a acute toxicity reduction between 30.04% and 68.94% and between 45.70% and 64.99% for the chronic toxicity, using radiation doses of 3.0 kGy, 6.0 kGy, 9.0 kGy and 12.0 kGy. The doses of 3.0 kGy and 6.0 kGy were the most effective for the toxicity reduction of LAS. The concentration reduction, in mg/L, due to the cleavage of the surfactant molecule by the ionizing radiation, was monitored by the Methylene Blue Method, also known as MBAS. The ionizing radiation showed high efficiency for the concentration and toxicity reduction of the surfactant that was studied.

*Key words:* LAS, toxicity, ionizing radiation, MBAS.

\*Corresponding author: Maria Fernanda Romanelli, e-mail: mfromane@ipen.br.

## INTRODUÇÃO

Os surfactantes, princípio ativo dos detergentes sintéticos, representam importante fonte de poluição, causando efeitos biológicos adversos a organismos aquáticos. O consumo mundial de surfactantes é de cerca de 8 milhões de toneladas por ano (Scott & Jones, 2000). O surfactante LAS ( $C_{12}H_{25}C_6H_4SO_3Na$ ) representa de 25% a 30% de todos os surfactantes utilizados mundialmente tanto em formulações domésticas como em processos industriais (Temminck & Klapwijk, 2004).

Estudos têm demonstrado os distúrbios ecológicos causados por altas concentrações de surfactantes em corpos receptores e em estações de tratamento de efluentes (Sandbacka et al., 2000). Em efluentes não tratados, diferentes classes de surfactantes podem estar presentes em concentrações suficientes para causar problemas toxicológicos a organismos aquáticos (Zagatto & Goldstein, 1991).

O sistema biológico de tratamento de efluentes e degradação de compostos orgânicos é o mais utilizado atualmente. Entretanto, em situações em que cargas muito tóxicas de efluentes chegam às estações de tratamento, a toxicidade compromete a eficiência do sistema, necessitando-se muitas vezes de uma forma de pré-tratamento do efluente (Borrely et al., 2000).

A radiação ionizante tem demonstrado elevada eficiência na decomposição de substâncias orgânicas e contaminantes ambientais de esgotos, lodos e efluentes, e poucos trabalhos têm incluído aspectos ecotoxicológicos. A eficiência do processo de tratamento por radiação ionizante pode ser avaliada por testes de toxicidade, utilizando-se organismos aquáticos (Borrely et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da radiação ionizante na degradação do surfactante LAS, sob uma abordagem ecotoxicológica. Foram utilizados dois ensaios de toxicidade aguda e um ensaio de toxicidade crônica para a avaliação da eficiência da irradiação com feixe de elétrons na redução da toxicidade do LAS.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Preparação das soluções de surfactante

As soluções de surfactante foram preparadas diluindo-se o ácido p-benzenosulfonato de sódio – LAS ( $C_{12}H_{26}C_6H_4SO_3$ ), marca Oxiteno, em água destilada, a 100 mg/L.

### Irradiação das soluções

A irradiação das soluções foi realizada em um acelerador industrial de elétrons, modelo Dynamitron, de energia de 1,4 MeV e corrente variável de até 25 mA, no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN-SP, utilizando-se as doses de 3,0 kGy, 6,0 kGy, 9,0 kGy e 12,0 kGy. A avaliação da toxicidade do LAS foi realizada antes e após a irradiação das soluções.

## Ensaios ecotoxicológicos

### Ensaio com *Daphnia similis*

O ensaio de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia similis* foi realizado segundo Norma ABNT 12713 (1993). Indivíduos jovens foram expostos a diferentes concentrações de LAS, não-irradiado e irradiado, cujas concentrações variaram entre 4,0% e 30,0%, por 24 horas. A partir do número de organismos imóveis por concentração da amostra foram calculadas as concentrações que causam imobilidade a 50% dos organismos, a CE(I)50, aplicando-se o teste estatístico Trimmed Spearman Karber. Foram realizados 5 ensaios de toxicidade para cada dose de radiação aplicada.

### Ensaio com a bactéria *Vibrio fischeri*

O ensaio de toxicidade aguda com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* foi realizado segundo Método de Ensaio CETESB L5.227 (1987), com o Sistema Microtox®, modelo M-500 da Microbics, utilizando-se 15 minutos de exposição às amostras, em concentrações entre 0,5% e 45,45% de LAS não-irradiado e irradiado. Foram realizados 5 ensaios para cada dose aplicada. A análise estatística foi realizada com a versão 7.82 do programa desenvolvido pela Microbics Corp., calculando-se os valores de CE(I)50 com base na redução da quantidade de luz emitida pelo organismo após a exposição.

### Ensaio com *Ceriodaphnia dubia*

O ensaio de toxicidade crônica com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* foi realizado segundo Norma ABNT 13373 (1995). Apenas um ensaio foi realizado para cada dose. Organismos jovens foram expostos a diferentes concentrações de LAS, não irradiado e irradiado com as doses 3,0 kGy e 6,0 kGy. As concentrações utilizadas variaram entre 1,4 mg/L e 30 mg/L, em um período de exposição de 7 dias. A partir do número médio de organismos jovens produzidos por fêmea, por concentração de LAS, foram calculadas a CENO, que é a maior concentração da amostra que não causa efeito deletério à sobrevivência e reprodução dos organismos, e a CEO, que é a menor concentração que causa efeito deletério à sobrevivência e à reprodução dos organismos. O teste estatístico utilizado foi o teste de “Dunett”, análise de variância, com o programa estatístico “TOXTAT 3.3 Computer Program”.

### Avaliação da eficiência da irradiação

A avaliação da eficiência da irradiação na redução da toxicidade do surfactante LAS foi realizada transformando-se os valores médios ( $n = 5$ ) de CE(I)50 e os valores de CENO obtidos em Unidades Tóxicas (UT), que são unidades diretamente proporcionais à toxicidade, obtidas pelas equações 1 e 2:

$$UT = \frac{100}{CE50} \quad (1)$$

$$UT = \frac{100}{CENO} \quad (2)$$

A partir dos valores de UT foram calculados os percentuais de redução da toxicidade aguda e crônica entre a solução de LAS não-irradiada e as irradiadas, para cada dose aplicada.

**Determinação de surfactantes aniônicos**

A determinação da concentração do LAS nas soluções foi realizada utilizando-se a metodologia de extração por solvente e espectrofotometria, também conhecida como MBAS, segundo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1989). Essa metodologia foi aplicada para o acompanhamento da degradação do LAS nas soluções não-irradiadas e irradiadas com todas as doses aplicadas, e os resultados foram correlacionados com os dados obtidos para a toxicidade.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O surfactante LAS apresentou elevada toxicidade aguda tanto para o teste com *Daphnia similis* (CE(I)50 média igual a 7,84 mg/L) como para o teste com *Vibrio fischeri* (CE(I)50 média igual a 12,51 mg/L). Com a aplicação das doses de radiação os valores de CE(I)50 aumentaram, demonstrando a redução da toxicidade das soluções de LAS. Na Tabela 1 são apresentados os valores de CE(I)50, as UTs calculadas e as porcentagens de redução da toxicidade aguda obtidos com os dois organismos-teste utilizados.

As doses de radiação mais eficientes foram 3,0 kGy e 6,0 kGy, que representaram percentuais de redução entre 62,43% e 68,94% para *D. similis*, respectivamente. Para ensaios

com a bactéria luminescente, a redução nas doses 3,0 kGy e 6,0 kGy representaram 34,23% e 36,79% de redução. Entretanto, aplicando teste de comparação entre grupos com ANOVA verificou-se diferença estatisticamente significativa somente entre o grupo não-irradiado e o irradiado com 3,0 kGy, para *Daphnia similis*, implicando valor de p = 0,0023. Já entre os grupos de amostras tratadas com as doses 3 kGy em relação a 6,0 kGy, 9,0 kGy e 12,0 kGy, não foram obtidos valores de p inferiores a 0,05, não demonstrando diferença estatisticamente significativa entre si.

Ambos os organismos-teste empregados na avaliação da toxicidade do LAS não irradiado demonstraram ser um produto altamente tóxico, com UTs médias que variaram entre 7,99 e 12,75 nas condições estudadas. No ensaio com a *D. similis* foi substancial a diminuição da toxicidade, pois, mesmo considerando o erro estatístico, o LAS não-irradiado tem CE(50) entre 6,37% e 9,31%, enquanto para 3,0 kGy a faixa fica entre 18,57% e 23,21%, portanto, três vezes menos tóxico.

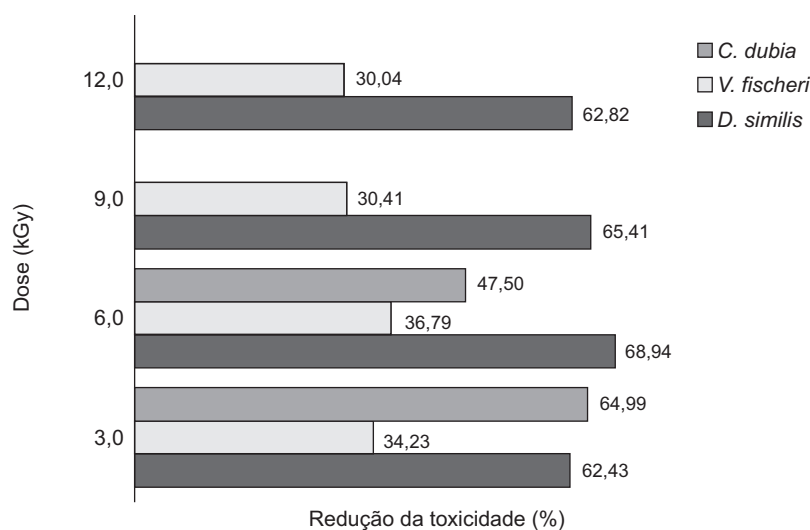
Os ensaios de toxicidade crônica foram realizados apenas com as doses 3,0 kGy e 6,0 kGy, para confirmar o benefício da radiação ionizante também para efeito crônico. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

O LAS também apresentou elevada toxicidade crônica para as Ceriodafnias. As doses de radiação aplicadas mostraram-se bastante eficientes na redução da toxicidade crônica, sendo 3,0 kGy mais efetiva na redução desse efeito.

A Figura 1 apresenta os percentuais de redução de toxicidade do LAS obtidos nos três diferentes ensaios realizados. A redução da toxicidade aguda do LAS variou entre 62,43% e 68,94% para *Daphnia similis* e entre 30,04% e 36,79% para *Vibrio fischeri*, enquanto a toxicidade crônica foi reduzida em 47,50% e 64,99%.

**Tabela 1** — Valores de CE(I)50, unidades tóxicas e porcentagem de redução da toxicidade aguda obtidos a partir dos testes realizados com os organismos *D. similis* e *V. fischeri*, antes e após o tratamento por irradiação, nas diferentes doses aplicadas.

Dose (kGy)	Teste de toxicidade aguda com <i>D. similis</i> (24 h)			Teste de toxicidade aguda com <i>V. fischeri</i> (15 min)		
	CE(I)50%	UT	% Redução	CE(I)50%	UT	% Redução
0	7,84 ± 1,47	12,75	–	12,51 ± 3,40	7,99	–
3,0	20,89 ± 2,32	4,79	62,43	19,03 ± 6,11	5,25	34,23
6,0	25,26 ± 5,34	3,96	68,94	19,81 ± 5,27	5,05	36,79
9,0	22,68 ± 2,54	4,41	65,41	17,98 ± 3,42	5,56	30,41
12,0	21,09 ± 2,78	4,74	62,82	19,87 ± 4,27	5,03	30,04



**Figura 1** — Porcentuais de redução da toxicidade aguda e crônica do surfactante LAS para os organismos *C. dubia*, *D. similis* e *V. fischeri*, em função da dose de radiação aplicada.

**Tabela 2** — Valores de CENO, CEO, unidades tóxicas e porcentagem de redução da toxicidade crônica obtidos a partir dos testes realizados com o organismo *C. dubia*, antes e após o tratamento por irradiação, nas duas doses aplicadas.

Dose (kGy)	CENO (%)	CEO (%)	UT	Redução (%)
0	2,1	3,0	47,62	—
3,0	6,0	9,0	16,67	64,99
6,0	4,0	6,0	25,0	47,50

A bactéria mostrou-se mais sensível ao LAS em relação aos microcrustáceos utilizados, provavelmente em consequência do efeito do surfactante na membrana celular. Segundo Gloxhuber (1980), devido à sua natureza química, os surfactantes podem interagir com os principais componentes da membrana celular, as proteínas e os lipídios. Dependendo de sua concentração, o surfactante será capaz de solubilizar a membrana celular, apresentando ação bactericida. A radiação ionizante também foi eficiente na degradação das moléculas do LAS. A concentração inicial do LAS de 100 mg/L foi reduzida após a aplicação das doses de 3,0 kGy, 6,0 kGy, 9,0 kGy e 12,0 kGy, sendo os valores de concentração obtidos, respectivamente, 13,78 mg/L  $\pm$  4,53, 6,47 mg/L  $\pm$  0,87, 4,43 mg/L  $\pm$  0,33 e 2,55 mg/L  $\pm$  1,44. Esses resultados obtidos realmente comprovam a degradação do LAS pela radiação ionizante. A Figura 2 mostra a degradação do LAS em função das doses de radiação aplicadas.

Os resultados obtidos para a degradação do surfactante pela radiação mostram que, quanto maior a dose de radiação aplicada, maior a redução da concentração do surfactante LAS, resultando em 86,09% a 97,42% de degradação para as doses

de radiação entre 3,0 kGy e 12,0 kGy, respectivamente. Assim, pode-se perceber que a redução da toxicidade ocorreu como consequência da degradação das moléculas do LAS pelo feixe de elétrons. A radiação ionizante pode interagir diretamente com a molécula em questão ou ainda de forma indireta, gerando espécies químicas altamente reativas, os radicais livres. Segundo Rohrer (1975), a degradação do surfactante submetido à irradiação ocorre pelo ataque das espécies oxidantes que se formam a partir da radiólise da água.

A radiação ionizante utilizada neste trabalho apresentou elevada eficiência tanto para a degradação quanto para a redução da toxicidade do LAS. A toxicidade elevada apresentada pelo LAS demonstra a importância de estudar novas tecnologias de tratamento de efluentes, melhorando o comportamento desse efluente antes de passar pelo tratamento biológico convencional, baseado na decomposição por microrganismos. A ecotoxicologia é uma importante ferramenta que pode ser utilizada a favor do ambiente aquático, no estudo de contaminações ambientais e também na avaliação da eficiência de sistemas de tratamento de efluentes, com relação à redução da toxicidade.

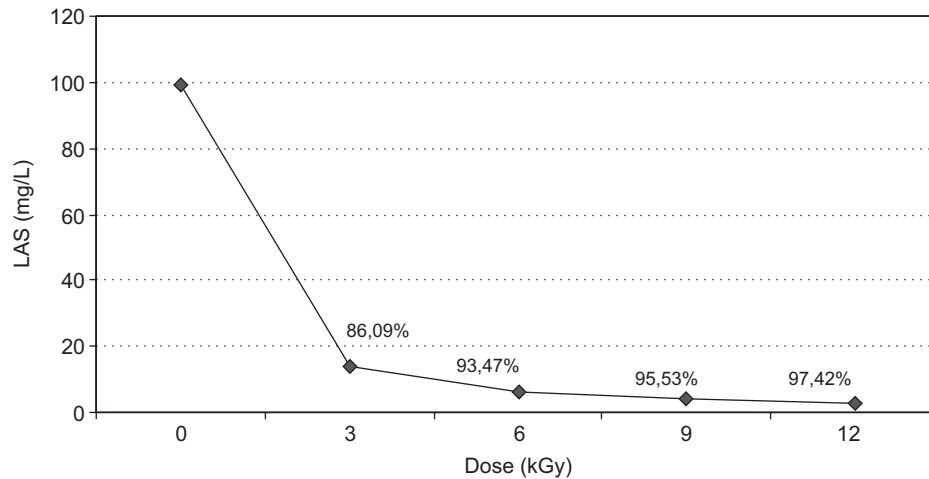


Figura 2 — Porcentuais de degradação das moléculas de LAS pela radiação ionizante, nas diferentes doses aplicadas.

## CONCLUSÃO

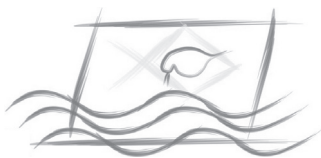
A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que o surfactante LAS apresentou elevada toxicidade aguda e crônica e que a irradiação desse surfactante pode contribuir para redução da toxicidade, com as doses de 3,0 kGy e 6,0 kGy, nas condições em que os ensaios foram realizados.

*Agradecimentos* — Os autores agradecem ao IPEN/CNEN-SP, onde este trabalho foi realizado, e ao CNPq, pelo apoio recebido com bolsas de Iniciação Científica de Mestrado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAM PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1989, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 17 ed. APHA, AWWA, WEF, New York.
- ABNT, 1993, *Água – Ensaio de toxicidade aguda com cladocera (Crustacea, Branchiopoda)*. NBR 12713.
- ABNT, 1995, *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com Ceriodaphnia ssp. (Cladocera, Crustacea)*. NBR 13373.

- BORRELY, S. I., SAMPA, M. H. O., PEDROSO, C. B., OIKAWA, H., CHERBAKIAN, C. G. & SANTOS, M. C. F., 2000, Radiation of wastewater evaluated by toxicity assays. *Radiat. Phys. Chem*, 57: 507-511.
- CETESB L5.227, 1987, *Bioensaio de toxicidade aguda com Photobacterium phosphoreum*, *Sistema Microtox*. (Método de Ensaio). São Paulo.
- GLOXHUBER, C., 1980, *Anionic surfactants: biochemistry, toxicology, dermatology*. Surfactant Sciences Series, v. 10. Ed. Dekker.
- ROHER, D. M., 1975, Effects of gamma radiation from  $^{60}\text{Co}$  on dilute aqueous solutions of linear alkyl sulfonate surfactants and other organic pollutants. In: *Radiation for a Clean Environment of a Symposium*, March 17-21, Munich. Proceedings of a Symposium, pp. 241-248.
- SANDBACKA, M., CHRISTIANSON, I. & ISOMAA, B., 2000, The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish – A comparative study. *Toxicol. Vitro*, 14: 61-68.
- SCOTT, M. J. & JONES, M. N., 2000, The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochim. Biophys. Acta.*, 14: 61-68.
- TEMMINK, H. & KLAPWIJK, B., 2004, Fate of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) inactivated sludge plants. *Water Res.*, 38: 903-912.
- ZAGATTO, P. A. & GOLDSTEIN, E. G., 1991, Toxicidade em águas do Estado de São Paulo. *Revista CETESB de Tecnologia: Ambiente*, 5: 13-20.



## Estudos Laboratoriais de Acúmulo e Toxicidade de Arsênio em *Eichhornia crassipes* e *Salvinia auriculata*

F. P. GUIMARÃES,\* C. Q. GOMES, A. B. S. MAGALHÃES, T. V. FREITAS, J. A. OLIVEIRA & R. AGUIAR

Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

### RESUMO

A avaliação dos efeitos tóxicos do arsênio (As) e a potencialidade de tolerância de *Eichhornia crassipes* e *Salvinia auriculata* ante a este elemento é um importante passo na seleção de plantas a serem utilizadas como potenciais fitorremediadoras. Os indivíduos dessas espécies foram coletados em locais livres de contaminação, desinfetados, aclimatados e submetidos aos tratamentos com As na forma de arseniato de sódio nas concentrações: 0, 0,5, 2,5 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup>. Após sete dias de exposição ao As, as plantas foram lavadas em solução de HCl 0,1N, separadas em raiz e parte aérea, secadas, pesadas e digeridas em água régia. A determinação do As absorvida pelas plantas foi feita por espectrometria de emissão em plasma-ICP. Os resultados indicaram que *S. auriculata* acumulou mais As, apresentando necroses marginais nas folhas, enquanto *E. crassipes* não apresentou nenhuma alteração morfológica visível. A absorção de As pelas plantas aumentou proporcionalmente com a concentração em solução, sendo que *S. auriculata* foi mais sensível. Esse padrão foi observado tanto para raízes quanto para as folhas nas duas espécies, sendo o acúmulo maior nas raízes. No tratamento de 5 mg.L<sup>-1</sup>, *S. auriculata* acumulou uma média de 146,66 µg g<sup>-1</sup> matéria seca de raiz e *E. crassipes* acumulou em média 56,29 µg g<sup>-1</sup> matéria seca de raiz. Provavelmente, o maior acúmulo de As nessa concentração se deve à maior disponibilidade do elemento e à maior proporção arsênio/fosfato na solução, visto que o processo de absorção do arseniato é competitivo com o fosfato. Foram observados, ao longo do experimento, que as plantas-mãe de *S. auriculata*, mesmo tendo os tecidos danificados, foram capazes de emitir plantas-filhas morfológicamente saudáveis. Sugere-se que esse mecanismo de tolerância possa estar relacionado a algum processo que impeça a translocação do arsênio para as plantas-filhas ou a um processo de aclimação à poluição.

*Palavras-chave:* arsênio, toxicidade, acúmulo, *Salvinia auriculata*, *Eichhornia crassipes*.

### ABSTRACT

#### Laboratory study of arsenic accumulation and toxicity in *Eichhornia crassipes* and *Salvinia auriculata*

The evaluation of the toxicity effects of arsenic (As) and the tolerance potential of *Eichhornia crassipes* and *Salvinia auriculata* regarding to this element, is an important step in the selection of plants for the purpose of phytoremediation. Both species were collected at clean water bodies, disinfected, acclimatized and submitted to treatments with As as sodium arsenate at the concentrations: 0, 0.5, 2.5 and 5.0 mg.L<sup>-1</sup>. After seven days of exposure to As, the plants were washed in a solution of HCl 0.1N. Shoot and root tissues were separated, dried and weighed. The As content analyses were carried out by acid digestion of dried tissue samples followed by measurement of total concentration of arsenic by Inductively-Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES). The results indicate that *S. auriculata* accumulated more As, presenting marginal necroses in leaves, while, *E. crassipes* didn't present any visible morphological alteration. The As absorption for both species increased substantially with the external concentration and *S. auriculata* was more sensitive. This effect was found either for roots and shoots in both species, highlight, the higher accumulation in roots. In the treatment of 5.0 mg.L<sup>-1</sup> *S. auriculata* accumulated in roots an average of 146.66 µg As g<sup>-1</sup> dry weight and *E. crassipes* accumulated 56.29 µg g<sup>-1</sup> As dry weight. Probably, the highest As accumulation in this concentration in both species, was

\*Corresponding author: Fernanda Pereira Guimarães, e-mail: fpguimaraes@vicosa.ufv.br.

caused by the highest proportion of arsenic/phosphate in the solution, since the arsenate absorption competes with phosphate. It was observed, along the experiment, that the “parent” plants of *S. auriculata*, although with leaves damaged, produced “daughter” plants healthy. This probably tolerance mechanism can be related to some process that blocks the translocation of arsenic to “daughter” plants or can be a process of acclimatization to the pollution.

*Key words:* arsenic, toxicity, accumulation, *Salvinia auriculata*, *Eichhornia crassipes*.

## INTRODUÇÃO

A contaminação de água por arsênio tem recebido enorme atenção devido ao grande potencial de causar doenças ao homem (Matschullat *et al.*, 2000), como: conjuntivite, hiperqueratose, hiperpigmentação, doenças cardiovasculares, distúrbios do sistema nervoso central e vascular periférico, câncer de pele e gangrena nos membros (Léonard & Lauwerys, 1980). A principal forma de contaminação do homem por arsênio é através da ingestão de água ou peixes contaminados por esse elemento (Matschullat *et al.*, 2000).

A contaminação de ambientes aquáticos por arsênio tem origens naturais e antropogênicas. As fontes naturais são rochas que possuem o arsênio em sua constituição, que ao serem lavadas liberam o mesmo para os corpos d’água. A contaminação de origem antropogênica, principal fonte de contaminação dos ambientes aquáticos, ocorre devido à utilização de produtos agrícolas ou de rejeitos de mineração. Os insumos agrícolas podem conter compostos arsenícos, como o arseniato de chumbo ( $PbHAsO_4$ ) e o arseniato de cálcio ( $CaAsO_4$ ), que são facilmente lixiviados para os corpos d’água (Calzada *et al.*, 1998). Os rejeitos da mineração, através da drenagem ácida, disponibilizam vários metais pesados, como o arsênio, o cádmio e o mercúrio, contaminando o meio ambiente, principalmente os aquáticos (Peterson *et al.*, 1996; Matschullat *et al.*, 2000; Santana-Filho, 2000), o que torna a atividade minerária bastante impactante.

Neste contexto, torna-se importante o estudo de espécies de plantas potenciais bioindicadoras ou fitorremediadoras de ambientes poluídos por arsênio. Várias plantas aquáticas têm sido estudadas e sugeridas como alternativas para solução de problemas de contaminação ambiental, para avaliar a qualidade da água, monitorar metais pesados, dentre outros (Dembitsky & Rezanka, 2003). Os mecanismos de tolerância das plantas a metais pesados podem variar desde a imobilização do metal no meio extracelular até imobilização do metal no vacúolo, com o auxílio de fitoquelatinas (Larcher, 2000).

A avaliação dos efeitos tóxicos do arsênio, bem como da potencialidade de tolerância de *Eichhornia crassipes* (aguapé) e *Salvinia auriculata* (salvínia) diante desse elemento, é um importante passo na seleção de plantas que possam ser utilizadas como potenciais bioindicadoras ou fitorremediadoras de ambientes contaminados por arsênio.

Por serem espécies que apresentam alta taxa de ganho de biomassa, podem ser benéficamente utilizadas como

extratores de poluentes aquáticos. Dessa forma, é de fundamental importância conhecer os efeitos do arsênio sobre estas plantas, bem como a sua potencialidade de absorção, a fim de que possam ser utilizadas em processos de bioindicação e fitorremediação de ambientes poluídos.

O objetivo deste trabalho foi determinar o potencial de absorção de arsênio por *Eichhornia crassipes* e *Salvinia auriculata*, bem como a sintomatologia apresentada por estas plantas quando expostas ao arsênio.

## MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de *Eichhornia crassipes* (aguapé) e *Salvinia auriculata* (salvínia) foram coletadas em tanques, livres de contaminação por arsênio, da Universidade Federal de Viçosa. As plantas passaram por um processo de desinfecção que consistiu na imersão em solução de hipoclorito 1%, por alguns segundos, seguida da lavagem em água corrente e água destilada.

As plantas foram previamente selecionadas, a fim de manter a homogeneidade, e transferidas para vasos com capacidade de 1,5 L de solução. Plantas de aguapé (3 plantas/vaso) e de salvínia (2 plantas/vaso) foram mantidas em solução nutritiva de Hoagland com meia força iônica, por 3 dias, em sala de crescimento sob condições fotoautotróficas adequadas. Essas condições consistiam em temperatura entre 23 e 25°C e fotoperíodo de 16 horas de luz.

Após os três dias de aclimação as plantas foram expostas às seguintes concentrações de arsênio: 0, 0,5, 2,5, 5,0 mgL<sup>-1</sup>, na forma de  $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ , com pH corrigido diariamente para 6,5.

Diariamente foram observadas as alterações morfológicas nas folhas de *E. crassipes* e *S. auriculata*. Após sete dias de exposição, as plantas foram lavadas em solução de ácido nítrico (10%) e em seguida em água desmineralizada com a finalidade de remover o arsênio adsorvido.

As plantas foram separadas em raiz e parte aérea, sendo secas em estufa a 70°C por três dias para obtenção do peso seco. As amostras secas foram mineralizadas com água régia (1:4, v/v, HCl:HNO<sub>3</sub>) em blocos digestores, diluídas em água deionizada, filtradas e analisadas por espectrometria de emissão em plasma-ICP para a determinação da concentração de arsênio acumulado pelas plantas.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições para cada tratamento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Indivíduos de *Salvinia auriculata* foram visualmente mais sensíveis ao arsênio que indivíduos de *Eichhornia crassipes*, que praticamente não apresentaram nenhuma alteração morfológica.

Durante o experimento, *S. auriculata* apresentou necroses marginais a partir do terceiro dia de exposição a  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  de arsênio. Já nas concentrações de  $2,5 \text{ mgL}^{-1}$  e de  $5,0 \text{ mgL}^{-1}$  os sintomas foram visíveis a partir do segundo dia. As áreas das necroses apresentadas pelos indivíduos expostos a  $5,0 \text{ mgL}^{-1}$  de arsênio foram maiores do que as demais (Figura 1). Após sete dias de experimento as folhas de salvinia se encontravam em estado de senescência.

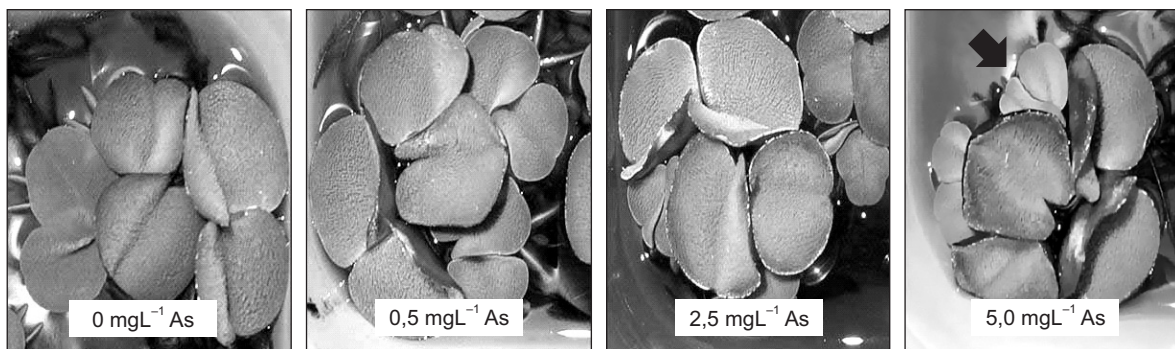
*Eichhornia crassipes* não apresentou alterações morfológicas (Figura 2) nas diferentes concentrações de arsênio, sendo um indicativo de que esta planta pode funcionar como um potencial fitorremediador.

As duas espécies estudadas acumularam mais arsênio nas raízes do que nas folhas. *S. auriculata* acumulou em média  $146,66 \mu\text{g}$  de  $\text{As g}^{-1}$  de matéria seca na raiz, e *E. crassipes* acumulou em média  $56,29 \mu\text{g}$  de  $\text{As g}^{-1}$  de MS de raiz.

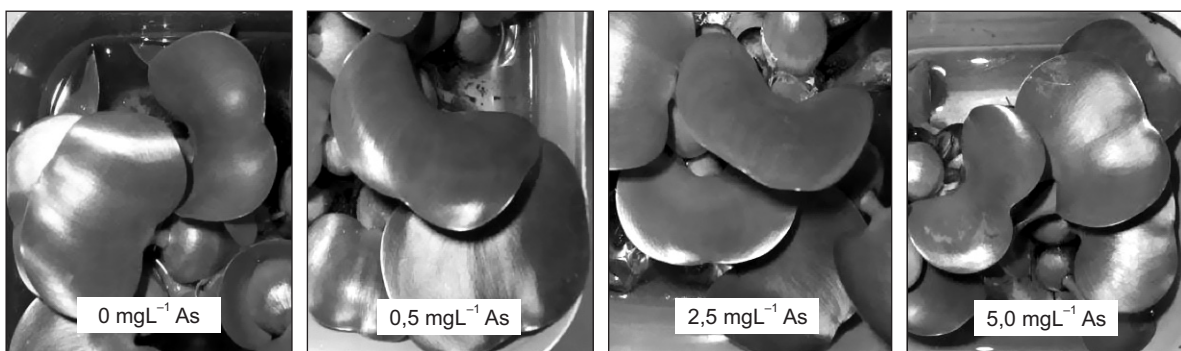
Provavelmente, os sintomas apresentados por salvinia se devem ao maior acúmulo de arsênio por estas plantas. Ao contrário, o aguapé não apresentou sintomas visuais devido ao menor acúmulo de As. Provavelmente essa planta possui mecanismos que impedem a absorção e/ou acúmulo de arsênio.

O acúmulo de As em raiz e folha das duas espécies aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração de arsênio em solução (Figuras 3 e 4). Esse padrão foi verificado através de uma regressão com ajuste em função logística. No entanto, o experimento não evidenciou o valor máximo de acumulação de As, sendo necessária maior concentração deste em solução para que as plantas atinjam esse pico.

O aumento do acúmulo de arsênio pelas plantas está relacionado ao aumento da proporção arsênio/fosfato nos diferentes tratamentos, visto que estes elementos competem pelo mesmo sítio de absorção devido à sua similaridade estrutural (Planas & Healey, 1978; Sanders, 1979). Dessa forma, a sintomatologia mais freqüente do arsênio está relacionada com a deficiência de fósforo, fazendo com que as plantas apresentem pouco crescimento e ocorram necroses amarronzadas nas folhas mais velhas (Taiz & Zeiger, 1991).



**Figura 1** — Alterações morfológicas em plantas de *Salvinia auriculata* expostas a diferentes concentrações de arsênio. Seta indica folhas de plantas-filhas saudias, sem sintomas de toxicidez de arsênio.



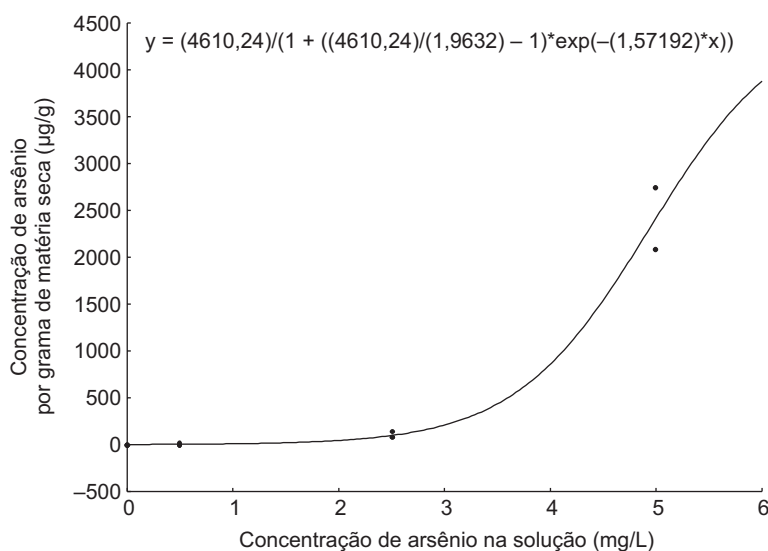
**Figura 2** — Plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes concentrações de arsênio.

Apesar de salvinia ter apresentado sintomas de toxicidade ao arsênio, as plantas-mãe foram capazes de emitir plantas-filhas morfologicamente normais (Figura 1), indicando impedimento da translocação do As ou um processo de aclimação. Este mecanismo de tolerância pode envolver a produção de fitoquelatinas, como ocorre com plantas tolerantes a Cd e Cu (Outridge *et al.*, 1991; Outridge & Hutchinson, 1991). O aumento das fitoquelatinas nas plantas-filhas pode ocorrer devido à translocação de fitoquelatinas das plantas-mãe via tecido vascular ou da síntese “*de novo*” pelas próprias plantas-

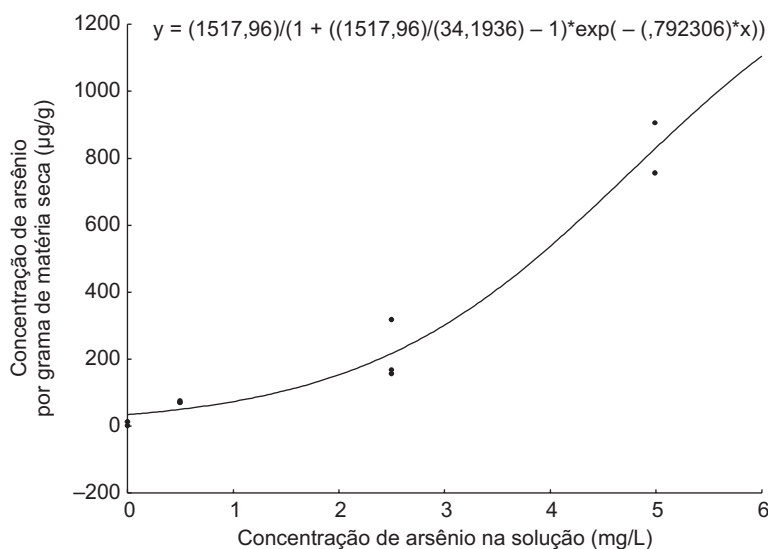
filhas em resposta à translocação dos metais (Outridge *et al.*, 1991; Outridge & Hutchinson, 1991).

Este estudo mostrou que *S. auriculata* foi sensível ao As, podendo ser indicada como modelo para estudos de bioindicação em áreas contaminadas. *E. crassipes* foi tolerante ao elemento, demonstrando potencial como fitorremediador de ambientes aquáticos impactados por arsênio.

No entanto, são necessários estudos mais detalhados sobre as rotas metabólicas, processos de especiação, compartimentalização e translocação do arsênio nos tecidos da planta.



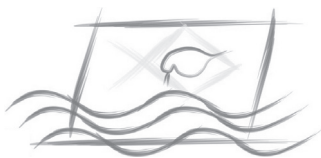
**Figura 3** — Regressão não linear ajustada com uma função logística para acumulação de arsênio nas raízes de *Eichhornia crassipes* ( $R^2 = 0,976$ ). Os tratamentos foram  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $2,5 \text{ mgL}^{-1}$  e  $5,0 \text{ mgL}^{-1}$  de arsênio na solução.



**Figura 4** — Regressão não linear ajustada com uma função logística para acumulação de arsênio nas “raízes” de *Salvinia auriculata* ( $R^2 = 0,968$ ). Os tratamentos foram  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $2,5 \text{ mgL}^{-1}$  e  $5,0 \text{ mgL}^{-1}$  de arsênio na solução.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- CALZADA, A. T., LOJO, M. C. V., BECEIRO-GONZÁLES, E., RODRIGUES, E. A. & RODRIGUES, D. P., 1998, Determination of arsenic species in environmental samples: use alga *Chlorella vulgaris* for arsenic (III) retention. *Trends Analytical Chemistry*, 3: 167-175.
- DEMBITISKY, V. M. & REZANKA, T., 2003, Natural occurrence of arsenic compounds in plants, lichens, algal species and microorganisms. *Plant Science*, 165: 1177-1192
- LARCHER, W., 2000, *Ecofisiologia vegetal*. RiMa Editora, São Carlos, 531p.
- LÉONARD, A. & LAUWERYS, R. R., 1980, Carcinogenicity, teratogenicity and multigenicity of arsenic. *Mutation Research*, 75: 49-62.
- MATSCHULLAT, J., BORBA, R. P., DESCHAMPS, E., FIGUEIREDO, B. R., GABRIO, T. & SCHEWENK, M., 2000, Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle. Brazil. *Applied Geochemistry*, 15: 193-202.
- OUTRIDGE, P. M. & HUTCHINSON, T. C., 1991, Induction of cadmium tolerance by acclimation transferred between ramets of the clonal fern *Salvinia minima* Baker. *New Phytol.*, 117: 597-605.
- OUTRIDGE, P. M., RAUSER, W. E. & HUTCHINSON, T. C., 1991, Changes in metal-binding peptides due to acclimation to cadmium transferred between ramets of *Salvinia minima*. *Oecologia*, 88: 109-115.
- PETERSON, H. G., NYHOLM, N., NELSON, M., POWELL, R., HUANG, P. M. & SCROGGINS, R., 1996, Development of aquatic plant bioassays for rapid screening and interpretive risk assessment of metal mining liquid waste waters. *Water Sci. Tech.*, 33: 155-161.
- PLANAS, D. & HEALEY, F. P., 1978, Effects of arsenate on growth and phosphorus metabolism of phytoplankton. *Journal Phycology*, 14: 337-341.
- SANDERS, J. G., 1979, Effects of arsenic speciation and phosphate concentration on arsenic inhibition of *Skeletonem costatum* (Bacillariophyceae). *Journal Phycology*, 15: 424-428.
- SANTANA-FILHO, S. *Impactos do processo de drenagem ácida sobre recursos hídricos no Estado de Minas Gerais*. 2000. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 173p.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E., 1991, *Plant physiology*. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc, 559p.



SETAC – Brazil

## Método Multigeração para Avaliação dos Efeitos de Poluentes Sobre a Reprodução de Caramujos de Água Doce

E. C. OLIVEIRA-FILHO,<sup>1\*</sup> B. R. GERALDINO,<sup>2</sup>  
C. K. GRISOLIA<sup>3</sup> & F. J. R. PAUMGARTTEN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ecotoxicologia – Embrapa Cerrados, Rod. BR 020 km 18, CEP 73310-970, Planaltina, DF

<sup>2</sup>Laboratório de Toxicologia Ambiental – ENSP/FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, RJ

<sup>3</sup>Laboratório de Genética – IB/UnB, CEP 70910-900, Brasília, DF

### RESUMO

Testes de ecotoxicidade têm sido úteis para nortear ações regulatórias voltadas à prevenção de danos a ecossistemas aquáticos. Os ensaios de rotina são baseados em exposições agudas ou subcrônicas e podem ser inadequados para detectar uma disfunção reprodutiva após prolongadas exposições a baixas concentrações de poluentes. Nesse contexto, propõe-se um método multigeração para avaliar os efeitos de substâncias químicas sobre a reprodução do caramujo *Biomphalaria tenagophila*. As substâncias testadas incluem dois poluentes ambientais: o agrotóxico endossulfan e o componente químico industrial nonilfenol etoxilado. Caramujos adultos (10 por concentração) foram individualmente expostos a concentrações não agudamente letais por duas gerações. Os efeitos avaliados incluem: sobrevivência, fecundidade e desenvolvimento embrionário. Os resultados obtidos mostram que alguns efeitos adversos sobre a reprodução foram observados somente após a exposição contínua por mais de uma geração. Uma comparação com resultados dos clássicos testes crônicos de curta duração mostra que o estudo multigeração proposto parece ser uma abordagem sensível para avaliar efeitos crônicos de poluentes ambientais.

*Palavras-chave:* ecotoxicologia aquática, caramujos, testes de toxicidade, poluição das águas, toxicologia reprodutiva.

### ABSTRACT

#### Multigeneration method to evaluate effects of pollutants on the reproduction of freshwater snails

Ecotoxicity tests have been useful to guide regulatory decisions for pollution control to prevent adverse effects on aquatic ecosystems. Routine assays are based on acute or sub-chronic exposures and may be inadequate for detecting a reproductive impairment after long-term exposure to low concentrations of pollutants. To help address this gap was proposed a multigeneration method to evaluate the effects of chemicals on the reproduction of *Biomphalaria tenagophila* snail. Chemicals tested include two environmental pollutants, the pesticide endosulfan and the industrial chemical nonylphenol ethoxylate. Adult snails (10 per concentration) were individually exposed to non acutely lethal concentrations for two generations. Endpoints evaluated include: survival, fecundity and embryonic development. Results showed that some adverse effects on reproduction were observed only after continuous exposure lasting longer than one generation. A comparative analysis with results of classic short-term chronic tests show that the multigeneration study designed seems to be a sensitive approach to evaluate chronic effects of environmental pollutants.

*Key words:* aquatic ecotoxicology, snails, toxicity tests, water pollution, reproductive toxicology.

\*Corresponding author: Eduardo C. Oliveira-Filho, e-mail: cyrino@cpac.embrapa.br.

## INTRODUÇÃO

O controle da poluição das águas é um dos grandes desafios da população humana na atualidade, visto que as previsões de escassez desse recurso natural vêm gerando preocupação em vários setores da sociedade. Nesse contexto, além das determinações químicas e análises de parâmetros físico-químicos, os testes de ecotoxicidade aquática foram elaborados para fornecer dados qualitativos e quantitativos sobre os efeitos adversos de substâncias químicas em organismos aquáticos e vêm se mostrando muito úteis para orientar decisões de pesquisadores, indústrias e agências ambientais, voltadas para evitar ou minimizar os impactos da poluição hídrica. Os ensaios rotineiramente empregados fundamentam-se em exposições agudas ou subcrônicas, com destaque para os tradicionais testes rápidos de reprodução e desenvolvimento, que podem ser inadequados para detectar aspectos mais sutis da toxicidade, como disfunções reprodutivas após exposições prolongadas.

Desse modo, para avaliar a competência dos métodos existentes na identificação e priorização do perigo, torna-se necessária a geração de dados definitivos de efeitos sobre a reprodução de populações cronicamente expostas (Arcand-Hoy & Benson, 1998) e, nesse ponto, torna-se um pré-requisito fundamental o desenvolvimento de métodos de ensaio multigeração.

Assim sendo, o objetivo do presente trabalho é descrever o protocolo multigeração desenvolvido para gastrópodes aquáticos, utilizando como espécie-teste o caramujo *Biomphalaria tenagophila*, e comparar os resultados obtidos com outros de clássicos testes rápidos de efeitos sobre reprodução e desenvolvimento.

## MATERIAIS E MÉTODOS

*Organismo-teste* – O organismo utilizado no presente estudo é o molusco gastrópode da espécie *Biomphalaria tenagophila*. Os caramujos do gênero *Biomphalaria* são amplamente estudados no Brasil, porque três das suas espécies são hospedeiras intermediárias do *Schistosoma mansoni*, trematódeo parasita causador da esquistossomose mansônica. Por se tratar de uma espécie hermafrodita, os experimentos têm início com a exposição individual de 10 organismos sexualmente maduros (10 réplicas), com aproximadamente 3 meses de idade, por 8 semanas a cada uma das concentrações das substâncias testadas.

*Exposição e Manutenção dos Organismos* – A definição do tempo de duração da exposição da geração F0 (8 semanas) foi baseada nos dados de Andrade & Carvalho (1972), que demonstraram, num acompanhamento da *B. tenagophila* por 20 semanas, que a oitava semana foi uma das que apresentaram maior pico reprodutivo para a espécie mantida no laboratório. Como recipientes-teste foram utilizados copos de vidro, com capacidade de 300 ml. Para evitar a fuga dos caramujos expostos, os copos foram cobertos com fina malha de tecido.

Durante o período de exposição realizaram-se, semanalmente, duas renovações da solução-teste. A cada renovação era fornecida a alimentação e inspecionavam-se os copos para o registro do número de ovos e de desovas por indivíduo. Visando a otimizar a reprodução e o crescimento dos organismos, era oferecido, a cada renovação de solução, o alimento, consistindo em 0,20 mg de ração composta (Freitas *et al.*, 1997) e cerca de 1 cm<sup>2</sup> de alface fresca.

*Substâncias-teste* – As substâncias selecionadas para serem incluídas neste estudo são poluentes previamente documentados no ambiente aquático (Bennie, 1999; Laabs *et al.*, 2002), são suspeitas de terem atividade desreguladora do sistema endócrino e já foram relatadas por afetar adversamente a reprodução de outras espécies. O endossulfan é um inseticida do grupo químico ciclodienoclorado, registrado no Brasil para uso agrícola e como preservante de madeira. Embora apresente baixa solubilidade em água (0,3 mg/L), contamina ecossistemas aquáticos em virtude, principalmente, da lixiviação de campos agrícolas e via despejo em rios próximos a áreas industrializadas onde ocorrem fabricação e formulação do inseticida (WHO, 1984). O produto utilizado no presente estudo foi o endossulfan grau técnico, com 98,7% de pureza, fornecido pela empresa Hoeschst-Agrevo. Os nonilfenol etoxilados são componentes de várias formulações químicas, incluindo detergentes, tintas, cosméticos, agrotóxicos, produtos têxteis, entre outros (Muller & Schlatter, 1998), e seu uso resulta em grande contaminação de corpos hídricos, principalmente via descarga de esgoto urbano (Bennie, 1999). Vários estudos têm demonstrado os efeitos adversos desses compostos em ambientes aquáticos (Servos, 1999). A solubilidade aquosa do nonilfenol aumenta conforme o tamanho da cadeia, e os compostos acima de seis unidades etoxiladas são altamente solúveis (EHCH, 2001). No presente estudo foi utilizado o nonilfenol com 9,5 unidades etoxiladas, conhecido comercialmente como RENEX 95, fornecido pela empresa BASF S.A.

*Diluições* – Todas as concentrações testadas nos ensaios foram preparadas com a água mole sintética, padronizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas para ensaios de toxicidade com organismos aquáticos, com pH entre 7,2 e 7,6 e dureza na faixa de 40 a 48 mg/L em CaCO<sub>3</sub> (ABNT, 1993). Neste estudo foram empregadas concentrações nominais das substâncias, obtidas por meio de diluições seriadas. Como solvente para a diluição do endossulfan foi utilizado o álcool etílico marca VETEC, com 99% de pureza. O etanol foi testado na concentração de 0,0025% v/v, por ser esta a concentração presente na maior diluição do endossulfan.

*Análises Estatísticas* – Para o cálculo da toxicidade aguda (CL<sub>50</sub> 95%) foi utilizado o método *Trimmed Spearman Karber*, disponível em programa para computador. Com vistas à realização de comparações entre o desempenho reprodutivo dos organismos testados e a determinação da Concentração sem Efeito (CENO), efetuou-se a análise ANOVA seguida do Teste de Dunnett, disponível em programa para computador na Versão 1.5.

*Desenvolvimento do Método* – A toxicidade aguda em sistema estático de exposição e em 96 horas de exposição para organismos adultos foi obtida visando à escolha das concentrações a serem utilizadas no ensaio de reprodução. Com base nesses resultados determinou-se a concentração de efeito letal não observado (CELNO), e esta foi estabelecida como a mais alta concentração do teste definitivo. As outras duas diluições do teste definitivo foram obtidas a partir da divisão da CELNO/10 e da CELNO/100. Escolhidas as concentrações a serem utilizadas no ensaio reprodutivo, dez indivíduos adultos (Geração F0) foram individualmente expostos, por concentração, às substâncias testadas, e duas vezes por semana, na ocasião de renovação da solução, durante oito semanas, registraram-se o número de ovos por indivíduo, o número de desovas por indivíduo e o número de ovos por desova. Ao final das oito semanas determinou-se a embriotoxicidade, e os descendentes vivos foram mantidos até três meses de idade para o amadurecimento sexual e início do estudo reprodutivo da geração F1, que foi registrado tal como em F0. Ao final das oito semanas de observação da F1, determinou-se a toxicidade sobre os embriões F2. O tempo total de experimento relativo a cada substância ficou em torno de 20 semanas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos mostram que o endosulfan apresentou efeito inibitório sobre a reprodução da geração F0 na maior concentração testada (0,1 mg/L) e sobre o número de ovos por desova na concentração intermediária (0,01 mg/L). Esse efeito se pronunciou como inibição ou retardo significativo

da eclosão dos ovos de F0 (indivíduos F1) na concentração de 0,01 mg/L. Conseqüentemente, a partir das concentrações testadas pode-se dizer que a concentração nominal máxima de endosulfan em que não se observou efeito (CENO) foi 0,001 mg/L (1 µg/L ou 1 ppb). Com o nonilfenol etoxilado foi observada redução na fecundidade da geração F0 entre os grupos expostos às duas maiores concentrações (0,1 e 1,0 mg/L), delimitando uma CENO de 0,01 mg/L ou 10 µg/L em oito semanas. Na observação do desempenho reprodutivo da geração F1, os resultados foram semelhantes aos da geração F0, todavia, houve claro retardo na eclosão dos embriões gerados pelos indivíduos F1 (geração F2) na concentração de 0,01 mg/L, impedindo assim a determinação da CENO depois de 20 semanas, pois seu valor está abaixo da menor concentração testada.

Nas Tabelas 1 e 2 os resultados são comparados com os de clássicos testes de efeitos sobre a reprodução e o desenvolvimento. Em relação ao endosulfan (Tabela 1), observa-se que a CENO obtida foi uma das mais baixas, sendo superior apenas à obtida para redução no crescimento do peixe *Pimephales promelas*. Sobre o nonilfenol etoxilado, observa-se, na Tabela 2, que a CENO obtida foi a mais baixa. Os resultados apresentados com o etanol não foram significativamente diferentes do grupo controle, tanto na F0 quanto na F1/F2.

Nesse contexto, verifica-se que o estudo multigeração proposto mostrou-se sensível para detectar agravos não letais causados por substâncias químicas e que esse tipo de estudo com caramujos pode vir a ser uma interessante alternativa para a predição dos efeitos crônicos de poluentes em ecossistemas aquáticos.

**Tabela 1** — Comparação entre a CENO para o endosulfan, obtida na presente proposta, e valores obtidos nos tradicionais testes rápidos de efeitos sobre a reprodução e o desenvolvimento. Valores expressos em µg/L.

Organismo-teste	Efeito e duração	CENO	Referência
<i>Pseudokirchneriella subcapitatum</i>	Inib. cresc. (96 horas)	130	DeLorenzo <i>et al.</i> , 2002
<i>Daphnia magna</i>	Inib. reprod. (21 dias)	150	Fernández-Casalderrey <i>et al.</i> , 1993
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Inib. reprod. (14 dias)	10	Sunderam <i>et al.</i> , 1994
<i>Pimephales promelas</i>	Letal. e inib. cresc. (7 dias)	0,2	USEPA, 2002
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Reprod. e desenv. embrion. (8 semanas)	1	Presente estudo

**Tabela 2** — Comparação entre a CENO para o nonilfenol etoxilado, obtida na presente proposta, e valores obtidos nos tradicionais testes rápidos de efeitos sobre a reprodução e o desenvolvimento com diferentes formas do nonilfenol. Valores expressos em µg/L.

Nonilfenol (NP)	Organismo-teste	Efeito e duração	CENO	Referência
NP9	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Inib. cresc. (96 horas)	8000	Dorn et al., 1993
NP	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Inib. cresc. (96 horas)	92	Servos, 1999
NP9	<i>Daphnia magna</i>	Inib. cresc. (7 dias)	10000	Dorn et al., 1993
NP	<i>Daphnia magna</i>	Inib. reprod. (21 dias)	100	Servos, 1999
NP	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Inib. reprod. (7 dias)	89	Servos, 1999
NP9	<i>Pimephales promelas</i>	Letal. e inib. cresc. (7 dias)	1000	Dorn et al., 1993
NP9,5	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Reprod. e desenv. embrion. (8 semanas) f0 (20 semanas) f1	10 < 10	Presente estudo

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 1993, *Água – Ensaio de toxicidade aguda com Daphnia similis Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea)*, NBR 12713. ABNT, Rio de Janeiro.
- ARCHAND-HOY, L. D. & BENSON, W. H., 1998, Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 49-57.
- ANDRADE, R. M. & CARVALHO, O. S., 1972, Alimentação e fecundidade de planorbídeos criados em laboratório. I: *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) (Pulmonata, Planorbidae). *Rev. Bras. Biol.*, 32: 225-233.
- BENNIE, D. T., 1999, Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. *Water Qual. Res. J. Canada*, 34: 79-122.
- DeLORENZO, M. E., TAYLOR, L. A., LUND, S. A., PENNINGTON, P. L., STROZIER, E. D. & FULTON, M. H., 2002, Toxicity and bioconcentration potential of the agricultural pesticide endosulfan in phytoplankton and zooplankton. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 42: 173-181.
- DORN, P. B., SALANITRO, J. P., EVANS, S. H. & KRAVETZ, L., 1993, Assessing the aquatic hazard of some branched and linear nonionic surfactants by biodegradation and toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 1751-1762.
- ECHC (Environment Canada and Health Canada), 2001, *Priority substances list assessment report – nonylphenol and its ethoxylates*. Canadian Environment Protection Act, 1999. 97p.
- FERNÁNDEZ-CASALDERREY, A., FERRANDO, M. D. & ANDREU-MOLINER, E., 1993, Effects of endosulfan on survival, growth and reproduction of *D. magna*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106: 437-441.
- FREITAS, J. S., PAULA, D. P. & CARIELLO, M. O., 1997, The influence of self-fertilization performance and copulation behavior in reproduction by cross-fertilization in groups of *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Planorbidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92: 739-743.
- LAABS, V., AMELUNG, W., PINTO, A. A., WANTZEN, M., SILVA, C. J. & ZECH, W., 2002, Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brazil. *J. Environ. Qual.*, 31: 1636-1648.
- MULLER, S. & SCHLATTER, C., 1998, Oestrogenic potency of nonylphenol *in vivo* – a case study to evaluate the relevance of human non-occupational exposure. *Pure Appl. Chem.*, 70: 1847-1853.
- SERVOS, M. R., 1999, Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Qual. Res. J. Canada*, 34: 123-177.
- SUNDERAM, R. I. M., THOMPSON, G. B., CHAPMAN, J. C. & CHENG, D. M. H., 1994, Acute and chronic toxicity of endosulfan to two Australian cladocerans and their applicability in deriving water quality criteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 27: 541-545.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2002, *Reregistration eligibility decision for endosulfan*. Julho 2003. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrd1/REDS/endosulfan\_red.pdf>.
- WHO (World Health Organization), 1984, *Endosulfan*. Report of WHO Expert Committee. WHO Environmental Health Criteria 40, WHO, Geneva, 64p.



SETAC – Brazil

## Avaliação Ecotoxicológica do Sedimento do Arroio Sapucaia, RS, Brasil, Através de Ensaios de Toxicidade Utilizando Diferentes Amostradores e Organismos-teste

C. M. S. PORTELA,\* A. ARENZON & M. T. RAYA-RODRIGUEZ

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Ecologia – Laboratório de Ecotoxicologia, Porto Alegre, RS

### RESUMO

A avaliação da qualidade do sedimento do Arroio Sapucaia, RS, Brasil, foi realizada em quatro pontos distintos, localizados no curso do arroio, através da utilização de diferentes metodologias de coleta (draga de Eckman e “corer hand”) e diferentes organismos-teste (*Hyalella azteca* e *Ceriodaphnia dubia*). A avaliação foi realizada no período de março de 2000 a janeiro de 2001, com a utilização de ensaios de toxicidade baseados em metodologias padronizadas. De acordo com os resultados deste estudo, observou-se que, com exceção do primeiro ponto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os amostradores. Os dados das avaliações ecotoxicológicas com organismos bentônicos (*H. azteca*) e planctônicos (*C. dubia*) indicam que os resultados das avaliações dependem do organismo-teste utilizado, pois os dados apresentaram diferença estatisticamente significativa em três dos quatro pontos avaliados. De acordo com os ensaios de toxicidade, os resultados do monitoramento do Arroio Sapucaia, RS, demonstraram aumento na degradação deste ambiente ao longo dos pontos amostrais, da nascente em direção à foz.

*Palavras-chave:* sedimento, toxicidade, *Hyalella*, *Ceriodaphnia*, amostradores.

### ABSTRACT

#### Ecotoxicological assessment of the sediment in Arroio Sapucaia, RS, Brazil, using different sampling devices and test organisms

Assessment of sediment quality in Arroio Sapucaia, a stream in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, was conducted at four locations along its course with use of two sampling devices (Eckman grab and “corer hand”) and two species of test organisms (*Hyalella azteca* and *Ceriodaphnia dubia*). This evaluation was performed from March/2000 through January/2001, using toxicity essays based on standard methodology. According to results of this study, there was no significant difference between sampling devices, with the exception of the first sampling location. Ecotoxicological evaluation containing benthic (*H. azteca*) and plankton (*C. dubia*) organisms indicate that results depend on which test organism is used, since three of the total sampling locations showed significant difference. In general, according to toxicity essays, monitoring results for Arroio Sapucaia indicate an increase in environmental deterioration along its sampling locations, from upstream to downstream.

*Key words:* sediment, toxicity, *Hyalella*, *Ceriodaphnia*, sampling devices.

\*Corresponding author: Carina M. S. Portela, e-mail: carina@ecologia.ufrgs.br.

## INTRODUÇÃO

Os sedimentos de ambientes aquáticos atuam como fonte e depósito de materiais orgânicos e inorgânicos (Burton & MacPherson, 1995; Burton *et al.*, 2001). Esses ambientes apresentam fundamental importância nos ciclos biogeoquímicos e na base da rede alimentar de vários organismos. A contaminação desse compartimento pode causar efeitos prejudiciais no ecossistema, alguns mais evidentes e outros mais discretos ou desconhecidos. A contaminação do sedimento pode ter efeitos indesejados não apenas nos organismos bentônicos, mas em outros elementos da cadeia trófica, uma vez que o sedimento fornece habitat, alimento e locais de reprodução para determinados organismos (Baudo *et al.*, 1999).

De acordo com Leppanen *et al.* (1998), ensaios de toxicidade com sedimento são ferramentas importantes, pois fornecem informações complementares à caracterização química e biológica.

A maneira como o sedimento é coletado, estocado e manipulado pode influenciar os resultados das análises ecotoxicológicas. Segundo Stemmer *et al.* (1990), o principal critério para uma coleta adequada e para a escolha de um amostrador confiável é que este apresente repetibilidade sem que ocorram alterações e contaminações na amostra. Conforme Burton & MacPherson (1995), o método mais apropriado, dependerá das características do sedimento, da eficiência requerida e do objetivo do estudo.

Segundo Burton *et al.* (2001), há grande variedade de ensaios de toxicidade para avaliar os sedimentos. Cada um desses ensaios possui características próprias e avalia as respostas utilizando diferentes espécies. Para Hoss *et al.* (1999), as variações nas respostas dos organismos-testes podem ocorrer por diferentes graus de contaminação ou pela variação natural de propriedades físicas e químicas do sedimento.

Burton & MacPherson (1995) e Duan *et al.* (1997) afirmam que *Hyalella azteca* (crustáceo, anfípodo) são organismos epibentônicos, detritívoros; com curto ciclo de vida; de fácil cultivo; e com tolerância a diferentes tamanhos de partículas de sedimento. Conforme Ingersoll *et al.* (2000), essa espécie tem sido recomendada para avaliações de sedimento devido a sua sensibilidade a contaminantes e por estar em contato direto com esse compartimento.

Organismos não bentônicos também têm sido utilizados para a avaliação da toxicidade de amostras de sedimento. Segundo Sasson-Brickson & Burton (1991), o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* (crustáceo, cladófera) tem-se mostrado uma espécie com aplicabilidade em avaliações de toxicidade do sedimento. De acordo com Munawar *et al.* (1999), embora não sejam bentônicos, os microcrustáceos apresentam propensão para habitar a interface água-sedimento, alimentando-se na superfície do sedimento e com isso aumentando a possibilidade de contato dos organismos com as partículas tóxicas do sedimento.

Desta forma, visando a determinar diferenças nos resultados dos ensaios ecotoxicológicos de sedimento em função das metodologias de coleta e dos organismos-teste utilizados, foram realizadas avaliações ecotoxicológicas do sedimento do Arroio Sapucaia, RS, Brasil, com amostras obtidas através de “corer hand” e draga de Eckman. Além disso, nesta avaliação, foram utilizados organismos-teste padronizados, *H. azteca* e *C. dubia*.

## MATERIAL E MÉTODOS

As avaliações ecotoxicológicas do sedimento foram realizadas através de ensaios de toxicidade aguda para *H. azteca*, com amostras coletadas com draga de Eckman e “corer hand”, e toxicidade crônica para *C. dubia*, com amostras coletadas com draga de Eckman.

A metodologia adotada na realização dos ensaios de toxicidade com *H. azteca* baseou-se em USEPA (1994) e Burton & MacPherson (1995). Indivíduos jovens foram expostos a amostras de sedimento integral, por período de 10 dias, em que foi observada a mortalidade dos organismos; já os ensaios com *C. dubia* basearam-se em USEPA (1994), em que neonatas foram expostas a amostras de sedimento integral, por um período de 7 dias, sendo observadas a reprodução e a mortalidade dos organismos.

Os ensaios de toxicidade foram avaliados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA), complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas Dunnett ou Steel Many One Rank. A verificação de diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos ensaios de toxicidade foi determinada pela Análise de Variância (ANOVA), complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas Dunnett T3 ou Steel Many One Rank em nível de significância de 5%, a partir dos dados de sobrevivência dos organismos-teste (*H. azteca* e *C. dubia*).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os resultados da avaliação ecotoxicológica do sedimento Arroio Sapucaia, realizada com amostras coletadas com “corer hand” ou draga de Eckman. Os dados demonstram variação na toxicidade apenas nos ensaios 1 e 4, para amostras coletadas com “corer hand”, ambos no ponto 1. A partir da média dos valores de sobrevivência de *H. azteca* foi determinada a diferença significativa entre os amostradores. O resultado da análise estatística demonstrou diferença entre os coletores apenas no ponto 1, considerado o menos impactado por estar localizado na nascente do corpo receptor.

Stemmer *et al.* (1990) realizaram ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna* e *C. dubia* e avaliaram a influência da amostragem pela comparação de amostras de sedimento coletadas com draga de Eckman e “corer hand”, provenientes de um rio receptor de efluentes industriais e despejos agrícolas. Os autores concluíram que, apesar de normalmente haver maior toxicidade associada ao sedimento coletado com “corer hand”,

em relação à draga de Eckman, não houve diferença significativa entre os métodos amostrais. Esses resultados, de certa forma, concordam com este estudo, uma vez que apenas no ponto 1 houve diferença estatisticamente significativa, que pode estar associada ao ambiente amostrado. De acordo com Stemmer *et al.* (1990), as variações observadas não necessariamente estão relacionadas a fatores metodológicos, mas ambientais, devido à natureza heterogênea e às complexas interações que ocorrem no sedimento e que podem afetar a toxicidade.

Portanto, sugere-se que o monitoramento do Arroio Sapucaia pode ser realizado tanto com amostras coletadas com “corer hand” como com draga de Eckman.

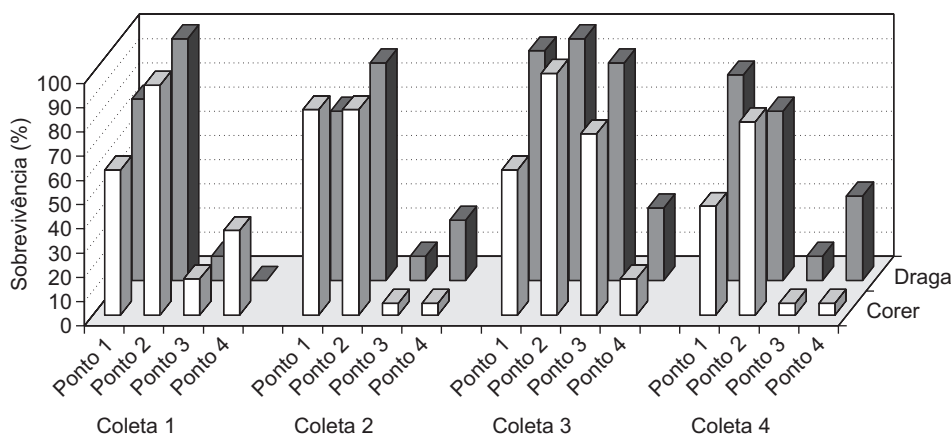
A Tabela 1 apresenta os resultados da avaliação ecotoxicológica do sedimento do Arroio Sapucaia, realizada com a exposição de diferentes organismos-teste. Os dados demonstram variação na toxicidade, indicando que *C. dubia* não foi capaz de detectar a toxicidade das amostras das estações 3 e 4, ao contrário de *H. azteca*. A partir dos valores de sobrevivência de *H. azteca* e de *C. dubia* foi determinada a diferença significativa entre os organismos-teste. O resultado da análise estatística demonstrou diferença estatisticamente significativa nos pontos 1, 3 e 4. Com exceção do ponto 1, os demais são considerados os impactados por receberem a maior carga de despejos.

Por ser um organismo zooplantônico, normalmente *C. dubia* é utilizada em avaliações da qualidade de águas superficiais ou efluentes. Apesar disso, as metodologias padronizadas que determinam a execução dos ensaios de toxicidade com sedimento também recomendam sua utilização

para esse compartimento. Isso explica a diferença observada entre os organismos-teste utilizados (*H. azteca* e *C. dubia*). Por ser um organismo bentônico, *H. azteca* parece ser mais adequado em avaliações de toxicidade aguda com sedimentos.

De acordo com Borgmann *et al.* (1989), os ensaios de sedimento com *H. azteca* possuem algumas vantagens em relação aos mesmos ensaios com daphnídeos, pois os anfípodos ficam em contato direto com os contaminantes. Além disso, organismos bentônicos são indicadores do local de contaminação. McNulty *et al.* (1999) ressaltam, também, que invertebrados bentônicos são utilizados como organismos-teste para a avaliação da toxicidade do sedimento devido à sua interação com este ambiente e sua posição na cadeia alimentar.

A avaliação do sedimento do Arroio Sapucaia, RS, realizado através de ensaios de toxicidade demonstrou que há distinção entre os pontos de coleta, que pode ser decorrente das influências antrópicas recebidas pelos pontos. Os pontos 3 e 4 foram considerados os mais impactados. O ponto 3 está localizado no interior de uma vila popular, que lança no arroio seu lixo doméstico. Além disso, esse ponto localiza-se na junção do arroio em estudo com um segundo arroio que recebe o efluente final de uma refinaria de petróleo. O ponto 4, localizado na foz do Arroio Sapucaia, recebe descargas residenciais, industriais e agrícolas. Essa avaliação realizada com diferentes organismos-teste demonstrou que pode ter ocorrido aumento na toxicidade do sedimento do arroio ao longo dos pontos, uma vez que houve diminuição na sobrevivência de *H. azteca*, assim como nas taxas de reprodução de *C. dubia*.



**Figura 1** — Toxicidade aguda do sedimento do Arroio Sapucaia, RS, com *H. azteca*, com amostras coletadas com draga de Eckman e “corer hand”, nas diferentes estações amostrais.

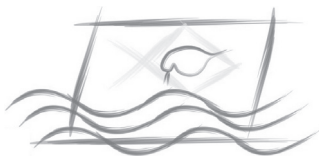
**Tabela 1** — Resultado dos ensaios de toxicidade aguda, com *H. azteca*, e toxicidade crônica, com *C. dubia*, com amostras de sedimento provenientes de pontos no Arroio Sapucaia, RS. Os ensaios 1, 2, 3 e 4 correspondem às análises realizadas com amostras da 1ª, 2ª, 3ª e 4ª coletas.

Pontos de coleta	Organismos-teste	Repetições			
		1ª	2ª	3ª	4ª
Ponto 1	<i>Hyalella azteca</i>	NT	NT	NT	NT
Ponto 1	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	NT	NT	T	NT
Ponto 2	<i>Hyalella azteca</i>	NT	NT	NT	NT
Ponto 2	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	T	NT	NT	NT
Ponto 3	<i>Hyalella azteca</i>	T	T	NT	T
Ponto 3	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	T	NT	NT	NT
Ponto 4	<i>Hyalella azteca</i>	T	T	T	T
Ponto 4	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	T	NT	NT	NT

T = tóxico, NT = não tóxico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUDO, R., BELTRAMI, M. & ROSSI, D., 1999, In situ tests to assess the potential of aquatic sediments. *Aquatic Ecosyst Health & Manag.*, 2: 361-365.
- BORGMANN, U., RALPH, K. M. & NORWOOD, W. P., 1989, Toxicity test procedures for *Hyalella azteca*, and chronic toxicity of cadmium and pentachlorophenol to *H. azteca*, *gammarus fasciatus*, and *Daphnia magna*. *Arch. of Environ. Contam. and Toxicol.*, 18: 756-764.
- BURTON JR., G. A. & MACPHERSON, C., 1995, *Sediment toxicity testing issues and methods*. Handbook of Ecotoxicology. Lewis Publishers, Boca Ranton, pp. 70-98.
- BURTON JR., G. A., BAUDO, R., BELTRAMI, M. & ROWLAND, C., 2001, Assessing sediment contamination using six toxicity assays. *J. Limnol.*, 60(2): 263-267.
- DUAN, Y., GUTTMAN, I. & ORIS, J. T., 1997, Genetic differentiation among laboratory populations of *hyalella azteca*: implications for toxicology. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 16: 691-695.
- HÖSS, S. M., HAITZER, M., TRAUNSPURGER, W. & STEINBERG, C. E. W., 1999, Growth and fertility of *caenorhabditis elegans* (nematoda) in unpolluted freshwater sediments: response to particle size distribution and organic content. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 18(12): 2921-2925.
- INGERSOLL, G. C., IVEY, C. D., BRUNSON, E. L., HARDESTY, D. K. & KEMBLE, N. E., 2000, Evaluation of toxicity: whole-sediment versus overlying-water exposures with amphipod *Hyalella azteca*. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 19(12): 2906-2910.
- LEPPANEN, C. & MAIER, K. J., 1998, An inexpensive and efficient modular water-renewal system for bulk sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 17(5): 969-971.
- MCNULTY, E. W., DWYER, F. J., ELLERSIECK, M. R. & GREER, E. I., 1999, Evaluation of ability of reference toxicity tests to identify stress in laboratory populations of the amphipod *Hyalella azteca*. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 18(3): 544-548.
- MUNAWAR, M. R., DERMOTT, R., MUNAWAR, S. F. & VAN STAM, H. A., 1999, A comparative bioassessment of sediment toxicity in lentic and lotic ecosystems of the North American great lakes. *Aquatic Ecosyst. Health & Manag.*, 2: 367-378.
- SASSON-BRICKSON, G. & BURTON JR., G. A., 1991, In situ and laboratory sediment toxicity testing with *ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 10: 201-207.
- STEMMER, B. L., BURTON JR., G. A. & SASSON-BRICKSON, G., 1990, Effect of sediment spatial variance and collection method on cladoceran toxicity and indigenous microbial activity determinations. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 9: 1035-1044.
- USEPA, Environmental Protection Agency, 1994, *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminants with freshwater invertebrates*. Duluth, Minnesota. EPA – 600/r-94/024. 44-50.



## Fertilidade e Sensibilidade de *Daphnia similis* e *Daphnia magna* Submetidas a Diferentes Cultivos

A. C. BEATRICI,\* A. ARENZON, N. J. COIMBRA & M. T. RAYA-RODRIGUEZ

Centro de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), CEP 91501-970, Porto Alegre, RS

### RESUMO

Diferentes condições de cultivo podem influenciar a produtividade e sensibilidade dos organismos. Este trabalho tem por objetivo avaliar a influência de diferentes dietas e meios de cultivo na sensibilidade e na reprodução de *D. similis* e *D. magna*. As dietas consistiam na utilização das algas *Pseudokirchneriella subcapitata* na concentração de  $1,5 \cdot 10^5$  céls.ml<sup>-1</sup> e *Scenedesmus subspicatus* na concentração de  $10^6$  céls.ml<sup>-1</sup>. A combinação dessas algas com o complemento de uma ração de truta ou artêmia também foi utilizada. Em cada tratamento observou-se diariamente o número médio de neonatos produzidos por fêmea no período de 21 dias. Paralelamente, foram realizados ensaios de sensibilidade ao dicromato de potássio de acordo com a NBR 12713 para cada dieta. Os resultados obtidos quanto à fertilidade, quando submetidas a uma dieta com as algas *P. subcapitata* para *D. similis* e *S. subspicatus* para *D. magna*, tendo o complemento de uma ração de artêmia, demonstraram que, independente do meio utilizado para o cultivo, a reprodução não variou significativamente, o que caracteriza a ração de artêmia como uma alternativa ao meio M4. Quanto à sensibilidade, em todos os casos analisados, quando cultivados em meio M4, os organismos mostraram-se mais resistentes ao dicromato de potássio do que quando cultivados em meio ISO.

*Palavras-chave:* *D. similis*, *D. magna*, sensibilidade, fertilidade.

### ABSTRACT

#### Productivity and sensitivity of *Daphnia similis* and *Daphnia magna* in different cultivation's aspects

Various aspects of cultivation may influence an organism's productivity and sensitivity. This research focuses on evaluating the effects of different diets and cultivation media on sensitivity and reproduction of *D. similis* and *D. magna*. Diets consisted of *Pseudokirchneriella subcapitata* at  $1.5 \cdot 10^5$  cells.ml<sup>-1</sup> and *Scenedesmus subspicatus* at  $10^6$  cells.ml<sup>-1</sup>. This algae combination was supplemented with a trout or Artemia feed. During twenty one days the mean number of neonates per female were observed daily for each treatment. Simultaneously to this, Potassium dichromate sensitivity essays were also performed, according to NBR 12713, for each diet. Results on fertility was not significantly altered while using a diet of *P. subcapitata* for *D. similis* and *S. subspicatus* for *D. magna*, indicating Artemia feed as an alternative to M4 medium. Regarding sensitivity, every analyzed case showed more resistance to Potassium dichromate when cultivated in ISO medium.

*Key words:* *D. similis*, *D. magna*, sensitivity, fertility.

### INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Daphnia*, com grande participação na comunidade zooplancônica em todo o mundo, têm tido sua biologia amplamente estudada (Herbert, 1978). Diferentes espécies, como *D. pulex*, *D. pulicaria*, *D. magna* e *D. similis*, vêm sendo cultivadas em laboratório e utilizadas em ensaios ecotoxicológicos (Green, 1955; Allan, 1976; Lei & Armitage,

1980; Fonseca, 1991; CETESB, 1992; Campagna, 1994; Pedrozo, 1995; Ferrão-Filho *et al.*, 2000).

Há diferentes metodologias para realização de cultivos e ensaios de toxicidade, como USEPA (USEPA, 1993) e as normas NBR 12713 (ABNT, 1993), DIN 38412 (DIN, 1989), ISO 6341 (ISO, 1996) e OECD 202 (OECD, 2000). Em relação aos cultivos, no entanto, são sugeridas diferentes combinações e concentrações de alimentos, assim como características da

\*Corresponding author: Aline Cristina Beatrici, e-mail: aline@ecologia.ufrgs.br.

água de cultivo, que podem ser utilizadas de acordo com as condições e necessidades de cada laboratório.

Segundo Maranhão & Niewegłowski (1995), o uso de várias fontes de alimentos e diversos meios de cultura influenciam a variabilidade interlaboratorial de resultados dos ensaios de toxicidade com *D. magna*.

Seco-Gordillo et al. (1998) consideram a natureza do meio utilizado para o ensaio e as condições de cultivo como causas da obtenção de diferentes respostas de *D. magna* a alguns metais pesados, entre eles o Dicromato de Potássio. Assim como Silva et al. (2003), deixam clara a necessidade de estabelecer condições mais definidas para os cultivos de *Daphnia* a fim de reduzir essa variabilidade nos resultados de EC<sub>50</sub> 24 h. O presente estudo objetiva verificar se as condições de cultivo dos organismos-teste *Daphnia similis* e *Daphnia magna* utilizados em ensaios ecotoxicológicos podem influenciar suas respostas a determinadas variáveis, como fertilidade e sensibilidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os indivíduos da espécie *D. similis* e *D. magna* foram mantidos com base na norma NBR 12713 (ABNT, 1993) e *D. magna* com base na norma ISO 6341 (ISO, 1996).

O meio básico (meio ISO) foi preparado segundo a norma ISO 6341 (ISO, 1996) e o M4 foi preparado segundo a norma DIN 38412 (DIN, 1989). Esses meios foram ajustados de acordo com as necessidades das espécies estudadas (42 a 48 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> para *D. similis* e 210 a 260 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> para *D. magna*). Para a diluição dos ensaios de sensibilidade foi utilizado apenas o meio básico.

Na Dieta A, os organismos receberam como única fonte de alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* cultivada e administrada para os cultivos na concentração de 1,5.10<sup>5</sup> céls.ml<sup>-1</sup> por indivíduo, segundo sugere USEPA (USEPA, 1993). Na Dieta B foi fornecida como única fonte de alimento a alga *Scenedesmus subspicatus* cultivada e administrada para os cultivos na concentração de 10<sup>6</sup> céls.ml<sup>-1</sup> por indivíduo segundo sugere DIN 38412 (DIN, 1989). A Dieta C consistia em uma combinação das dietas A e B, na mesma proporção.

Para *D. similis*, a dieta D consistia na combinação da alga *P. subcapitata* com o alimento composto de truta (ABNT, 1993) e a dieta E, na combinação da mesma alga, porém com o alimento composto de artêmia (Beatrici, 2000), ambos fornecidos na concentração de 4 g.L<sup>-1</sup>. Para *D. magna*, a dieta D consistia na combinação da alga *S. subspicatus* com o alimento composto de truta fermentada e a dieta E, na combinação da mesma alga, porém com o alimento composto de artêmia fermentado.

Os indivíduos foram divididos em quatro réplicas com dez indivíduos cada. Para cada uma das réplicas de cada

tratamento, o número de fêmeas vivas e neonatas produzidas foi observado diariamente, por um período de 21 dias, para que se estimasse o número médio de neonatas por fêmea por dia. Depois de contadas, as neonatas foram descartadas.

A fertilidade de *D. similis* e *D. magna*, para cada dieta, foi estimada a partir do número médio de neonatas produzidas por fêmea viva/dia. Os dados foram analisados estatisticamente através da Análise de Variância complementada pelo Ensaio de Comparações Múltiplas de Dunnett, em nível de significância de 5%, considerando cada dia como uma repetição do experimento, resultando para cada dieta um total de 21 repetições com 4 réplicas em cada.

Os ensaios de sensibilidade foram realizados segundo NBR 12713 (ABNT, 1993) para *D. similis* e segundo ISO 6341 (ISO, 1996) para *D. magna*. Como substância de referência utilizou-se Dicromato de Potássio nas concentrações de 0,01, 0,02, 0,04, 0,085, 0,17 e 0,35 mg.L<sup>-1</sup> para *D. similis* e de 0,3, 0,5, 0,7, 1,0, 1,5 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> para *D. magna*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta as análises estatísticas dos dados de fertilidade de *D. similis* e *D. magna* quando submetidos aos diferentes tratamentos propostos.

*D. similis*, quando cultivada em meio M4, obteve a melhor resposta quanto à fertilidade ao receber as dietas A e E, que diferiram significativamente das dietas B, C e D, que apresentaram menor produção de neonatas. Quando mantidas em meio ISO e expostas às dietas A, B e C, apresentaram reprodução inferior a um indivíduo por fêmea por dia. Este desempenho pode ser considerado insatisfatório se utilizarmos como referência normas reconhecidas internacionalmente que utilizem dafnídeos em ensaios de toxicidade crônica. Em USEPA (2002), estipulou-se o mínimo de 40 neonatas produzidas por fêmea no período de 21 dias nos controles dos ensaios de toxicidade crônica com *D. magna* e de 15 neonatas para *Ceriodaphnia dubia*, ambas equivalendo aproximadamente a duas neonatas por fêmea por dia para que o resultado do ensaio seja considerado válido.

O número de neonatas produzidas por *D. similis*, em presença de *P. subcapitata* e ração de artêmia (dieta E), em meio ISO e meio M4, se apresentaram estatisticamente semelhantes. Para as demais dietas, a reprodução de *D. similis* foi sempre estatisticamente maior em presença do meio M4. A presença de um meio nutritivo (M4) ou um complemento à base de ração incrementa o desempenho reprodutivo desta espécie. Lewis & Maki (1981), ao exporem *D. magna* a uma dieta de *P. subcapitata* com o complemento de uma ração de truta, observaram reprodução 70% maior do que quando alimentadas somente com *P. subcapitata* ou somente com ração.

Quando cultivada em meio M4, *D. magna* responde de forma semelhante a todas as dietas expostas, não apresentando diferenças estatisticamente significativas para o número de neonatas produzidas por fêmea por dia. Para os cultivos mantidos em meio ISO também não se observou diferença estatisticamente significativa entre as dietas. Maranhão & Nieweglowski (1995), ao compararem a reprodução de *D. magna* quando submetidas a três diferentes meios de cultivo (água de torneira desclorada, água mineral e M4), verificaram diferenças significativas no comportamento reprodutivo desse organismo, observando maior reprodução de *D. magna* em presença do meio M4. Embora alguns autores (Keating, 1985; Maranhão & Nieweglowski, 1995; Goulden, 1998) e normas DIN 38412 (DIN, 1989) e OECD 202 (OECD, 2000) enfatizem a utilização de um meio nutritivo para os cultivos de dafnídeos, *D. magna*, quando cultivada com este meio recebendo como alimento a dieta E (combinação da alga *S. subspicatus* com alimento composto de Artêmia fermentada), não apresentou fertilidade significativamente diferente do que quando submetida à mesma dieta em meio ISO.

Quanto à sensibilidade dos organismos, independente da dieta utilizada, em meio M4, tanto *D. similis* quanto *D. magna* apresentaram menor sensibilidade ao Dicromato de Potássio do que quando cultivadas somente em meio ISO (Tabelas 4 e 5).

*D. magna* apresentou maior resistência ao Dicromato de Potássio quando cultivada em meio M4. Esta diferença foi significativa ( $\alpha = 0,05$ ) quando utilizada ração como complemento alimentar, e sua maior sensibilidade foi

constatada quando cultivada em meio ISO com a dieta B. *D. similis* apresentou maior resistência à substância de referência, recebendo a dieta E, quando cultivada em meio M4 do que em meio ISO. A maior sensibilidade observou-se quando cultivada com meio ISO e dietas A, B e C. Assim como para *D. magna*, *D. similis* foi significativamente mais resistente ao Dicromato de Potássio quando cultivada em meio M4 com complemento de ração.

Pode-se observar neste trabalho que as dietas e meios de cultivo responsáveis pelo desempenho reprodutivo insatisfatório dos organismos foram também responsáveis por maior sensibilidade ao Dicromato de Potássio. Embora o número de filhotes produzidos por *D. magna* não aumente significativamente com o uso do meio M4, independente do alimento utilizado, sua sensibilidade é significativamente menor neste meio. Essa maior resistência dos organismos sugere possíveis variações de resultados dos ensaios ecotoxicológicos durante a escolha de um ou outro meio de cultivo e da combinação de alimento utilizado. Winner *et al.* (1977) observaram que o estado nutricional de *Daphnia* sp. influenciou a toxicidade de substâncias químicas para os organismos, especialmente no ensaio crônico em que o crescimento e a reprodução foram avaliados.

Ao compararmos as sensibilidades das duas espécies avaliadas neste trabalho, verificamos que, dentro de um mesmo meio de cultivo, independentemente da dieta fornecida, *D. magna* sempre demonstrou menor sensibilidade ao Dicromato de Potássio quando comparada a *D. similis*.

**Tabela 1** — Médias dos valores de fertilidade (nº médio de neonatas por fêmea por dia) de *D. similis* e *D. magna* observadas em cada tratamento. N representa número total de eventos reprodutivos considerando as 4 réplicas.

<i>D. similis</i>				<i>D. magna</i>			
Grupo	n	Reprodução		Grupo	n	Reprodução	
		Média	Erro-padrão			Média	Erro-padrão
M4-DS-E	59	9,58 <sup>a</sup>	0,91	M4-DM-E	52	6,35 <sup>ab</sup>	0,82
ISO-DE-E	64	9,30 <sup>a</sup>	0,69	M4-DM-E	52	5,97 <sup>ab</sup>	0,88
M4-DS-A	60	6,61 <sup>a</sup>	0,56	ISO-DM-E	32	5,92 <sup>b</sup>	0,73
M4-DS-C	60	5,94 <sup>b</sup>	0,47	M4-DM-C	52	5,28 <sup>b</sup>	0,79
M4-DS-B	60	5,32 <sup>b</sup>	0,37	M4-DM-A	51	4,80 <sup>b</sup>	0,64
M4-DS-D	60	4,69 <sup>b</sup>	0,51	ISO-DM-D	48	4,47 <sup>b</sup>	0,54
ISO-DE-D	64	1,20 <sup>c</sup>	0,14	ISO-DM-A	60	4,27 <sup>b</sup>	0,71
ISO-DE-A	57	0,61 <sup>cd</sup>	0,15	ISO-DM-C	60	3,97 <sup>b</sup>	0,59
ISO-DE-C	56	0,33 <sup>d</sup>	0,08	ISO-DM-B	60	3,77 <sup>b</sup>	0,62

Médias seguidas de letras distintas diferem em nível de significância de 5%. ISO-DS-B não reproduziu.

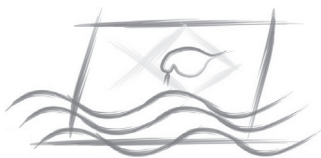
**Tabela 2** — Sensibilidade (CE50; 48 h) de *D. similis* e *D. magna* em diferentes meios de cultivos e dietas.

<i>D. similis</i>			<i>D. magna</i>		
Dieta	Meio ISO	Meio M4	Dieta	Meio ISO	Meio M4
A	0,04	0,15	A	0,87	1,10
		0,18		0,93	1,17
		0,17		0,62	1,19
B	*	0,18	B	0,85	1,27
		0,14		0,43	1,40
		0,29		0,76	1,29
C	0,04	0,18	C	0,87	1,11
		0,07		0,84	1,20
		0,17		0,95	1,50
D	0,04	0,21	D	0,81	1,50
		0,08		0,97	1,66
		0,29		0,97	1,78
E	0,06	0,23	E	1,06	1,67
		0,08		1,22	1,43
		0,07		1,22	1,61

\*Ensaio de sensibilidade não realizado. Valores em mg.L<sup>-1</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT, 1993, *Ensaio de toxicidade aguda com Daphnia similis Claus. 1876 (Cladocera, Crustacea)*. Rio de Janeiro. 16p. NBR12713.
- ALLAN, J. D., 1976, Life history patterns in zooplankton. *American Naturalist*, 110: 165-180.
- BEATRICI, A. C., 2000, *Avaliação da fertilidade e sensibilidade de Daphnia similis (Crustacea, Cladocera) submetida a três diferentes dietas*. Dissertação de Bacharelado, UFRGS, Porto Alegre.
- CAMPAGNA, A. C., 1994, *Estudo do crescimento, desempenho reprodutivo, longevidade e aspectos da morfologia de Daphnia similis Claus (Crustacea: Cladocera), 1897 sob condições de laboratório*. Dissertação de Bacharelado, UFRGS, Porto Alegre, 74p.
- CETESB, 1992, *Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos*. São Paulo.
- DIN – Deutsches Institut für Normung, 1989, Deutsches institut für normung-testverfahren mit wasserorganismen (gruppe I). Bestimmung der nicht akut giftigen wirkung von abwasser gegenüber daphnien über verdünnungstufen, norma din 38 412 teil 30.(1 30). DIN 38412.
- FERRÃO-FILHO, A. S., AZEVEDO, S. M. F. & DEMOTT, R. W., 2000, Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshwater Biol.*, 45: 1-19.
- FONSCECA, A. L., 1991, *A biologia das espécies Daphnia leavis, Ceriodaphnia dubia silvestris (Crustacea, Cladocera) e Poecilia reticulata (Pisces, Poeciledae) e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais*. Dissertação de Mestrado em Hidráulica e Saneamento, USP, São Carlos, 210p.
- GREEN, J., 1955, Growth, size and reproduction in Daphnia (Crustacea: Cladocera). *Proc. Zool. Soc., London*, 126: 173-204.
- GOULDEN, E. C. & BEAR, N. K., 1998, Evaluation of a high COMBO medium and frozen algae for *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 39: 201-206.
- HEBERT, P. D. N., 1978, The population Biology of Daphnia (Crustacea, Daphnidae). *Biol. Ver.*, 53: 387-426.
- ISO – International Organization for Standardization, 1996, *Water Quality-Determination of the inhibition of mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera – Crustacea)*. (E) 12 p. ISO 6341.
- KEATING, K. I., 1985, A system of defined (sensu stricto) media for Daphnid (Cladocera) culture. *Water Research.*, 19: 73-78.
- LEI, C. & ARMITAGE, B. K., 1980, Growth, development and body size of field and laboratory populations of *Daphnia ambigua*. *Oikos*, 35: 31-48.
- LEWIS, M. A. & MAKI, A. W., 1981, Effects of water hardness and diet on productivity of *Daphnia magna* Straus. In laboratory culture. *Hydrobiologia*, 85: 175-179.
- MARANHO, L. A. & NIEWEGLOWKI, A. M. A., 1995, Influência da dureza da água no estudo da reprodução de *Daphnia magna* (Straus, 1820). *Istituto Ambiental do Paraná*, 5: 33-52.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2000, *Revised Proposal for updating Guideline 202. Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*. Revised Draft Document. OECD 2000.
- PEDROZO, C. S., 1995, *Biomonitoramento do efluente final líquido da Refinaria Alberto Pasqualini, Canoas, RS, através de testes de toxicidade com Daphnia similis (Crustacea: Cladocera)*. Dissertação de Mestrado em Ecologia, UFRGS, Porto Alegre, 162p.
- SECO GORDILLO, J. C., FERNÁNDEZ PEREIRA, J. F., VALE PARAPAR, 1998, Evaluación de la ecotoxicidad aguda de metales pesados con *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental*, 52: 3-12.
- SILVA S. J., 2003, Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* (crustacea: cladocera) usando un toxico de referencia. *Gayana (Concepc.)*, 67: 87-96.
- USEPA, 1993, *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH>: U.S., 4ª ed. EPA/600/4-90/027F.
- USEPA, 2002, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms*, Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH>: U.S., 5th ed. October 2002. EPA/600/4-90/027F.
- WINNER, R. W., KEELING, T., YEAGER, R. & FARRELL, M. P., 1977, Effects of food type on the acute and chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Freshwat. Biol.*, 7: 343-349.



## Efeito Modulador do Extrato de *Stryphnodendron adstringens* Mart. (Barbatimão) Contra Danos Induzidos pela Mitomicina C em Camundongos

L. SILVA-DE-ANDRADE,<sup>1</sup> D. BARROS-DE-CASTRO<sup>1</sup> & L. CHEN-CHEN<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética/INPA Petrópolis, CEP 69083-000, Manaus, AM

<sup>2</sup>Laboratório de Radiobiologia de Microrganismos e Mutagênese/Depto. de Biologia Geral/ICB/UFG, Campus-II, CEP 74001-970, Goiânia, GO

### RESUMO

*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Leguminosae), popularmente conhecida como barbatimão, é uma planta medicinal que cresce abundantemente nas Savanas centrais do Brasil. A decocção ou infusão da casca rugosa do tronco tem sido tradicionalmente utilizada pela população brasileira no tratamento de diarreias, leucorréias e como anti-inflamatório. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antigenotóxico do extrato etanólico de barbatimão (EEB) contra danos induzidos pela mitomicina C (MMC) pelo teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos. Doses do EEB (50 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg) e MMC (4 mg/kg) foram co-administradas via intraperitoneal (i.p.) em grupos de 5 (cinco) animais por tratamento. Para controle positivo, foi administrada uma dose de 4 mg/kg de MMC i.p. e para controle negativo, H<sub>2</sub>O destilada estéril. As preparações citológicas foram realizadas de acordo com a metodologia de Heddle (1973). Para todas as doses, a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) foi avaliada 24 h após administração. Os resultados obtidos mostraram que o EEB na dose de 50 mg/kg não provocou diminuição significativa na frequência de EPCMN (média = 28,6; DP = 1,67) quando comparada ao controle positivo (média = 30,6; DP = 2,70) ( $p > 0,05$ ). No entanto, nas doses de 100 mg/kg (média = 19,8; DP = 2,28) e 200 mg/kg (média = 16,8; DP = 2,58) de EEB foi observada inibição significativa da frequência de EPCMN induzidos pela MMC ( $p < 0,05$ ). Desse modo, os resultados indicaram que o EEB exibiu atividade antigenotóxica em medula óssea de camundongos.

**Palavras-chave:** barbatimão, antigenotoxicidade, mitomicina C, micronúcleo, camundongos.

### ABSTRACT

#### Modulatory effect of extract of *Stryphnodendron adstringens* Mart. (barbatimão) against induced damage by mitomycin C in mice

*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Leguminosae), popularly known as “barbatimão”, is a medicinal plant that grows in the central Savannas of Brazil. Decoctions or infusions of the stem bark are traditionally used by the native population of Brazil in the treatment of leukorrhoea, diarrhoea and as an anti-inflammatory medicine. The aim of this study was to evaluate the antigenotoxicity effect of ethanolic extract of barbatimão (EEB) against induced damage by mitomycin C (MMC) by the bone marrow micronucleus test in mice. Doses of EEB (50 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg) and MMC (4 mg/kg) were administered simultaneously by intraperitoneal injection (i.p.) in groups of 5 (five) animals for treatment. The positive control received a MMC i.p. (4 mg/kg) and negative control, distilled and sterilized H<sub>2</sub>O. Cytological preparations were done according Heddle (1973). For all the doses, micronucleated polychromatic erythrocytes frequency (MNPCE) was evaluated at period of 24 h. The obtained results showed no significantly inhibition of MNPCE

\*Corresponding author: Lee Chen Chen, e-mail: chenlee@icb.ufg.br.

frequency (mean = 28.6; SD = 1.67) in the dose of 50 mg/kg of EEB compared to positive control (mean = 30.6; SD = 2.70) ( $p > 0.05$ ). However, the EEB in doses of 100 mg/kg (mean = 19.8; SD = 2.28) and 200 mg/kg (mean = 16.8; SD = 2.58) suppressed significantly the frequency of MNPCE induced by MMC ( $p < 0.05$ ). Thus, the results indicated that the EEB exhibited antigenotoxic activity in bone marrow of mice.

**Key words:** barbatimão, antigenotoxicity, mitomycin C, micronucleus, mice.

## INTRODUÇÃO

*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Leguminosae), popularmente conhecida como barbatimão, é uma planta medicinal que cresce abundantemente nas Savanas centrais do Brasil. A decocção ou infusão da casca rugosa do tronco tem sido tradicionalmente utilizada pela população nativa no tratamento de diarreias, leucorréias e como antiinflamatório (Santos *et al.*, 1987; Panizza *et al.*, 1988). O *S. adstringens* é constituído quimicamente por flavonóides, taninos e alcalóides (Mello *et al.*, 1996). A planta contém uma grande quantidade de taninos, variando entre 10% e 37%, dependendo do local e da estação do ano em que a amostra é coletada (Teixeira *et al.*, 1990; Mello *et al.*, 1996).

Estudos farmacológicos preliminares dessa planta têm demonstrado significativo efeito curativo da casca do seu tronco (Neves *et al.*, 1992a,b). Os estudos mostraram que o extrato aquoso de barbatimão possui propriedades antiinflamatórias, analgésicas e protetoras da mucosa gástrica (Audi *et al.*, 1999; Bersani-Amado *et al.*, 1996; Lima *et al.*, 1998). Além disso, as atividades moluscicida e fungicida do barbatimão também já foram descritas (Couto *et al.*, 2000; Bezerra *et al.*, 2002). Pesquisas conduzidas recentemente revelaram ainda a ausência de genotoxicidade do fitoterápico da planta em sistemas procariotos e em drosófilas (D'Oliveira, 1998; de Souza *et al.*, 2003). O presente estudo tem por objetivo investigar a atividade antigenotóxica do extrato etanólico liofilizado da casca do tronco da planta *S. adstringens* pelo teste do micronúcleo em camundongos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Stryphnodendron adstringens* Mart. (Barbatimão)

O extrato etanólico comercial de *Stryphnodendron adstringens* Mart. foi adquirido da indústria farmacêutica brasileira "As Ervas Curam", Curitiba, Paraná. A liofilização foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais – IQ/UFG.

### Animais

Foram utilizados 25 camundongos *Mus musculus* (Swiss Webster) *out bred*, machos, pesando  $35 \pm 10$  g, com idade de 8-12 semanas, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás. Os animais foram trazidos 7 dias antes do

experimento para o laboratório, onde foram mantidos ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ;  $55 \pm 5\%$  de umidade relativa) com um ciclo 12 h claro/escuro, e alimentados com ração comercial (Albina, Ecibra Ltda.) e água, ambas oferecidas "*ad libitum*".

### Drogas e reagentes

Mitomomicina C (Bristol-Myers Squibb), fosfato de sódio dibásico (Merck), fosfato de sódio monobásico (Merck), Giemsa (Doles), metanol (Ecibra) e soro fetal bovino (Nutricell).

### Procedimento experimental

Grupos de 5 animais foram tratados via intraperitoneal (i.p.) com extrato etanólico liofilizado de barbatimão nas doses de 50 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg, diluído em água destilada estéril, juntamente com 4 mg/kg (80% da  $DL_{50}$ ) de mitomicina C (MMC) i.p. Para controle positivo, foi administrada uma dose de 4 mg/kg de MMC e, para controle negativo, água destilada estéril. Para todas as doses utilizadas, a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) foi avaliada no tempo de 24 horas pós-tratamento. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os fêmures retirados. As epífises do fêmur foram cortadas e a medula óssea lavada com soro fetal bovino. Após homogeneização da medula no soro, esta foi centrifugada a 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi parcialmente descartado. O precipitado de células foi homogeneizado e uma gota de suspensão celular foi transferida para a lâmina de vidro, onde foi feito o esfregaço celular. Após secagem das lâminas, estas foram fixadas em metanol absoluto durante 5 minutos e coradas em solução Giemsa tamponada (pH 6,8) por um período de 15 minutos (Heddle, 1973). Decorrido esse período, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar em condições ambientais.

### Análise citogenética

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de luz (Olympus BH-2) com a finalidade de detectar possíveis aberrações e/ou perdas cromossômicas (micronúcleos) nos eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. As células foram visualizadas em objetiva de imersão (1000x), avaliando-se 2000 EPC, com duas lâminas para cada animal, conforme Schmid (1975).

**Análise estatística**

A média e o desvio-padrão dos valores de EPCMN/2000 EPC foram representados. Foi realizada comparação das médias de EPCMN dos tratamentos com o grupo controle positivo (MMC) pelo teste t-Student. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Atualmente, a farmacologia e a toxicidade de plantas utilizadas na medicina alternativa têm recebido a atenção da comunidade científica para a verificação de suas propriedades farmacológicas e/ou terapêuticas, e também para a investigação de suas possíveis atividades toxicológicas (Rebecca *et al.*, 2002). No presente trabalho foi avaliado o efeito antimutagênico do extrato etanólico de barbatimão (EEB) contra danos induzidos pela MMC pelo teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos. O referido teste visa a detectar e quantificar a ação mutagênica e/ou antimutagênica de agentes indutores e é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte de uma bateria de testes recomendada para estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram no mercado mundial (Choy, 2001).

Os resultados obtidos da frequência de EPCMN da medula óssea de camundongos tratados com diferentes doses de EEB estão apresentados na Tabela 1.

Os resultados obtidos mostraram que o EEB na dose de 50 mg/kg não provocou diminuição significativa na frequência de EPCMN quando comparada ao controle positivo ( $p > 0,05$ ). No entanto, nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg de EEB foi observada inibição significativa da frequência de EPCMN induzidos pela MMC ( $p < 0,05$ ). Desse modo, os resultados indicaram que o barbatimão exibiu atividade antimutagênica em camundongos.

A identificação precisa dos princípios ativos do *S. adstringens* ainda não é claramente elucidada. Entretanto, os taninos são compostos que possivelmente contribuem significativamente na atuação em diversas atividades biológicas da planta (Rebecca *et al.*, 2003). Na literatura, há descrições que taninos e compostos relacionados exerceram diversas atividades farmacológicas, como ação bactericida, antiviral, moliscidal e antihelmíntica, antihepatotóxica, inibição de xantina oxidase e mono-amino oxidase e inibição de glicosiltransferases. A atividade antimutagênica do barbatimão observada em nossos estudos pode estar relacionada à ação antioxidante e à habilidade dos taninos de formar complexos com outras macromoléculas, como proteínas, polissacarídeos e íons metálicos (Haslam, 1996).

*Agradecimentos* — O presente trabalho foi financiado pelo CNPq, FUNAPE e UFG. Os autores agradecem ao Dr. Pedro Henrique Ferri e Dra. Suzana da Costa Santos, do Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da UFG, pela liofilização do extrato etanólico da planta.

**Tabela 1** — Efeito da administração i.p. de EEB + MMC e controles em medula óssea de camundongos.

Controles	Nº de animais	Dados individuais (EPCMN/2000 EPC)					$\bar{x} \pm s$
		a	b	c	d	e	
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	5	12	10	9	8	10	9,80 ± 1,48
MMC	5	29	31	28	35	30	30,60 ± 2,70

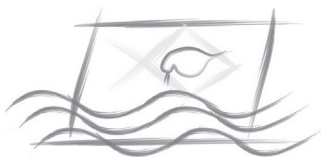
  

Tratamento	Nº de animais	Dados individuais (EPCMN/2000 EPC)					$\bar{x} \pm s$	Atividade antimutagênica
		a	b	c	d	e		
EEB (50 mg/kg) + MMC	5	28	30	29	30	26	28,60 ± 1,67	
EEB (100 mg/kg) + MMC	5	17	23	19	19	21	19,80 ± 2,28	–
EEB (200 mg/kg) + MMC	5	16	20	14	15	19	16,80 ± 2,58	–

CP: ciclofosfamida; MMC: mitomicina C; EEB: extrato de barbatimão; EPC: eritrócitos policromáticos; EPCMN: eritrócitos policromáticos micronucleados. –: atividade antimutagênica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUDI, E. A., TOLEDO, D. P., PERES, P. G., KIMURA, E., PEREIRA, W. K. V., MELLO, J. C. P., NAKAMURA, C. V., ALVES-DO-PRADO, W., CUMAN, R. K. N. & BERSANI-AMADO, C. A., 1999, Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. *Phytother. Res.*, 13: 264-266.
- BERSANI-AMADO, C. A., NAKAMURA, C. V., NAKAMURA, T. U., MARTINEZ, M. & MELLO, J. C. P., 1996, Avaliação das atividades antiinflamatória e antibacteriana do extrato bruto do *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão). In: *Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p.14.
- BEZERRA, J. C. B., SILVA, I. A., FERREIRA, H. D., FERRI, P. H. & SANTOS, S. C., 2002, Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Fitoterapia*, 73: 428-430.
- CHOY, W. N., 2001, Regulatory Genetic toxicology tests. In: W. N. Choy (ed.), *Genetic toxicology and cancer risk assessment*. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- COUTO, L. C., FORTIN, Y., KAMDEM, D. P. & COUTO, L., 2000, The fungicidal potential of hot water extractives of the bark of barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) alone and combined with the Fe<sup>+++</sup> and Al<sup>+++</sup> ions. Green wood bioassays. *Rev. Arvore*, 24: 105-113.
- D'OLIVEIRA, M. I. P., 1998, *Avaliação da atividade genotóxica e mutagênica do barbatimão em cepas bacterianas*. Dissertação de Mestrado em Biologia, Goiânia, UFG.
- DE SOUSA, N. C., DE CARVALHO, S., SPANÓ, M. A. & GRAF, U., 2003, Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 293-299.
- HASLAM, E., 1996, Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug and medicines: possible modes of action. *J. Nat. Prod.*, 59: 205-215.
- HEDDLE, J. A., 1973, A rapid in vitro test for chromosomal damage. *Mutat. Res.*, 18: 187-190.
- LIMA, J. C. S., MARTINS, D. T. O. & DE SOUZA, P. T. JR., 1998, Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. *Phytother. Res.*, 12: 218-220.
- MELLO, J. P., PETEREIT, F. & NAHRSTEDT, A., 1996, Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, 41: 807-813.
- NEVES, M. C. L., JORGE-NETO, J., IFA, D. R., FRACASSO, J. F., LEPERA, E. Z. P. & SILVA, R. F. P., 1992a, Estudo dos feitos farmacológicos produzidos pelos extratos aquosos de hamamelis e barbatimão. In: *Resumos da Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental*. Caxambu, p.7.
- NEVES, M. C. L., JORGE-NETO, J., IFA, D. R., FRACASSO, J. F., LEPERA, E. Z. P., SILVA, R. F. P. & LEPERA, E. Z. P., 1992b, Estudo dos feitos farmacológicos de hamamelis e barbatimão. In: *Resumos do Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Resumos, p.12.
- PANIZZA, S., ROCHA, A. B., GECCHI, R. & SILVA, R. A. P. S., 1988, *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. *Rev. Cienc. Farmacêuticas*, 10: 101-106.
- REBECCA, M. A., ISHII-IWAMOTO, E. L., GRESPAN, R., CUMAN, R. K. N., CAPARROZ-ASSEF, S. M., MELLO, J. C. P. & BERSANI-AMADO, C. A., 2002, Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. *J. Ethnopharmacol.*, 83: 101-104.
- REBECCA, M. A., ISHII-IWAMOTO, E. L., KELMER-BRACHT, A. M., CAPARROZ-ASSEF, S. M., CUMAN, R. K. N., PAGADIGORRIA, C. L. S., MELLO, J. C. P., BRACHT, A. & BERSANI-AMADO, C. A., 2003, Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. *Toxicol. Lett.*, 143: 55-63.
- SANTOS, C. A. M., TORRES, K. R. & LEONART, R., 1987, *Plantas medicinais (Herbarium, Flora et Scientia)*. Scientia et Labor, Curitiba, p. 39.
- SCHIMID, W., 1975, The micronucleus test. *Mutat. Res.*, 31: 9-15.
- TEIXEIRA, M. L., SOARES, A. R. & SCOLFORO, J. R. S., 1990, Variação do teor do tanino da casca de barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Mart, Coville) em 10 locais de Minas Gerais. *Cienc. Prat. Lavras*, 14: 229-232.



SETAC – Brazil

## Distribuição Espacial das Concentrações de Mercúrio em Sólidos em Suspensão no Alto Rio Madeira, Rondônia

J. P. DE O. GOMES,<sup>1\*</sup> E. L. DO NASCIMENTO,<sup>1</sup> R. DE ALMEIDA,<sup>1</sup>  
W. R. BASTOS,<sup>1</sup> J. V. E. BERNARDI<sup>1</sup> & P. R. H. B. DE BARROS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biogeoquímica Ambiental, Fundação Universidade Federal de Rondônia, UNIR,  
Rodovia BR 364, km 9,5, CEP 789000-500, Porto Velho, RO

<sup>2</sup>FURNAS – Centrais Elétricas do Brasil S.A.

### RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi estudar a distribuição espacial de Hg em sólidos em suspensão no trecho do Alto rio Madeira, compreendido entre sua formação pela confluência dos rios Beni e Mamoré até a cidade de Porto Velho, RO, utilizando-se técnicas de análise geoestatística. As coletas foram realizadas no período de 22 a 29 de novembro de 2003, sendo em seguida determinados os teores de Hg total por espectrofotometria de absorção atômica com geração de vapor frio. Os resultados revelam aumento médio das concentrações de Hg no Alto rio Madeira, a partir de sua formação (rios Beni e Mamoré) e ao longo de seu curso, principalmente na área de entrada de seus principais afluentes da margem direita (rios Jaci-Paraná e Mutum-Paraná), demonstrados pela técnica de Krigagem ordinária pontual. O uso da técnica geoestatística possibilitou observar o aporte importante de Hg dos afluentes que reforçam a tese da origem natural do Hg ou ainda a redistribuição do Hg inativo nas áreas de florestas próximas ao garimpo com o intenso uso da terra na região.

*Palavras-chave:* geoestatística, sólidos em suspensão, mercúrio, rio Madeira.

### ABSTRACT

#### **Spatial distribution of mercury concentration in suspension solids of the upper Madeira river, Rondônia**

The main goal of this work was going to study the spatial distribution of mercury in suspension solid in the upper Madeira river, comprehended between its formation by Beni and Mamoré rivers until Porto Velho's city, using geostatistical analysis techniques. The samplings were performed in November 22<sup>th</sup> to 29<sup>th</sup>, 2003, and soon after, the total mercury was determined by atomic absorption spectrophotometer coupled cold vapor generation. The results revealed average increase in Hg concentrations at the Upper Madeira river, from its formation (Beni and Mamoré rivers) and along its course, but mostly in the area of its main right bank affluents (Jaci-Paraná and Mutum-Paraná rivers), demonstrated by Pontual Kriging technique. The geostatistical technique used allowed to observe important increase of Hg in the main tributaries, which suggests the natural source of Hg or its redistribution from forests areas near gold mining by the regional land use.

*Key words:* geostatistic, suspension solids, mercury, Madeira river.

### INTRODUÇÃO

A bacia de drenagem do rio Madeira, devido à sua importância quanto ao fluxo de sólidos em suspensão carregados ao rio Amazonas, tem sido avaliada por vários autores (Sioli, 1967; Meade *et al.*, 1985; Martinelli *et al.*,

1993; Guyot *et al.*, 1999; Filizola-Júnior, 1999). De acordo com Guyot *et al.* (1999), o transporte de sólidos em suspensão no rio Madeira chega a  $40 \times 10^6$  t.ano<sup>-1</sup>, tornando-o um veículo de transporte e dispersão de poluentes orgânicos e inorgânicos, a exemplo de elementos-traço adsorvidos às partículas em suspensão.

\*Corresponding author: João Paulo de Oliveira Gomes, e-mail: labmerc@unir.br/joaopaulo@unir.br.

O transporte de Hg adsorvido aos sólidos em suspensão na bacia do rio Madeira, oriundo das atividades de garimpagem de ouro, da erosão dos solos marginais e da queima de floresta, tem sido o foco das discussões sobre a dinâmica e disponibilidade do Hg na bacia do rio Madeira (Pfeiffer & Lacerda, 1988; Maurice-Bourgoin *et al.*, 2000; Lechler *et al.*, 2000).

Entretanto, ainda não há referências de estudos sobre um modelo de distribuição espacial dos sólidos em suspensão relacionando-os com a distribuição de Hg na bacia do rio Madeira. Atualmente, procedimentos de avaliação da distribuição espacial de Hg baseados na modelagem espacial têm sido utilizados, principalmente através de métodos geoestatísticos, como a técnica de variografia e Krigagem. Os mapas de isotores gerados através das técnicas geoestatísticas são ferramentas úteis para identificar gradientes de concentração de um elemento químico (Wasserman & Queiroz, 2004). Deste modo, o principal objetivo deste trabalho foi modelar a distribuição espacial das concentrações de mercúrio nos sólidos em suspensão (TSS) no trecho do Alto rio Madeira, RO, utilizando-se técnicas geoestatísticas.

## ÁREA DE ESTUDO

O rio Madeira é o maior afluente da margem direita do rio Amazonas, tendo 1.459 km de extensão, a partir da confluência dos rios Mamoré e Beni, e vazão média de 23.000 m<sup>3</sup>/s. Seus rios formadores são originários ou recebem grande influência dos Altiplanos Andinos, cuja região de relevo elevado origina-se de rochas vulcano-sedimentares de idade Terciária. Devido às suas características limnológicas, o rio Madeira é classificado como rio de água branca, rico em material dissolvido e particulado, com transparência média de 10 a 50 cm (Sioli, 1967).

A área de estudo situa-se no Alto rio Madeira, compreendendo desde a sua formação pelos rios Mamoré e Beni, seus afluentes da margem direita (rio Jaci-Paraná e rio Mutum-Paraná) e seu mais importante afluente da margem esquerda (rio Abunã), chegando até a Cachoeira de Santo Antônio, Porto Velho (Figura 1). Nesse trecho de cerca de 360 km, o rio Madeira apresenta 18 cachoeiras, com desnível aproximado de 72 m e índice de declividade de 20 cm/km.

## METODOLOGIA

A amostragem foi realizada no período de 22 a 29 de novembro de 2003, início das chuvas na região e conseqüente aumento do nível fluviométrico do rio Madeira. Para elaboração do desenho experimental empregou-se a metodologia proposta por Bernardi *et al.* (2001), utilizando-se um receptor de GPS. Estabeleceram-se 11 transectos em uma área de 250 km de extensão no rio Madeira, sendo 3 pontos por transecto (margens esquerda e direita e centro do canal), distribuídos em uma malha

regular. A amostragem dos principais afluentes foi realizada apenas no ponto central do rio.

As amostras foram coletadas a  $\pm 25$  cm abaixo da superfície da lâmina d'água, obtendo-se de forma geral maior composição de partículas menores que 63  $\mu\text{m}$  ou 250 *mesh*, que são elementos-chave no transporte de elementos-traço. Em laboratório, as amostras foram submetidas a um processo de filtragem a vácuo em filtro de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro (Meade *et al.*, 1985). Posteriormente, as amostras foram submetidas a uma extração ácida proposta por Bastos *et al.* (1998), e a quantificação das concentrações de Hg foi realizada por EAA (espectrofotometria de absorção atômica com sistema de injeção em fluxo – FIMS 400 – Perkin Elmer®).

Para a construção dos mapas de isotores dos sólidos em suspensão e concentrações de Hg foi utilizada a técnica de Krigagem ordinária pontual com interpolador a partir de semivariogramas, utilizando-se o aplicativo Surfer 8®. O processo de Krigagem estima o valor de uma variável, em uma posição  $Z(x')$  não amostrada, a partir de uma pré-análise espacial do conjunto de amostras utilizando-se semivariogramas experimentais. O valor estimado no processo de Krigagem é dado por:

$$Z(\chi_0) = \sum_{i=1}^N \lambda_i Z(\chi_i)$$

em que: N é o número de vizinhos medidos,  $Z(\chi_i)$  são utilizados na estimativa da variável e  $\lambda_i$  são os ponderadores aplicados a cada  $Z(\chi_i)$ , os quais são selecionados de forma que a estimativa obtida seja não tendenciosa. Assim, tem-se o estimador não tendencioso da Krigagem ordinária pontual dado pela fórmula:  $E[Z_0 - Z^*]$  (Guerra, 1988).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à carga total de sólidos em suspensão (TSS) no Alto rio Madeira (Figura 2) corroboram os estudos realizados por Sioli (1967), Martinelli *et al.* (1993), Filizola-Junior (1999) e Guyot *et al.* (1999), em que se evidencia a origem da carga sólida transportada no rio Madeira pela drenagem de rios provenientes da região Andina, principalmente por influência do rio Beni (TSS = 415,68 mg.L<sup>-1</sup>), que possui carga sólida suspensa 11 vezes superior à do rio Mamoré no período de vazante (TSS = 30,63 mg.L<sup>-1</sup>). Já os afluentes do Alto rio Madeira têm pequena contribuição no fluxo sedimentar, devido à pouca quantidade de sólidos em suspensão, na ordem de 10 até 100 vezes menos partículas que o rio Madeira, atuando em conjunto com os processos de erosão marginal no canal do rio Madeira para o enriquecimento de elementos-traço no talvegue desse rio.

Neste estudo, os valores médios de Hg adsorvidos aos sólidos em suspensão no Alto rio Madeira variaram de 5,67 a 247,02  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (Figura 2). Esses valores estão acima dos

encontrados por Maurice-Bourgoin *et al.* (2000) no rio Beni (2-8  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e no rio Madeira (10  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) no final da década de 1990. Na Figura 2 observa-se que ocorre aumento médio nas concentrações de Hg adsorvido aos sólidos em suspensão no rio Madeira após a sua formação e ao longo do seu curso, principalmente nos pontos de confluência com os seus afluentes (P4 – rio Jaci-Paraná; P8 – rio Mutum-Paraná; P11 – Igarapé Araras), embora apresentem menor quantidade de sólidos em suspensão. Observam-se também grandes variações de Hg nas regiões próximas à confluência com esses afluentes (P11, P9, P8, P6, P5 e P4), onde ocorrem maiores concentrações de Hg, possivelmente relacionadas ao enriquecimento por Hg dos solos marginais de floresta devido à deposição atmosférica de Hg proveniente da queima do amálgama Hg-Au no garimpo. Isso pode estar relacionado à redistribuição do mercúrio remanescente, pois esses afluentes foram intensivamente

utilizados como áreas de manutenção de balsas e dragas no período auge da mineração de ouro entre as décadas de 1970 e 1990. Não se descarta também a possibilidade da entrada de Hg proveniente das florestas devido ao atual intenso uso da terra pela atividade de agropecuária.

Durante a intensa mineração de ouro na região, a perda de Hg no processo chegou a atingir de 40% a 45% do total utilizado lançado diretamente no rio Madeira, e o restante do Hg sublimava para a atmosfera na ordem de 55% a 60% (Pfeiffer & Lacerda, 1988). Uma vez que a deposição da maior parte do Hg atmosférico originado em garimpos na Amazônia ocorre a cerca de 20 a 40 km da fonte (Lacerda *et al.*, 2004), é provável que a maior parte do Hg perdido para a atmosfera em Rondônia tenha sido depositada nesses solos marginais de florestas. E atualmente, com o intenso uso da terra, esse Hg estaria sendo redistribuído para os cursos d'água.

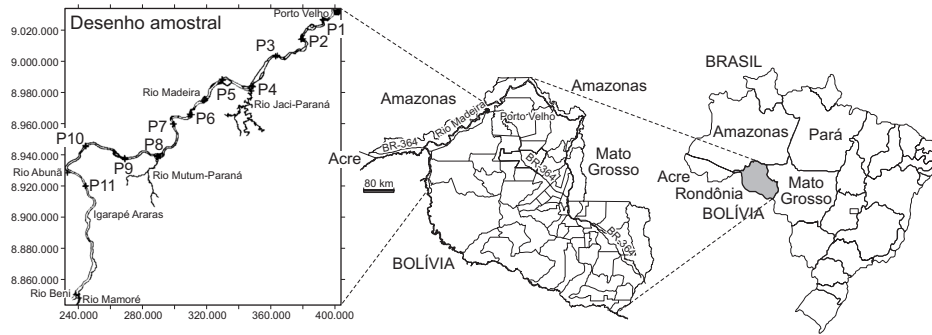


Figura 1 — Localização da área de estudo.

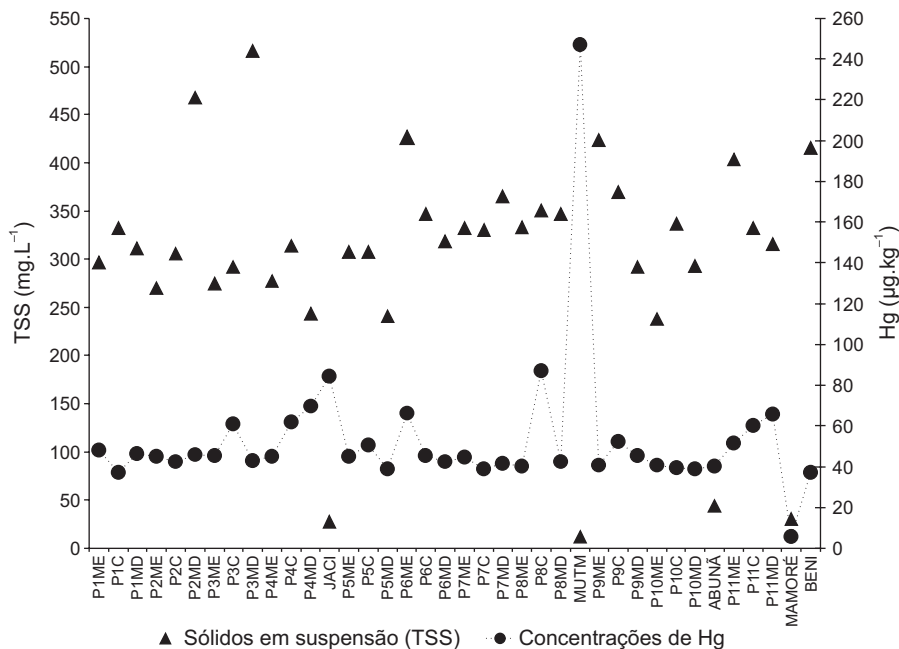


Figura 2 — Concentrações de mercúrio e total de sólidos em suspensão no Alto rio Madeira.

A análise espacial dos sólidos em suspensão através da técnica geoestatística de variografia ajustou-se a um modelo semivariográfico anisotrópico esférico (Figura 3A). Este modelo explica a dependência espacial dos sólidos em suspensão até a distância de 38.000 m (a), ou seja, existe dependência espacial entre os valores separados por distâncias maiores do que o intervalo de amostragem (25 km). Desta forma, a amostragem sistemática em malha utilizada se adequou ao alcance obtido, explicando que todos os pontos dessa malha podem ser usados para a interpolação de valores pela técnica de Krigagem.

O patamar obtido ( $C = 10.000$ ) indica a variância segundo a qual a função se estabiliza no campo aleatório. Deste ponto em diante, considera-se que não há mais dependência espacial entre as amostras, porque a variância da diferença entre os pares de amostras torna-se aleatória. A dispersão espacial dos sólidos em suspensão com taxa de anisotropia de 2.0 e tolerância angular de  $56^\circ$  com direção 21 indica que essa variável possui direção preferencial de variação: Noroeste. E o efeito pepita ( $C_0 = 1.400$ ) indica que há descontinuidade entre valores separados por distâncias menores do que o usado no intervalo de amostragem.

Os mapas de isotores dos sólidos em suspensão, gerados pela técnica de Krigagem ordinária pontual (Figuras 4A e B), demonstram as variações nas concentrações de sólidos em suspensão nos pontos de confluência com os seus principais afluentes (águas pretas), que nascem nos Pacaás Novos. Drenando solos de formação quaternária, ou seja, que sofrem menos intemperismo, conseqüentemente ocorre menor liberação de sedimentos. Para as concentrações de Hg, o modelo ajustado foi o modelo anisotrópico linear (Figura 3B). Esse tipo de modelo não atinge o patamar, ou seja, a variável apresenta aumento constante de variabilidade à medida que a distância é incrementada. Sendo esse tipo de modelo utilizado para modelar fenômenos que possuem capacidade infinita de dispersão. O efeito pepita na origem dos dados ( $C_0 = 80$ ) indica pequenas descontinuidades relacionadas à variabilidade das concentrações de Hg em pequena escala não captada pela amostragem. Os mapas de isotores das concentrações de Hg, gerados pela técnica de Krigagem (Figuras 5A e B), demonstram a influência exercida pelos afluentes amostrados para o aumento da média regional das concentrações de Hg ao longo do Alto rio Madeira, tendo a concentração de Hg do rio Mutum-Paraná ultrapassado a média mundial, que é de  $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

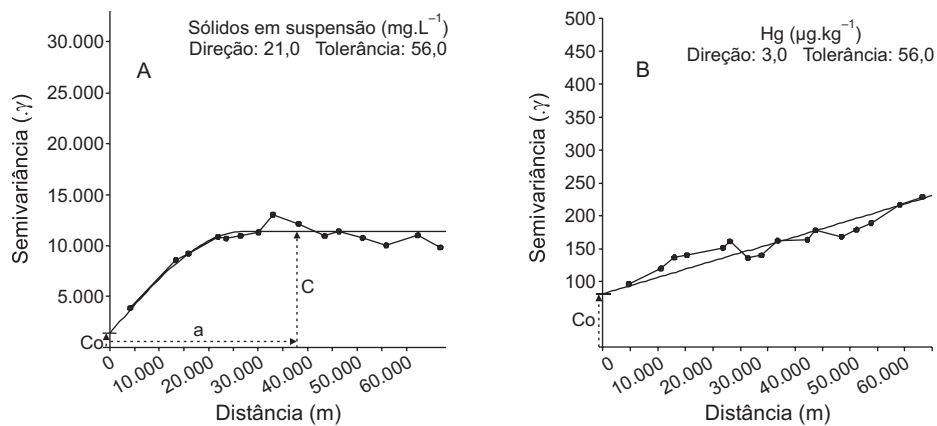


Figura 3 — Semivariogramas dos sólidos em suspensão (A) e das concentrações de Hg (B).

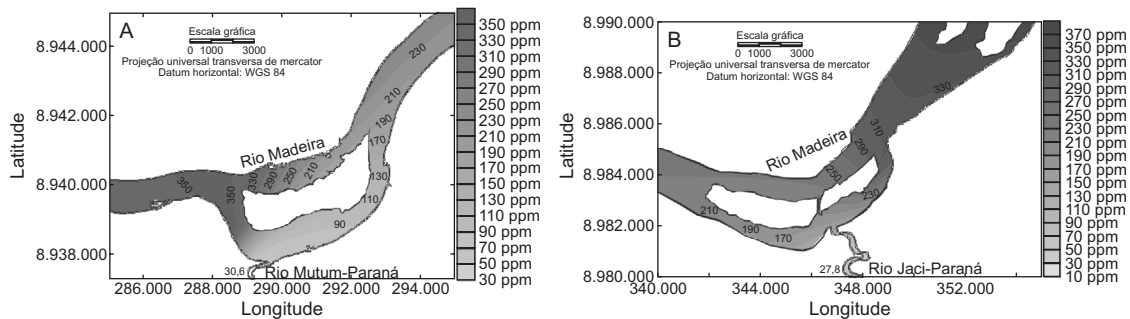
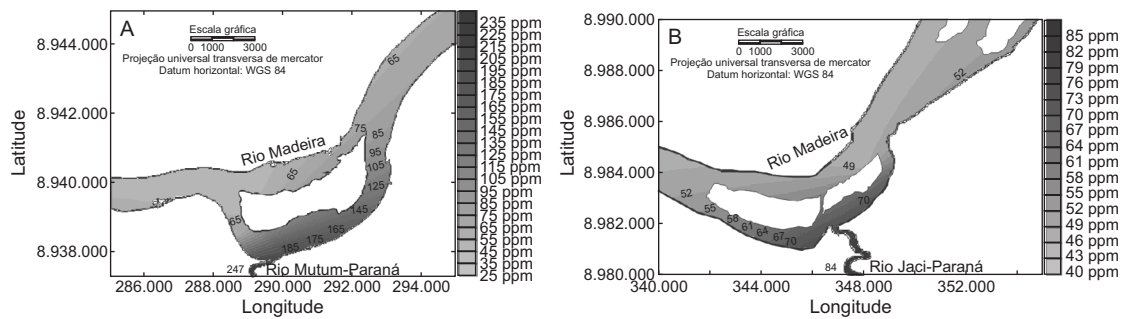


Figura 4 — Mapas de isotores dos sólidos em suspensão ( $\text{mg.L}^{-1}$  = ppm) nos pontos de confluências com os afluentes: Mutum-Paraná (A) e Jaci-Paraná (B).



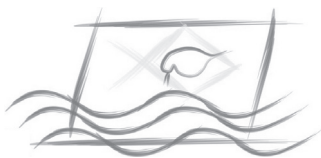
**Figura 5** — Mapas de isotores de Hg ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  = ppb) nos sólidos em suspensão dos pontos de confluência com os afluentes: Mutum-Paraná (A) e Jaci-Paraná (B).

## CONCLUSÕES

Este estudo revela que, mesmo com a significativa redução nos lançamentos de Hg provenientes das atividades de mineração de ouro na região, o Hg continua sendo transportado pelos sólidos em suspensão no Alto rio Madeira, principalmente nas áreas em torno dos principais afluentes, rios Jaci-Paraná e Mutum-Paraná. Esta contribuição de Hg proveniente dos principais tributários pode estar relacionada às intensas práticas agropecuárias, como a queimada de florestas e o avanço da produção de soja, resultando no aumento da erosão dos solos marginais. Portanto, recomenda-se a continuidade do monitoramento na região, sobretudo pela potencial biodisponibilidade e pelo efeito biomagnificador do Hg para a diversificada biota regional.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTOS, W. R., MALM, O., PFEIFFER, W. C. & CLEARY, D., 1998, Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon – Brazil. *Ciên. e Cult. Jour. of the Brazil.*, 50: 255-260.
- BERNARDI, J. V., FOWLER, H. G. & LANDIM, P. M. B., 2001, Um estudo de impacto ambiental utilizando análises estatísticas espacial e multivariada. *Holos Envir.*, 1(2): 162-172.
- FILIZOLA-JUNIOR, N. P., 1999, *O fluxo de sedimentos em suspensão nos rios da Bacia Amazônica Brasileira*. ANEEL, Brasília, DF, 62p.
- GUERRA, P. A. G., 1988, *Geoestatística operacional*. Depart. Nacion. de Prod. Min., Brasília, 145p.
- GUYOT, J. L., JOUANNEAU, J. M. & WASSON, J. G., 1999, Characterisation of river bed and suspended sediments in the Rio Madeira drainage basin (Bolivian Amazonia). *Jour. of South Amer. Earth Scien.*, 12: 401-410.
- LACERDA, L. D., SOUZA, M. & RIBEIRO, M. G., 2004, The effects of land use change on mercury distribution in soils of the Alta Floresta, Southern Amazon. *Envirom. Pollut.*, 129(2): 247-255.
- LECHLER, P. J., MILLER, J. R., LACERDA, L. D., VINSON, D. J. C., BONZONGO LYONS, W. B. & WARWICK, J. J., 2000, Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: A function of natural enrichments? *Scien. of the Tot. Environ.*, 260: 87-96.
- MARTINELLI, L. A., FORSBERG, B. R., VICTORIA, R. L., DEVOL, A. H., MORTATTI, J., FERREIRA, J. R., BONASSI, J. & DE OLIVEIRA, E., 1993, Suspended sediment load in the Madeira River. *Mitt. Geol. Paanont. Inst. Univ. Hamburg*, 74: 41-54.
- MAURICE-BOURGOIN, L., QUIROGA, I., CHINCHEROS, J. & COURAU, P., 2000, Mercury distribution in waters and fishes of the upper Madeira River and mercury exposure in riparian Amazonian populations. *Scien. of the Tot. Environ.*, 260: 73-86.
- MEADE, R. H., DUNNE, T., RICHEY, J. E., SANTOS, U. M. & SALATI, E., 1985, Storage and remobilization of suspended sediment in the lower Amazon River of Brazil. *Scien.*, 228: 488-490.
- PFEIFFER, W. C. & LACERDA, L. D., 1988, Mercury inputs to the Amazon region, Brazil. *Environ. Technol. Lett.*, 9: 325-350.
- SIOLI, H., 1967, Hydrochemistry and geology in the Brazilian Amazon region. *Amazon.*, 1(3): 267-277.
- WASSERMANN, J. C. & QUEIROZ, E. L., 2004, The attenuation of concentrations model: a new method for assessing mercury mobility in sediments. *Quim. Nova*, 27(1): 17-21.



## Ensaio de Comportamento com Minhocas (*Eisenia fetida*) para Avaliação de Áreas Contaminadas: Resultados Preliminares para Contaminação por Hidrocarbonetos

C. L. S. SISINNO,<sup>1\*</sup> M. R. M. BULUS,<sup>2</sup> A. C. RIZZO<sup>3</sup> & J. C. MOREIRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Escola Nacional de Saúde Pública, Rua Leopoldo Bulhões, 1480, Manguinhos, CEP 21041-210, Rio de Janeiro, RJ

<sup>2</sup>Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente (FEEMA), Setor de Ecotoxicologia, Av. Salvador Allende, 5.500, Jacarepaguá, CEP 22780-160, Rio de Janeiro, RJ

<sup>3</sup>Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), Coordenação de Desenvolvimento Sustentável, Av. Ipê, 900, Ilha do Fundão, CEP21941-590, Rio de Janeiro, RJ

### RESUMO

Os problemas oriundos de áreas contaminadas vêm crescendo cada vez mais no Brasil. Essas áreas podem ser representadas por postos de serviços, locais de disposição inadequada de resíduos sólidos, indústrias desativadas, etc., e muitas vezes se encontram nas proximidades de ecossistemas, causando impactos negativos. A avaliação da contaminação dessas áreas tem sido realizada apenas com o auxílio de parâmetros químicos, sem a inserção da avaliação ecotoxicológica. O objetivo deste trabalho foi iniciar ensaios preliminares segundo o *draft* da ISO, que descreve um ensaio de comportamento para testar a qualidade de solos e a toxicidade de substâncias químicas com o organismo *Eisenia fetida* (minhoca). Esse ensaio pode ser aplicado como um método rápido para determinar a biodisponibilidade de substâncias químicas ou de contaminantes no solo para *E. fetida*, em que o comportamento de fuga é usado como indicador. Com base nos resultados, pode ser decidido se o ensaio de reprodução com a mesma espécie deve ou não ser realizado. Amostras de áreas contaminadas com diferentes concentrações de hidrocarbonetos providas de uma garagem de ônibus, um posto de serviços e uma área com derramamento de óleo foram analisadas por meio desse ensaio. Os resultados da amostra originada da garagem de ônibus mostraram que 96% dos organismos fugiram da seção que continha a amostra contaminada para a seção onde estava o solo controle, indicando que a amostra pode ser considerada tóxica, apresentando sua função de habitat limitada. A toxicidade dessa amostra foi posteriormente confirmada pelos ensaios de letalidade e reprodução. Os resultados preliminares indicaram que o ensaio de comportamento foi um indicador rápido da toxicidade da amostra e pode ser aplicado como complementação da avaliação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos.

*Palavras-chave:* ecotoxicologia terrestre, minhoca, *Eisenia fetida*, áreas contaminadas, hidrocarbonetos.

### ABSTRACT

#### **Avoidance test using earthworms (*Eisenia fetida*) for contaminated sites evaluation: preliminary results for hydrocarbon contamination**

Problems related to contaminated sites are increasing in Brazil. These sites can be represented by gas station, waste disposal areas, abandoned industrial facilities, etc. and in general are located in the neighborhood of important ecosystems, being cause of negative impacts. Evaluation of contaminated sites in Brazil has been done using only chemical parameters, without ecotoxicological studies. The aim of this study was initiate preliminary tests according to the *draft* of ISO that

\*Corresponding author: Cristina L. S. Sisinno, e-mail: cristina.sisinno@uol.com.br.

describes an avoidance test used to assess soil quality and toxicity from chemical to *Eisenia fetida* (earthworm). This test can be applied as a rapid screening test to determinate the bioavailability of chemicals or contaminants in soil to *E. fetida*, where the avoidance behaviour is used as indicator. In accordance to the results, it can be decided if reproduction test with the same species must be performed. Samples from contaminated sites with different hydrocarbons concentrations collected from a bus garage, a gas station and a contaminated oil spilling area were analysed. The results of the sample from the bus station showed that 96% of the organisms escaped from the contaminated sample section to the control soil section. This indicates that the sample can be considered toxic, presenting the habitat function limited. The toxicity of this sample was confirmed later by mortality and reproduction tests. The preliminary results indicated that avoidance test was a rapid indicator of sample toxicity and can be applied as a complement to evaluate hydrocarbons contaminated sites.

*Key words:* terrestrial ecotoxicology, earthworm, *Eisenia fetida*, contaminated sites, hydrocarbons.

## INTRODUÇÃO

Os problemas oriundos de áreas contaminadas vêm crescendo cada vez mais no Brasil. Essas áreas podem ser representadas por postos de serviços e abastecimento, locais de disposição inadequada de resíduos sólidos, indústrias desativadas, etc., e muitas vezes encontram-se nas proximidades de núcleos populacionais e ecossistemas, podendo causar impactos negativos ao ambiente e à saúde.

Estudos de avaliação de risco ambiental, ecológico e à saúde humana podem ser realizados em áreas contaminadas, mas ainda são considerados em desenvolvimento e pouco aplicados no Brasil (Sisinno, 2003).

Algumas áreas contaminadas por substâncias químicas de importância para a saúde humana e ambiental têm sido frequentemente estudadas e cresce o interesse dos órgãos de saúde e ambiente no controle do impacto causado por esses locais, uma vez que a identificação e o cadastramento dessas áreas permitem que ações preventivas ou corretivas relacionadas à possível contaminação do solo, ar, águas superficiais e subterrâneas e biota sejam estabelecidas, e os riscos minimizados.

A avaliação da contaminação dessas áreas tem sido realizada apenas com o auxílio de parâmetros químicos, sem a inserção da avaliação ecotoxicológica. Entretanto, por meio dos ensaios ecotoxicológicos são verificados os efeitos das variáveis ambientais que são capazes de afetar a toxicidade das substâncias aos componentes vivos de um ecossistema. Dessa forma, esses ensaios podem indicar uma resposta mais precisa da toxicidade dos contaminantes presentes nas amostras para os organismos vivos; o que apenas a análise química de cada composto, separadamente, não é capaz de avaliar.

Os procedimentos para execução de ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos são bem estabelecidos e descritos em normas técnicas brasileiras da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), métodos de alguns órgãos de fiscalização ambiental, como a Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente – RJ (FEEMA) e a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – SP (CETESB), e métodos descritos no Manual de Testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos, organizado pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (Sisinno *et al.*, 2004).

Entretanto, os ensaios para avaliação da ecotoxicidade com organismos de solo não estão bem estabelecidos no Brasil por não existirem ainda normas da ABNT e pelo fato de os métodos descritos no Manual do IBAMA estarem desatualizados. Dessa forma, quando há necessidade de avaliação da contaminação de amostras de solos, normalmente são utilizados métodos internacionalmente reconhecidos, como os da ISO (*International Organization for Standardization*), OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) e EPA (*Environmental Protection Agency – USA*) (Sisinno *et al.*, 2004).

Esses métodos, entretanto, são desenvolvidos para determinar a toxicidade de substâncias adicionadas a um solo artificial, a fim de que vários interferentes sejam eliminados. O grande desafio na adaptação desses métodos para a complementação da avaliação de áreas contaminadas é a substituição do substrato artificial pelas amostras de solos trazidas dessas áreas, a avaliação dos possíveis interferentes nos resultados, bem como a escolha dos organismos-teste para amostras com determinadas características.

O objetivo deste estudo foi realizar ensaios de toxicidade com minhocas em amostras naturais provenientes de áreas contaminadas por hidrocarbonetos, a fim de que sua utilização seja analisada como complementação no processo de avaliação de áreas contaminadas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de áreas contaminadas por hidrocarbonetos originadas de uma garagem de ônibus (Amostra 1), um posto de serviços e abastecimento (Amostra 2) e uma área com derramamento de óleo (Amostra 3) foram avaliadas utilizando-se ensaios de comportamento com minhocas da espécie *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Oligochaeta, Lumbricidae), segundo o draft da ISO *Avoidance test for testing the quality of soils and the toxicity of chemicals* (ISO, 2002).

Os ensaios de letalidade e reprodução foram realizados de acordo com as normas ISO 11268-1 – *Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida) – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate* (ISO, 1993) e ISO 11268-2 – *Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida) – Part 2: Determination of effects on reproduction* (ISO, 1998).

O solo controle foi preparado artificialmente, segundo a ISO 11268-2, na proporção de 70% de areia lavada e peneirada, 20% de caulim em pó e 10% de *Sphagnum* (briófita) moído. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo desenvolvidos em condições controladas de temperatura ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), luminosidade (400 lux a 800 lux) e fotoperíodo (12 h: 12 h).

O lote dos organismos utilizados foi avaliado por meio de um ensaio com a substância de referência Cloroacetamida, indicada nas normas da ISO para o organismo-teste usado. A CL(D)50 da Cloroacetamida deve estar entre 20 mg/kg e 80 mg/kg (ISO, 1993). As minhocas utilizadas foram indivíduos adultos, com clitelo desenvolvido e peso entre 300 e 600 g.

O ensaio de comportamento, ainda pouco testado no Brasil, pode ser aplicado como um método rápido para determinar a biodisponibilidade de substâncias químicas ou de contaminantes no solo para *E. fetida*, em que o comportamento de fuga é usado como indicador (ISO, 2002).

O princípio desse ensaio é a exposição das minhocas simultaneamente às amostras de solo não contaminado (controle) e contaminado. Ambas as amostras são colocadas no mesmo recipiente, em seções distintas, separadas por meio de uma divisória, formando dois compartimentos. Após a arrumação das amostras em cada lado da divisória, a mesma é retirada, formando uma linha onde 10 organismos são colocados na superfície. Ao final de 48 horas, o número de organismos é determinado em cada seção do recipiente. A amostra é considerada tóxica (com a função de habitat do solo limitada) se forem encontrados mais de 80% do total de organismos expostos na amostra do solo controle.

No início do ensaio de letalidade foram colocados 10 organismos adultos em cada recipiente com a amostra contaminada. Após o 7º dia de exposição, os organismos mortos foram retirados e os sobreviventes mantidos até o 14º dia, quando, então, foram separados para que o percentual de mortalidade obtido fosse comparado com o controle.

No ensaio de reprodução, os 10 organismos permaneceram nos recipientes até o 28º dia, quando foram retirados para que apenas os casulos resultantes permanecessem até o 56º dia do ensaio. Após esse período, os jovens foram contados e comparados ao controle.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados preliminares para o ensaio de comportamento mostraram que na Amostra 1, proveniente de uma garagem de ônibus, 96% dos organismos foram encontrados vivos na seção que continha o solo controle, indicando que esta amostra pode ser considerada tóxica, apresentando sua função de habitat limitada.

As Amostras 2 e 3 não foram consideradas tóxicas pelo ensaio de comportamento, uma vez que 33% e 63% dos

organismos, respectivamente, foram encontrados na seção onde estava o solo controle. Dessa forma, procedeu-se aos ensaios de letalidade e reprodução apenas com a Amostra 1.

No ensaio de letalidade (toxicidade aguda), os 30 organismos expostos ao solo contaminado morreram, indicando alta mortalidade (100%) quando comparada ao controle (0% de morte).

Em relação à taxa de reprodução, não foram encontrados casulos nem indivíduos jovens na amostra avaliada, enquanto no controle foram encontrados 21 casulos e 30 organismos jovens.

Uma vez que não houve necessidade de ajustes nas características da Amostra 1 para garantir a sobrevivência dos organismos durante os ensaios (apenas a umidade foi ajustada para aproximadamente 60%, conforme exigência das condições para os ensaios), entende-se que os resultados obtidos estejam expressando de forma bem realista o impacto negativo da contaminação dessa área para um importante organismo do solo, como é o caso da minhoca.

Os resultados preliminares mostram que o ensaio de comportamento foi um indicador rápido da toxicidade, uma vez que tanto o ensaio de letalidade como o de reprodução mostraram, após maior período de exposição, a alta toxicidade da amostra.

Dessa forma, entende-se que os ensaios realizados com *E. fetida* – adaptados com o uso de solos de áreas contaminadas – podem ser aplicados na complementação da avaliação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos. De acordo com os resultados de Hund-Rinke & Wiechering (2001), os ensaios de comportamento com amostras de áreas contaminadas mostraram significativamente maior sensibilidade do que os ensaios com amostras contaminadas artificialmente.

Entretanto, deve-se ressaltar que variáveis relacionadas à composição do solo a ser testado precisam ser sempre bem avaliadas, se o objetivo dos ensaios for a avaliação da toxicidade com amostras naturais, sem a necessidade de mistura com o solo artificial.

Esses ensaios poderão ser aplicados na avaliação de risco ecológico para verificar o grau de injúria aos organismos representantes do ecossistema afetado e sua capacidade de encontrar condições de se estabelecer novamente em uma área comprometida por contaminação química.

Além disso, esses ensaios também poderão auxiliar na avaliação da capacidade de recuperação ecológica de uma área, após processo de descontaminação. Atualmente, a efetiva descontaminação de uma área é avaliada apenas por análises químicas. Entretanto, não se pode afirmar que as concentrações remanescentes dos contaminantes ainda não sejam tóxicas para os organismos do solo ou mesmo que o uso de substâncias durante o processo de remediação da área não possa ter afetado seu equilíbrio ecológico.

*Agradecimentos* — Os autores gostariam de agradecer o apoio fundamental dos seguintes profissionais: Regina Sáfadi e Alice Fontes da TECAM; Marcos Garcia da EMBRAPA-Manaus; Daniele Alves da Rocha da FEEMA; e Jorge Luiz Florindo da Cruz do CETEM. J. C. M. agradece ao CNPq.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HUND-RINKE, K. & WIECHERING, H., 2001, Earthworm avoidance test for soil assessments: an alternative for acute and reproduction tests. *J. Soils & Sediments*, 1: 15-20.
- ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION), 1993, *ISO 11268-1*. Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 1: determination of acute toxicity using artificial soil substrate. Geneva, ISO.
- ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION), 1998, *ISO 11268-2*. Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 2: determination of effects on reproduction. Geneva, ISO.
- ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION), 2002, *Draft*. Avoidance test for testing the quality of soils and the toxicity of chemicals – Part 1: test with earthworms (*Eisenia fetida*). Geneva, ISO.
- SISINNO, C. L. S., 2003, *Uso de ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos e do solo para avaliar a toxicidade de amostras de solos contaminados e resíduos sólidos*. Proposta de projeto de pesquisa da FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- SISINNO, C., BULUS, M., RIZZO, A., SÁFADI, R., FONTES, A. & MOREIRA, J., 2004, Ensaio ecotoxicológicos como um instrumento de complementação da avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares em áreas contaminadas por hidrocarbonetos, pp. 150-154. In: *III Seminário Nacional de Saúde e Ambiente*, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 164p.

## Estudo Comparativo da Qualidade dos Sedimentos dos Reservatórios do Rio Tietê (SP)

C. A. DE ALMEIDA<sup>1\*</sup> & O. ROCHA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CRHEA – Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada, EESC-USP, Avenida Trabalhador São-carlense, 400, São Carlos, SP

<sup>2</sup>DEBE – Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, CCBS, UFSCar, Rodovia Washington Luís, km 235, São Carlos, SP

### RESUMO

Há um consenso geral de que, nos ambientes aquáticos, o sedimento desempenha papel fundamental na dinâmica de transporte, acumulação e disponibilização de contaminantes. Na tríade de qualidade de sedimentos, considerada uma das melhores abordagens para o estudo de sistemas aquáticos impactados por efluentes antropogênicos, os dados químicos e os biológicos (bioensaios e análise de biodiversidade) são combinados para gerar um perfil de degradação de cada unidade amostral. A composição dos valores de RTM (relação de máximo valor) fornece informações visuais úteis, pois estes podem ser plotados em eixos com origem comum, dessa forma, uma medida relativa da degradação pode ser obtida calculando-se a área formada pelo desenho de cada estação ou ponto amostral. Esse *design* de estudo comparativo foi aplicado como alternativa às análises multivariadas (PCA, Agrupamento, etc.) aos dados obtidos pelo projeto Qualised – bases técnico-científicas para o desenvolvimento de critérios de qualidade de sedimento – durante o período de 2000 a 2001. Os resultados permitem classificar os reservatórios com relação ao impacto que sofrem e fornecem indícios sobre os vetores de degradação aos quais os ambientes estão sujeitos. A distribuição espacial dos sedimentos potencialmente tóxicos acompanha o grau de trofia do rio Tietê, isto é, os ambientes a jusante são menos eutrofizados do que a montante, portanto, a qualidade dos ecossistemas melhora com a distância da Região Metropolitana de São Paulo, confirmando a origem da maioria das substâncias poluidoras. Os reservatórios de Rasgão e Billings são os mais impactados, ao passo que o reservatório de Promissão apresenta melhores condições ambientais.

*Palavras-chave:* reservatórios do Tietê, qualidade de sedimento.

### ABSTRACT

#### Comparative study of sediments quality from the Tietê river reservoirs (SP)

There is a general consensus that the sediment from water bodies plays a fundamental role in the transport dynamics, accumulation and availability of pollutants. In the sediments quality triad, considered one of the best approaches for the study of anthropogenic contaminated aquatic systems, the chemical and biological data (bioassays and benthic community analysis) are combined to show the degradation of each site. The RTM (ratio to maximum value) values provide useful visual information, because they can be plotted in axes with common origin. Therefore, a relative measure of sediment degradation can be obtained, by calculating the area formed by the figure obtained for each station or site. This comparative design of study was applied as an alternative to the multivariate analyses (PCA, Cluster, etc.) to the data obtained by the Qualised project – Technical-Scientific Bases For the Development of Sediment Quality Criteria – for the 2000 to 2001 period. The results allow the classification of the reservoirs based on their respective sediment quality and indicate the degradation vectors they are subject to. The spatial distribution of sediments potentially toxic accompanies the trophic gradient of Tietê River, i.e., the downstream reservoirs are less eutrophicated than the upstream ones. Therefore, the quality of the sediments improves with the distance from the metropolitan area of São Paulo confirming the origin of most of pollutant substances. The sediments of Rasgão and Billings reservoirs were considered those with lower quality, while those from Promissão reservoir present a better condition.

*Key words:* Tietê reservoirs, sediment quality.

\*Corresponding author: Caio Augusto de Almeida, e-mail: caugusto@sc.usp.br.

## INTRODUÇÃO

O estudo das interações entre o ambiente sedimentar, a coluna d'água e os organismos revela a complexa dinâmica dos ecossistemas aquáticos. A avaliação da qualidade dos sedimentos é, conseqüentemente, essencial para a compreensão dos processos que ordenam a disponibilidade e a destinação dos poluentes dispostos nos corpos hídricos, uma vez que é o compartimento preferencial de armazenamento e transformação da maioria dos poluentes lançados pelo homem. Todavia, a integração de dados tão diversos como os gerados por esforços de monitoramento ambiental é controversa e muito discutida acerca da acuracidade dos resultados dos diversos métodos que possam ser aplicados. Apesar do desenvolvimento de métodos mais completos, como as análises multivariadas (Agrupamento, PCA, etc.), ainda não há um método que seja considerado o melhor para lidar satisfatoriamente com o amplo espectro de situações e de dados gerados em pesquisas desse tipo.

Chapman *et al.* (1987) sugerem que os dados sejam todos tratados quantitativamente, fazendo-se a devida normalização de seus valores (parâmetros limnológicos, químicos e biológicos), através da conversão dos valores para razões de referência (RTR, do inglês *ratio to reference*), a fim de poderem ser combinados e gerar um perfil de degradação de cada unidade amostral. Os critérios para a definição das razões de referência são baseados na suposição de que as concentrações em um ponto de coleta referência, relativamente conservado, são representativas de condições "background". Os aumentos relativos das concentrações de substâncias químicas, em relação a uma média de referência de uma unidade amostral específica, são usados como evidência para considerar que essas substâncias têm origem antrópica. Devido à grande extensão dos estragos causados pelo homem ao meio ambiente, muitas vezes não há um local relativamente livre de contaminação que possa ser usado como referência de determinado ambiente; nesse

caso a determinação de RTR pode levar em consideração os máximos valores obtidos (RTM, *ratio to maximum value*) (Chapman, 1990).

## MATERIAL E MÉTODOS

Os dados utilizados no presente trabalho foram produzidos durante o projeto Qualised – bases técnico-científicas para o desenvolvimento de critérios de qualidade de sedimento –, um esforço inter e multidisciplinar envolvendo vários pesquisadores e técnicos da UFSCar, UNICAMP e CETESB, que estudaram os reservatórios em cascata da bacia do rio Tietê durante os anos de 2000 e 2001 (Qualised, 2002). O *design* de estudo comparativo proposto por Chapman, conhecido como tríade de qualidade de sedimento, foi aplicado a dados do projeto Qualised, que são mostrados nas Tabelas 1 e 2. Os valores desses parâmetros foram convertidos em razões para o valor máximo e os índices da tríade, segundo as seguintes relações:

Cálculo de RTM

$$RTM = V_{yi}/V_{my}$$

Integração dos valores de RTM

$$I_{\max} = \sum RTM_i/n$$

em que:

y = variável avaliada

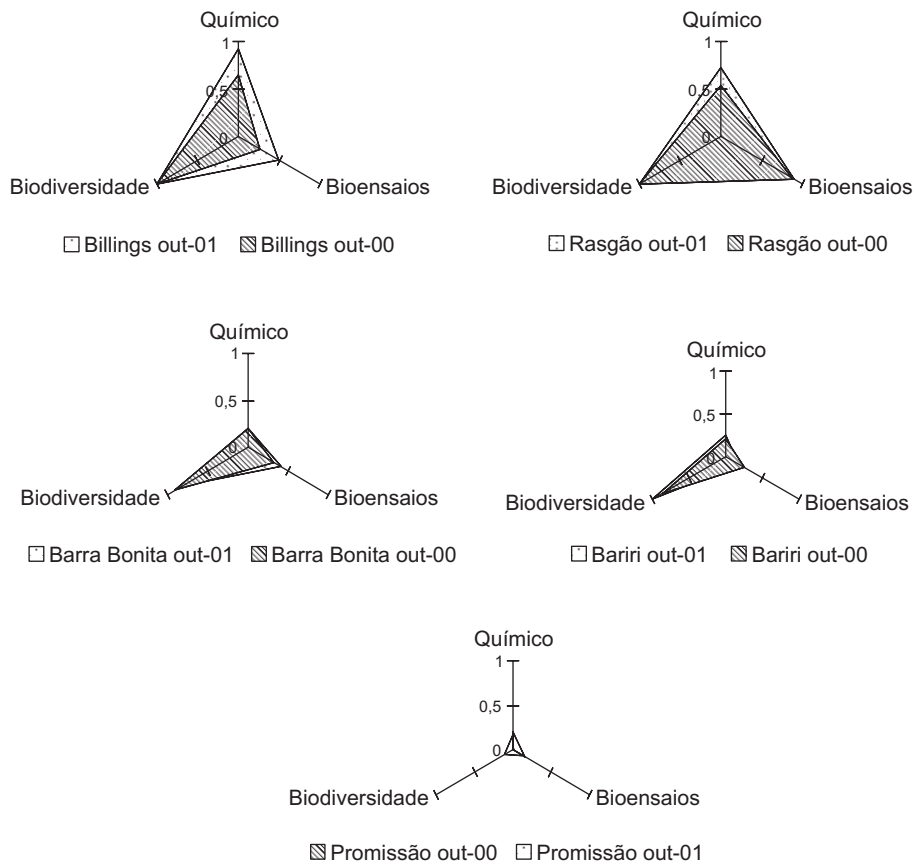
i = estação de coleta

$V_{yi}$  = parâmetro y na estação i

$V_{my}$  = valor máximo da variável

Chapman propõe que, na tríade, os valores de RTR/RTM sejam transformados em três índices: toxicológico, de diversidade biológica e de contaminação. Cada índice é plotado em um eixo para a visualização e análise comparativa dos dados, como mostrado na Figura 1.

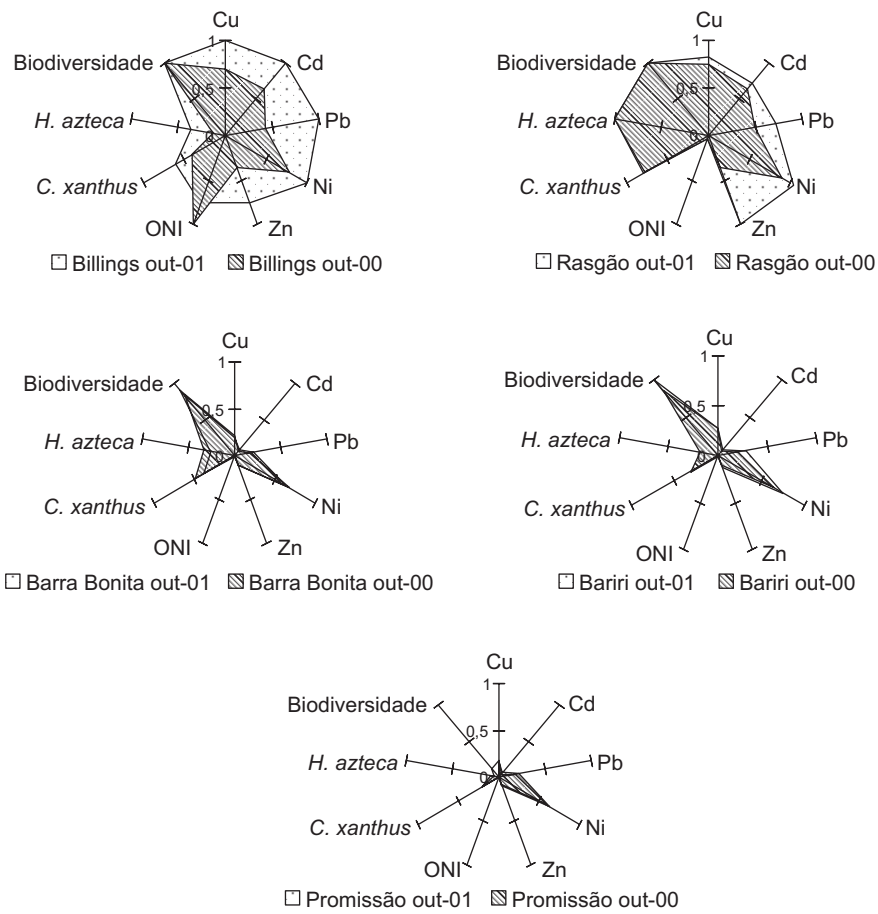
**Tabela 1** — Valores das concentrações de metais totais e de orgânicos não iônicos (ONI) obtidos pelo projeto Qualised para o sedimento dos reservatórios estudados (Qualised, 2002).



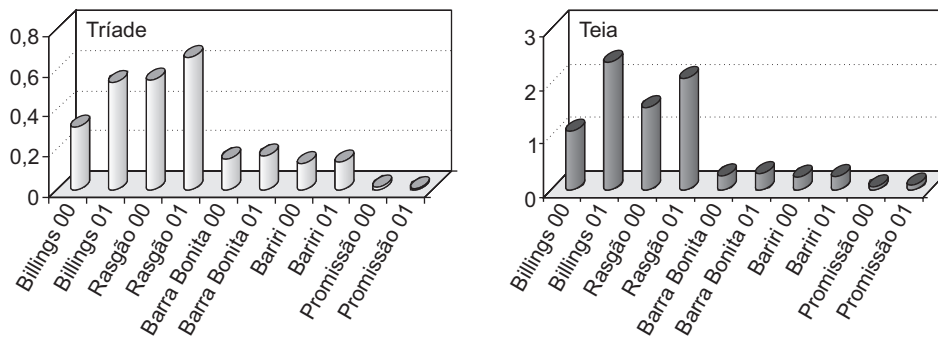
**Figura 1** — Análise comparativa da diversidade biológica, concentração de metais e de xenobióticos em sedimento dos reservatórios do rio Tietê e a mortalidade de *Hyalella azteca* e *Chironomus xanthus* quando expostos aos sedimentos coletados nos reservatórios em outubro de 2000 e 2001. Gráficos da tríade.

**Tabela 2** — Valores de mortalidade em bioensaios para *Chironomus xanthus* e *Hyalella azteca* e índice de diversidade de Shannon calculado para a comunidade de macroinvertebrados bentônicos dos reservatórios estudados (Qualised, 2002).

Qualised	<i>C. xanthus</i> mort. (%)	<i>H. azteca</i> mort. (%)	Comunidade bentônica
Billings out/00	40	12,5	0
Billings out/01	60	36,7	0
Rasgão out/00	77,5	100	0
Rasgão out/01	80	100	0
B. Bonita out/00	37,5	25	0,14
B. Bonita out/01	47,5	33	0,27
Bariri out/00	32,5	17,5	0,24
Bariri out/01	32,5	3,33	0
Promissão out/00	20	5	1,44
Promissão out/01	20	8,3	1,62



**Figura 2** — Análise comparativa da diversidade biológica, concentração de metais e de xenobióticos em sedimento dos reservatórios do rio Tietê e a mortalidade de *Hyalella azteca* e *Chironomus xanthus* quando expostos aos sedimentos coletados nos reservatórios em outubro de 2000 e 2001. Gráficos em “teia”.



**Figura 3** — Área calculada para cada figura gerada pelos gráficos da tríade e “teia” de cada estação amostral em 2000 e 2001.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cálculo da área das figuras formadas nas duas abordagens utilizadas permitiu classificar os sedimentos dos reservatórios quanto ao impacto sofrido. Os reservatórios de Rasgão e Billings apresentaram a pior qualidade de sedimento, seguidos por Barra Bonita e Bariri. Para o reservatório de Promissão não foram encontradas evidências de impactos. Cumpre notar que a distribuição espacial dos sedimentos potencialmente tóxicos acompanha o grau de trofia do rio Tietê (isto é, os ambientes a jusante são menos eutrofizados do que a montante), ou seja, a qualidade dos ecossistemas melhora com a distância da Região Metropolitana de São Paulo, evidenciando que a origem da maioria das substâncias poluidoras é oriunda dessa região.

Os gráficos em “teia” permitiram melhor interpretação dos resultados, uma vez que cada variável avaliada pode ser visualizada individualmente e comparada com o restante dos dados tanto entre os vários reservatórios estudados quanto em um mesmo reservatório ao longo do tempo. O desenho formado por cada ambiente nos gráficos em “teia” também permite fazer inferências acerca da estabilidade dos ambientes estudados, avaliando-se como e quanto o formato da figura difere ao longo do tempo, possibilitando analisar visualmente a influência de cada variável, bem como a identificação de padrões de estabilidade. Os gráficos em teia, como plotados no presente

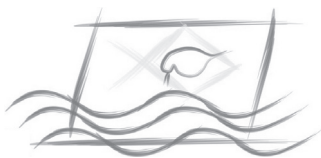
trabalho, dão peso excessivo às variáveis químicas. Todavia, esta não é uma limitação do método, e sim dos dados disponíveis para a análise. A abordagem dos gráficos em teia permite que seja plotado um número virtualmente infinito de eixos, podendo-se contemplar inúmeras outras variáveis, sejam de importância biológica, química ou toxicológica.

O uso combinado de métodos de integração de dados facilita a interpretação dos resultados, pois se baseia no conceito de “peso de evidência”, que é o pilar fundamental da tríade de qualidade de sedimentos.

*Agradecimentos* — FAPESP, pelo apoio financeiro; a todos os integrantes do projeto Qualised, que produziram os dados utilizados no presente trabalho; e em especial ao Professor Mozeto, pelo apoio e cooperação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAPMAN, P. M., 1990, *The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation*. The Science of the Total Environment, 97/98 (1990) 815-825. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- CHAPMAN, P. M., DEXTER, R. N. & LONG, E. R., 1987, Synoptic measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition (the Sediment Quality Triad). San Francisco Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 37: 75-96.
- QUALISED, 2002, *Dados compilados do Relatório Final do Projeto Qualised*. Coord.: A. A. MOZETO, G. V. UMBUZEIRO, W. F. JARDIM.



SETAC – Brazil

## Avaliação das Atividades Tóxicas e Mutagênicas da Água e do Sedimento do Arroio Estância Velha, Região Coureira-calçadista, Utilizando *Allium cepa*

H. MITTEREGGER-JÚNIOR,<sup>1,6\*</sup> J. FERRAZ-DIAS,<sup>2</sup> M. LÚCIA-YONEMA,<sup>3</sup>  
A. ARENZON,<sup>4</sup> J. SILVA<sup>5</sup> & J. A. PEGAS- HENRIQUES<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup>Centro Tecnológico do Couro, Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI), Estância Velha, RS

<sup>2</sup>Laboratório de Implantação Iônica, Instituto de Física da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Geologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, RS

<sup>4</sup>Ecotox – Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),  
Centro de Ecologia, Porto Alegre, RS

<sup>5</sup>Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS

<sup>6</sup>Centro de Biotecnologia, Departamento de Biofísica da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS

### RESUMO

Este trabalho é o resultado das análises da água e do sedimento provenientes de três diferentes pontos do arroio Estância Velha (RS), o qual recebe efluentes originados da indústria coureira-calçadista, desde a nascente até próximo à divisa do município. As coletas foram realizadas durante o inverno e o verão do ano de 2003, utilizando-se análises físico-químicas, microbiológicas e testes de toxicidade e genotoxicidade com *Allium cepa*. Os resultados obtidos revelaram a correlação significativa entre a baixa qualidade do arroio após a nascente e o lançamento de compostos originários de efluentes industriais e de esgoto.

*Palavras-chave:* *Allium cepa*, toxicidade, mutagenicidade, monitoramento ambiental, couro.

### ABSTRACT

#### Evaluation of toxic and genotoxic water and sediment activities in Estância Velha stream – leather and footwear industry region – using *Allium cepa*

This study is the results of analyses of water and sediment from three different points in Estância Velha stream (RS), which receives effluents from the leather and footwear industry, between the source and the municipal boundary. The samplings were performed during winter and summer 2003 using physicochemical and microbiological analyses and toxicity and mutagenicity tests with *Allium cepa*. The results obtained showed a significant correlation between low quality in the stream below the source and the discharge of compounds from industrial effluents and sewage.

*Key words:* *Allium cepa*, toxicity, genotoxicity, environmental monitoring, leather.

### INTRODUÇÃO

O Arroio Estância Velha tem origem no município de mesmo nome, correspondendo a um trecho de 8 km e recebendo diretamente em suas águas o efluente de indústrias pertencentes ao setor coureiro (indústrias químicas, curtumes e beneficiamento de couros) e calçadista.

O setor coureiro é considerado por especialistas como um dos dez ramos industriais que mais prejuízos causam ao meio ambiente, sendo responsável por grande consumo de recursos hídricos e por gerar substâncias que deterioram o mesmo.

Apesar da geração de material graxo, detergentes e outras substâncias dissolvidas, o cromo parece ser o contaminante

\*Corresponding author: Horst Mitteregger Júnior, e-mail: hjunior.couro@senairs.org.br.

mais prejudicial, possuindo características tóxicas e causando no meio ambiente a mortalidade de seres vivos, desde peixes até microrganismos. A forma hexavalente do cromo é dez vezes mais tóxica que a trivalente, tendo efeito de toxicidade crônica associado a certos tipos de câncer.

Estudos comparativos entre os efeitos do cromo trivalente (III) e hexavalente (VI) têm demonstrado que o cromo III apresenta baixa toxicidade, enquanto o cromo VI é um oxidante forte: embora não cause danos diretos no tecido, é considerado um agente mutagênico, carcinogênico e teratogênico. O cromo VI é um composto de fácil penetração na membrana celular em forma de ânion cromato, o que não ocorre com o cromo III, o qual é inerte e tem sua penetração dificultada (Dartsch *et al.*, 1998). O cromo VI no meio intracelular forma, pela ação do sistema redox-ativo (por exemplo, glutatona), espécies reativas ao oxigênio (ERO), provocando um desequilíbrio no estado redox celular, conhecido como estresse oxidativo, o qual leva a lesões no DNA.

A utilização de *A. cepa* tem sido descrita na avaliação do potencial citotóxico de efluentes industriais, como os originários de curtumes, determinando-se a diminuição do índice mitótico e a formação de aberrações cromossômicas. O teste é fácil de ser realizado, sendo utilizado rotineiramente em todo o mundo em laboratórios que trabalham com testes de genética toxicológica, considerado uma ferramenta valiosa quanto à determinação da contaminação ambiental, havendo extenso banco de dados de substâncias químicas já testadas (Fiskesjö, 1993).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Amostragem*

Foram coletadas amostras da água e do sedimento durante as estações do verão e inverno do ano de 2003 em três diferentes pontos, identificados como: “Nascente”, localizada na nascente do arroio, na região nordeste do município; “B. Rosas”, próximo ao centro da cidade, distante 4 km da nascente, situada no Bairro das Rosas; e “Final”, localizado no final do arroio, próximo ao limite do município. Todos os pontos analisados recebem esgoto doméstico e, após a Nascente, efluentes industriais provenientes das indústrias coureira, calçadista e química da região.

As amostras de água foram coletadas no centro de cada um dos pontos, sendo acondicionadas em recipientes próprios para cada análise físico-química e um volume de aproximadamente sete litros para os testes com *A. cepa*. A amostragem do sedimento foi realizada nos mesmos locais, sendo coletado volume aproximado de 2 kg por ponto e acondicionado em sacos plásticos. A preservação e a amostragem seguiram a norma ABNT NBR 9898, “Preservação e Técnicas de Amostragem de Efluentes Líquidos e Corpos Receptores”.

### *Análises físicas, químicas e microbiológicas*

Para o planejamento das determinações físico-químicas e microbiológicas da água foi utilizada a norma ABNT NBR 9897, “Planejamento de Amostragem de Efluentes Líquidos e Corpos Receptores”, relativos à indústria coureira, sendo determinados os índices de oxigênio dissolvido (OD), óleos e graxas, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio, fenóis (DQO), bactérias termotolerantes, cromo total, temperatura, pH, nitrogênio total e sólidos totais.

Em razão da característica do ambiente foi determinada a concentração de cromo no sedimento pela técnica PIXE (Johansson *et al.*, 1995), que consiste na irradiação de amostras com feixes de íons. Esses experimentos foram realizados no Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para a realização desse procedimento as amostras de sedimento foram primeiramente secas à temperatura de 80°C e, após, maceradas de maneira a possibilitar a montagem de pastilhas utilizadas na análise.

### *Análises de toxicidade e mutagenicidade*

Os testes com *A. cepa* foram montados sem diluição, tendo como controle positivo o sulfato de cobre para a água, em conjunto com a vermiculita, empregada como controle positivo para a análise do sedimento. Para ambas as amostras (sedimento e água) foi utilizada água proveniente de fonte natural, como controle negativo, e esta associada à vermiculita como padrão para o sedimento.

De acordo com o método sugerido por Fiskesjö (1993), foram removidos os bulbos de cebolas saudáveis e que não tiveram contato com defensivos químicos, sendo a seguir secos e colocados em séries de dez (10), por ponto analisado, em frascos contendo a solução-teste, os quais foram renovados diariamente e mantidos à temperatura de 20°C. No segundo dia, foram coletadas raízes de tamanho máximo de 2 mm para análise cromossômica, sendo o material fixado em Carnoy por no mínimo três horas e depois fixado em álcool 70% em refrigeração. Após a fixação, foram realizados os preparos histológicos, utilizando o corante de Feulgen para a coloração dos meristemas e a seguir procedendo-se ao “squash” com ácido acético e posterior fixação e coloração com Fast-Green.

A análise mutagênica constou da determinação do índice mitótico (IM), anomalias no ciclo mitótico e a presença de micronúcleos em 3000 células. O IM foi definido como o número de mitoses em 1000 células contadas, sendo analisada a presença de metáfases, anáfases e telófases. A avaliação da toxicidade foi realizada pela medição do comprimento das raízes médias. Para este procedimento, após a coleta das raízes, os bulbos foram mantidos nas soluções em presença de luz à temperatura de 20°C por 4-5 dias, sendo determinado o RC 50% (efeito em 50% no crescimento das raízes em comparação ao controle normal).

Os resultados obtidos nos testes com *A. cepa* foram analisados empregando-se o cálculo da média do comprimento das raízes e o desvio-padrão para cada um dos pontos, sendo considerados a taxa de crescimento das raízes, o índice mitótico e a presença de micronúcleos. A correlação de significância entre as diferentes amostras foi determinada pela análise de variância (ANOVA) teste de Tukey's, programa Graphpad Prism versão 3.0.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos apresentados nas Tabelas 1 e 2 mostram menor índice de crescimento das raízes de *A. cepa* (IC) nos pontos localizados a partir da Nascente do arroio tanto no inverno quanto no verão, obtendo-se resultados significativos na água e no sedimento do B. Rosas e Final do arroio, este apenas no inverno. Com exceção das amostras de água coletadas na Nascente e no B. Rosas durante o inverno, todas as demais apresentaram significância em relação ao controle negativo.

As determinações físicas e químicas apresentadas na Tabela 3 indicam que, em relação à Nascente, observa-se na água aumento dos valores de DBO, DQO, óleos e graxas,

coliformes fecais e nitrogênio total, tanto no verão quanto no inverno. Estes resultados revelam grande contaminação resultante do despejo de matéria orgânica, provavelmente originada do processamento da pele e também associada a despejos de origem doméstica.

A análise das amostras de sedimento revelam que, em relação à Nascente, ocorreu aumento dos índices de cromo, tanto no inverno como no verão, destacando-se as altas concentrações encontradas nas amostras coletadas no Final do arroio (Tabela 4).

Avaliando-se o crescimento das raízes das amostras de água e sedimento em relação ao controle negativo (%RC), percebe-se maior toxicidade no verão e inverno após a Nascente (Tabelas 1 e 2), o qual também foi evidenciado na determinação do índice mitótico (IM) encontrado no Final do arroio nas amostras de sedimento.

A mutação cromossômica, determinada pela presença de micronúcleos, não revelou resultados significativos nas amostras de água e sedimento coletadas nas duas estações analisadas, entretanto, pode-se perceber aumento no número de micronúcleos na amostra coletada no B. Rosas durante o inverno e Final do arroio no verão (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 — Resultados obtidos com *Allium cepa* na água.

Pontos de coleta	Verão				Inverno			
	IM	MC	IC	RC	IM	MC	IC	RC
Nascente	1,84 ± 0,4	1,7 ± 0,5	1,43 ± 0,4 <sup>a</sup>	47	1,81 ± 0,6	0,7 ± 1,0	2,6 ± 1,0	87
B. Rosas	1,34 ± 0,8	2,2 ± 1,0	0,2 ± 0,1 <sup>a,d</sup>	7	1,73 ± 0,4	2,3 ± 2,6	1,33 ± 0,5 <sup>d</sup>	45
Final	2,0 ± 0,7 <sup>c</sup>	1,7 ± 1,0	1,15 ± 0,4 <sup>a</sup>	38	1,5 ± 0,7	0,4 ± 1,0	0,57 ± 0,2 <sup>a,d</sup>	19
C- Água	1,5 ± 0,3	0	3,04 ± 0,3	100	1,3 ± 0,6	0,0	2,98 ± 1,0	100
C+ Água	0,87 ± 0,3 <sup>b</sup>	2,6 ± 1,0	0,71 ± 0,5 <sup>a</sup>	23	0,37 ± 0,3	7,4 ± 3,5 <sup>a</sup>	1,64 ± 0,4 <sup>a</sup>	55

IM: índice mitótico; MC: micronúcleos; IC: índice crescimento (cm); RC: crescimento em relação à média (%); <sup>a</sup>p < 0,001 em relação ao C-; <sup>b</sup>p < 0,01 em relação ao C-; <sup>c</sup>p < 0,05 em relação ao C-; <sup>d</sup>p < 0,001 em relação ao P1.

Tabela 2 — Resultados obtidos com *Allium cepa* no sedimento.

Pontos de coleta	Verão				Inverno			
	IM	MC	IC	% RC	IM	MC	IC	% RC
Nascente	1 ± 0,4	0,3 ± 0,5	0,96 ± 0,3 <sup>a</sup>	29	1,43 ± 0,4	0,0	2,21 ± 0,7 <sup>a</sup>	63
B. Rosas	1,3 ± 0,7	1,6 ± 0,4	0,49 ± 0,4 <sup>a,d</sup>	15	1,14 ± 0,5	0,3 ± 0,1	1,15 ± 0,4 <sup>a,c</sup>	33
Final	2,3 ± 0,9 <sup>b,e</sup>	1,2 ± 1,0	0,52 ± 0,4 <sup>a</sup>	15	0,7 ± 0,5 <sup>d</sup>	0,4 ± 0,7	0,21 ± 0,1 <sup>a,c</sup>	6
C- Vermiculita	2,85 ± 1	0,00	3,36 ± 1,0	100	2,52 ± 1,0	0,0	3,52 ± 1,0	100
C+Vermiculita	1,25 ± 0,7	4,3 ± 1,5 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,8 <sup>a</sup>	62	1,2 ± 0,7	6,4 ± 2,8 <sup>a</sup>	1,16 ± 0,3 <sup>a</sup>	33

IM: índice mitótico; MC: micronúcleos; IC: índice crescimento (cm); RC: crescimento em relação à média (%); <sup>a</sup>p < 0,001 em relação ao C- sedimento; <sup>b</sup>p < 0,05 em relação ao C- sedimento; <sup>c</sup>p < 0,001 em relação ao P1; <sup>d</sup>p < 0,05 em relação ao P1; <sup>e</sup>p < 0,01 em relação ao P1.

## DISCUSSÃO

A comparação dos resultados obtidos em relação ao índice de crescimento das raízes (RC) de *A. cepa* e os resultados físico-químicos da água e no sedimento revelaram acentuada piora da qualidade do arroio à medida que este recebe contribuições provenientes de resíduos industriais e domésticos até a formação do arroio Portão, limite geográfico do município.

Estas análises indicam que na água há maior quantidade de cromo a partir da Nascente, comprovando o lançamento de efluentes provenientes das indústrias da região, no qual o cromo encontra-se acima do limite máximo de 0,5 mg/L permitido pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM) quanto ao lançamento de efluentes líquidos em corpos de água. Ainda segundo o CONAMA 020/1986, de acordo com a Classe 3, os resultados apresentam-se fora dos limites permitidos para óleos e graxas (necessariamente ausentes), DBO<sub>5</sub> (até 10 mg/L) e bactérias termotolerantes (até  $4 \times 10^3$  NPMorg/100 ml).

Os baixos índices de crescimento das raízes evidenciam o efeito da toxicidade após a Nascente, tanto na água quanto no sedimento, como demonstrado pela correlação encontrada entre os diferentes pontos ( $p < 0,001$ ), destacando-se os resultados encontrados nas amostras de água do B. Rosas coletadas no verão e do Final, no inverno, os quais apresentaram os maiores índices de DQO, DBO, sólidos suspensos totais, nitrogênio total, óleos e graxas, cromo total e fenóis.

A presença de cromo no sedimento a partir da Nascente pode estar associada ao pH mais elevado da água nesses pontos, o qual na faixa de 8,0 a 8,5 forma hidróxido de cromo III (Cr(OH)<sub>3</sub>), sendo precipitado e acumulado no sistema (Class & Maia, 1994).

A análise da água apresentou diferenças entre as estações de verão e inverno, em que os piores índices foram identificados

no verão, possivelmente devido à menor vazão do arroio provocada pela estiagem, quando os arroios drenantes apresentam vazões de base, isto é, provenientes apenas da contribuição do lençol freático, coincidindo com o retorno das empresas à sua produção normal após o período de férias.

A inexistência de atividade mutagênica significativa na água e no sedimento em ambas as estações do ano também pode ser justificada pela ausência de mercúrio e cromo hexavalente na água, analisados no verão de 2004, portanto, sugere-se que o cromo presente na água está na forma de Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (trivalente), destacando-se o sulfato monobásico de cromo lançado pelos curtumes após o tratamento.

Admite-se que o pH próximo a 7,0 determinado em todas as amostras de água pode ter diminuído a toxicidade do cromo III, devendo-se observar que em pH próximo ao neutro a toxidez da água é baixa, ocorrendo inibição da atividade biológica a partir de uma concentração de 500-1000 mg, a qual aumenta em função da acidez do meio. O cromo VI apresenta inibição da atividade biológica em um sistema aquático na faixa de 250-500 mg/L (Cabridenc, 1983).

É importante considerar que o processo de transformação de cromo hexavalente (sem características curtentes) até cromo trivalente (com características curtentes) é conduzido até a sua completa redução, e que o cromo trivalente, presente em resíduos e aparas de couros curtidos, não é oxidado a cromo hexavalente, mesmo quando exposto a condições naturais como ao sol e à chuva.

Além dos despejos industriais, caracterizados principalmente por carga orgânica, sólidos, óleos e graxas, cromo, sódio, sulfetos, sulfatos, cloretos, nitrogênio e outros metais, esse arroio recebe em suas águas cargas poluidoras provenientes de esgotos domésticos do município, sem tratamento, o qual tem sido relatado como fonte geradora de efeito tóxico e mutagênico ao ambiente (White & Rasmussen, 1997).

Tabela 3 — Resultados das análises físico-químicas da água.

Pontos de coleta	Nascente
<b>Análises/Estação</b>	
1 – DQO (mgO <sub>2</sub> /L)	8
2 – DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> /L)	8
3 – pH	6,8
4 – Sól. susp. totais (mg/L)	5,74
5 – Nitrogênio total (mg/L)	1,98
6 – Óleos e graxas (mg/L)	2,76
7 – Cromo total (mg/L)	< 0,01
8 – Temperatura (°C)	20
9 – Fenóis (mg/L)	0,02
10 – OD (mg/L)	6
11 – B.T (NPMorg/100 ml) <sup>a</sup>	$2,4 \times 10^2$

<sup>a</sup>Bactérias termotolerantes.

Tabela 4 — Resultados da análise do sedimento.

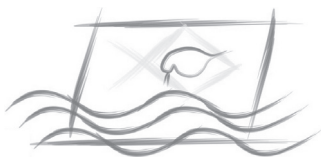
Pontos de coleta Análises/Estação	Nascente	B. Rosas	Final	Nascente	B. Rosas	Final
	Verão			Inverno		
Cromo (ppm)	54 ± 20	ND*	396 ± 67	69 ± 24	621 ± 102	10102 ± 1313
pH	6,5	7,5	7,5	7	7,5	7

\*Não determinado.

*Agradecimentos* — Centro Tecnológico do Couro – SENAI, Prefeitura de Estância Velha, Departamento de Genética e Física – UFRGS, Centro de Ecologia – UFRGS, Genotox e Centro de Biotecnologia – UFRGS.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1987, *NBR 9897: Planejamento de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores*. Rio de Janeiro.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1987, *NBR 9898: Preservação e técnicas de amostragem de fluentes líquidos e corpos receptores*. Rio de Janeiro.
- CABRIDENC, R., 1983, Efluentes de curtumes: constatação e previsão de seu impacto sobre o meio ambiente e aspectos de regulamentação. *Tecnicouro*, 5: 20-28.
- CLASS, I. C. & MAIA, R. A., 1994, *Manual básico de resíduos de curtume*. SENAI/RS, Porto Alegre, 664p.
- CONAMA, 1988, Resolução n. 20 de 1986. In: Conselho Nacional do Meio Ambiente. *Resoluções do CONAMA*. 2. ed. SEMA, Brasília, DF, 98p.
- DARTSCH, P. C., KIMMEL, R. & SCHMAL, F. W., 1998, Nephrotoxic and hepatotoxic effect of a chromium (VI) compound in comparison to a basic chromium (III) tanning agent, *Word Leather. Liverpool*, 3: 66-70.
- FISKESJO, G., 1993, The *Allium* test – a potential standard for the assessment of environmental toxicity. In: J. W. Gorsuch (ed.), ASTM (American Society of testing Materials) special technical publication 1216. *Environ. Toxicol. Risk Assessment.*, pp. 331-345.
- JOHANSSON, S. A. E., CAMPBELL, J. L. & MALMQVIST, K. G., 1995, *Particle-Induced X-Ray Emission Spectrometry (PIXE)*. John Wiley & Sons, Inc.
- WHITE, P. A. & RASMUSSEN, J. B., 1998, The genotoxic hazards of domestic wasres in surface waters. *Mutat. Res.*, 460: 223-236.



SETAC – Brazil

## Avaliação da Toxicidade de Amostras de Águas Superficiais Preservadas de Diferentes Formas: Refrigeração e Congelamento

M. A. ARAGÃO\* & E. BERTOLETTI

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – Setor de Ecotoxicologia Aquática (EAHE),  
Avenida Prof. Frederico Hermann Jr., 345, Alto de Pinheiros, CEP 05459-900, São Paulo, SP

### RESUMO

Os procedimentos corretos de coleta, preservação e estocagem de amostras a serem analisadas garantem a confiabilidade dos resultados obtidos em ensaios ecotoxicológicos. Para a realização desses ensaios, normas técnicas recentes recomendam a preservação das amostras sob refrigeração (a curto prazo) ou sob congelamento (a longo prazo). O objetivo deste trabalho foi comparar os resultados de testes de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, utilizando-se, para a renovação das soluções-teste, duas formas diferentes de preservação das amostras: a refrigeração (temperatura entre 2 e 5°C) e o congelamento em alíquotas (temperatura entre -3 e -25°C). Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferenças significativas na toxicidade para *C. dubia* utilizando-se, para a renovação das soluções-teste, as amostras mantidas sob refrigeração ou congeladas em alíquotas.

**Palavras-chave:** toxicidade crônica, *Ceriodaphnia dubia*, preservação de amostras, congelamento, refrigeração.

### ABSTRACT

#### Toxicity evaluation of surface water samples preserved in different ways: refrigeration and freezing

The correct proceedings for sample collection, preservation and storage regarding toxicity tests with aquatic organisms, will guarantee the reliability of results of these tests. Recently, some standard procedures advise that samples should be preserved by refrigeration (for a short time) or by freezing (for a long time). The aim of this study was to compare the results of chronic toxicity tests with *Ceriodaphnia dubia* using, to the renewal of test solutions, samples with two different ways of preservation: refrigeration (temperature at 2 to 5°C) and freezing in aliquots (temperature at -3 to -25°C). Tests results indicated that there was no significant differences on toxicity to *C. dubia*, between samples refrigerated or frozen.

**Key words:** chronic toxicity, *Ceriodaphnia dubia*, sample preservation, freezing, refrigeration.

### INTRODUÇÃO

Em ensaios de toxicidade com organismos aquáticos os procedimentos corretos de coleta, preservação e estocagem das amostras a serem analisadas constituem fatores de grande importância, que garantem a confiabilidade dos resultados obtidos nesses ensaios.

A preservação completa de amostras, independente de sua natureza (efluentes doméstico e industrial ou águas superficiais), é quase impossível de atingir na prática, de modo a garantir a estabilidade de todos os seus constituintes. Na melhor das hipóteses, as técnicas de preservação e estocagem

podem somente retardar as mudanças biológicas e químicas que ocorrem na amostra após sua coleta da fonte original (USEPA, 1982).

Os métodos de preservação são geralmente a adição de compostos químicos, controle de pH, refrigeração e congelamento. Habitualmente utiliza-se a combinação de alguns desses métodos para a preservação das amostras (USEPA, 1982). Para a realização de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos, algumas normas (ISO-10706, 2000; ABNT NBR-12713, 2004) recomendam a preservação das amostras sob refrigeração (a curto prazo) e sob congelamento (a longo prazo).

\*Corresponding author: Márcia Aparecida Aragão, e-mail: marciaaaa@cetesbnet.sp.gov.br.

A variação na toxicidade das amostras após a sua coleta pode estar relacionada aos seguintes fenômenos fotoquímicos e/ou biológicos, como citado por Lenore *et al.* (1989) apud Naudin *et al.* (1995):

- adsorção de certos compostos orgânicos nas paredes dos recipientes de coleta;
- precipitação de certos compostos devido ao pH, temperatura e mudanças no potencial redox;
- volatilização;
- biodegradação pelos microrganismos presentes nas amostras.

Essas mudanças na toxicidade podem ser mais críticas quando se conduzem testes de toxicidade crônica, que podem durar até 30 dias (Naudin *et al.*, 1995).

Por isso, outros métodos (USEPA, 2002; Environment Canada, 1992) recomendam que, em testes de toxicidade crônica, semi-estáticos, com *Ceriodaphnia dubia*, as amostras (de efluentes ou de águas superficiais) sejam coletadas no primeiro, terceiro e quinto dias de teste para a renovação das soluções-teste, sendo que as amostras são mantidas sob refrigeração durante esse período.

No caso de Programas de Monitoramento de Águas Superficiais, como o realizado na CETESB, onde cerca de 130 pontos são amostrados bimestralmente em todo o Estado de São Paulo, a coleta a cada dois dias torna-se inviável, devido aos custos e à disponibilidade de tempo e de pessoal para a realização das mesmas. Assim, desde a implantação do ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* na CETESB, o procedimento utilizado para a preservação das amostras de águas superficiais é a refrigeração durante o período de duração do teste, sendo que para a renovação das soluções-teste é utilizada a mesma amostra desde o dia inicial do ensaio

(CETESB, 1991). O presente trabalho tem por objetivo comparar os resultados dos ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, utilizando-se amostras de água superficial, preservadas de duas formas diferentes: a refrigeração durante todo o período do ensaio e o congelamento de alíquotas da amostra para a renovação das soluções-teste, sendo este último o procedimento recomendado na nova versão da norma ABNT NBR-13373 (2005) para o ensaio de toxicidade crônica com *C. dubia*.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas nos experimentos foram de água superficial proveniente de sete pontos de amostragem da Rede de Monitoramento de Águas Interiores da CETESB, sendo que cada amostra foi recoletada a cada dois meses e testada novamente por três vezes para a maioria dos pontos. Os pontos selecionados e sua descrição constam na Tabela 1.

As amostras coletadas foram divididas e testadas em paralelo, utilizando-se dois tratamentos diferentes de preservação para a renovação das soluções-teste:

- Refrigeração (temperatura média com variação entre 2 e 5°C): a amostra coletada foi armazenada em geladeira, sendo utilizada nos dias de renovação das soluções-teste.
- Congelamento em alíquotas (temperatura média com variação entre -3 e -25°C): a amostra coletada foi subdividida em alíquotas de 200 ml, as quais foram armazenadas em freezer, sendo descongeladas somente nos dias de renovação das soluções-teste. Para o descongelamento, os frascos contendo as alíquotas foram deixados em recipiente com água à temperatura ambiente até seu total descongelamento.

**Tabela 1** — Pontos selecionados para o experimento e sua respectiva descrição.

Código do ponto	Descrição
SOIT 02900	Reservatório Itupararanga, próximo à barragem, na estrada que liga Ibiúna a Votorantim.
SOIT 02100	Reservatório Itupararanga, no meio do corpo central, em frente à Praia do Escritório.
JNDI 00500	Rio Jundiaí, no canal de interligação com o Reservatório Taiacupeba.
PEBA 00100	Reservatório Taiacupeba, no início do braço do Taiacupeba-Mirim.
PEBA 00900	Reservatório Taiacupeba, na captação da SABESP.
TIET 02700	Rio Tietê, ponte na rodovia BR-153, no trecho que liga Lins a José Bonifácio.
TITR 02100	Reservatório de Três Irmãos, ponte na rodovia SP-463, no trecho que liga Araçatuba a Jales.

O método utilizado para a realização dos ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* foi o descrito na norma ABNT NBR 13373 (2005). Para a análise dos resultados qualitativos dos ensaios utilizou-se o teste-t por Bioequivalência ( $r = 0,72$ ), que consta no programa estatístico TOXSTAT 3.5 (Gulley, 1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos, quanto à toxicidade das amostras e às médias de reprodução obtidas (número médio de jovens/adulta ao final do período de teste), constam na Tabela 2.

Pelos dados apresentados na Tabela 2, verifica-se que, em todos os ensaios realizados, as médias de reprodução foram muito semelhantes, sendo que os efeitos tóxicos foram iguais para as amostras mantidas sob as duas formas diferentes de preservação.

Portanto, verifica-se que não houve diferenças significativas entre os resultados dos ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* utilizando, para a renovação das

soluções-teste, a amostra preservada sob refrigeração ou congelada em alíquotas.

Embora normas técnicas recentes, como, por exemplo, a ISO-10706 (2000), referente ao ensaio de toxicidade crônica com *Daphnia magna*, recomendem o congelamento da amostra em alíquotas para a renovação das soluções-teste, ou por até dois meses caso o ensaio não se inicie em até 48 horas, esta técnica de preservação tem sido discutida por alguns autores.

A USEPA (1982), descrevendo sobre técnicas de preservação de amostras, considera os seguintes aspectos. O congelamento seria um método capaz de aumentar o tempo de conservação de uma única amostra, a qual poderia ser utilizada em várias análises, contudo, os componentes de resíduos sólidos (filtráveis e não filtráveis) da amostra se alteram com o congelamento e descongelamento. Por isso, este método pode ser bom para algumas análises, mas não é indicado como um método geral de preservação de amostras. Já a refrigeração é um método comumente utilizado em trabalhos de campo e não altera a composição da amostra. Embora ela não mantenha a integridade da amostra para todos os parâmetros, também não interfere em nenhum método analítico.

**Tabela 2** — Resultados dos ensaios com *Ceriodaphnia dubia*, com diferentes formas de preservação da amostra a ser utilizada na renovação das soluções-teste.

Data de início do teste	Código do ponto	Efeito detectado nas amostras	
		Refrigeradas	Congeladas
16/1/2004	SOIT 02900	crônico (10,7)*	crônico (9,5)
24/3/2004	SOIT 02900	não tóxico (13,2)	não tóxico (18,1)
5/5/2004	SOIT 02900	não tóxico (28,7)	não tóxico (31,0)
16/1/2004	SOIT 02100	crônico (4,0)	crônico (5,7)
24/3/2004	SOIT 02100	não tóxico (25,6)	não tóxico (24,2)
5/5/2004	SOIT 02100	não tóxico (31,3)	não tóxico (28,3)
21/1/2004	JNDI 00500	não tóxico (31,6)	não tóxico (32,3)
10/3/2004	JNDI 00500	não tóxico (24,4)	não tóxico (21,2)
20/5/2004	JNDI 00500	não tóxico (24,3)	não tóxico (30,3)
21/1/2004	PEBA 00900	não tóxico (29,8)	não tóxico (30,5)
10/3/2004	PEBA 00900	crônico (16,4)	crônico (15,1)
21/5/2004	PEBA 00900	não tóxico (25,0)	não tóxico (20,8)
21/1/2004	PEBA 00100	não tóxico (36,4)	não tóxico (35,6)
10/3/2004	PEBA 00100	crônico (13,7)	crônico (10,1)
21/5/2004	PEBA 00100	não tóxico (37,3)	não tóxico (33,3)
11/2/2004	TITR 02100	crônico (10,9)	crônico (16,1)
16/6/2004	TITR 02100	crônico (15,8)	crônico (17,3)
11/2/2004	TIET 02700	crônico (9,6)	crônico (14,2)
16/6/2004	TIET 02700	não tóxico (19,5)	não tóxico (23,4)

(\* ) = média de reprodução (número médio de jovens/adulta ao final do período de teste).

Além disso, Schuytema *et al.* (1989) compararam a toxicidade de dois sedimentos contaminados com DDT e endrin, estocados sob refrigeração (4°C) e congelados (-20°C), utilizando testes de toxicidade com *Hyalella azteca* com duração de 10 dias. Os autores verificaram que a toxicidade de ambos os sedimentos foi reduzida quando eles foram congelados por 14 dias em relação à toxicidade dos sedimentos mantidos sob refrigeração, embora a diferença entre os resultados tenha sido pouco expressiva (isto é, um fator ao redor de 2). Os valores de CL50 para o DDT dos sedimentos estocados sob refrigeração e sob congelamento foram, respectivamente, 4,2 e 7,3 µg/g DDT, para o sedimento com 3% de carbono orgânico total; e 11,1 e 23,2 µg/g DDT, para o sedimento com 11% de carbono orgânico total. O mesmo comportamento foi observado para o endrin. Os autores concluíram que a redução da toxicidade pode estar relacionada à liberação do carbono orgânico solúvel durante o congelamento e descongelamento da amostra.

Os resultados obtidos no presente trabalho, utilizando-se amostras de águas superficiais, são semelhantes aos de Naudin *et al.* (1995). Esses autores realizaram ensaios de toxicidade crônica com dois efluentes líquidos, utilizando *Danio rerio* (sobrevivência embriolarval), *Ceriodaphnia dubia* (reprodução) e *Selenastrum capricornutum* (reprodução), para avaliar a eficiência de diferentes técnicas de preservação das amostras, como refrigeração e congelamento. As amostras testadas foram mantidas sob duas formas de estocagem: refrigeração (4 ± 1°C) e congelamento (freezer, com temperatura de -26 ± 3°C).

Os resultados obtidos para *Danio rerio*, expressos em CI50;11 dias, mostraram toxicidade similar para a amostra refrigerada ou congelada. Utilizando o efluente 1, as CI50;11 d para as amostras refrigerada e congelada foram, respectivamente, 10% e 7,6%, enquanto para o efluente 2 os valores de CI50;11 d foram, respectivamente, 56,9% e 64,1%

Da mesma forma, para *Ceriodaphnia dubia*, os resultados obtidos nos ensaios com as amostras preservadas sob as duas diferentes formas foram semelhantes. Para o efluente 1, os valores de CI50;7 d para a amostra refrigerada e congelada foram, respectivamente, 2,9% e 3,9%, enquanto para o efluente 2 os valores de CI50;7 d foram de 20,3% e 25,9%.

Nos testes com *Selenastrum capricornutum*, o mesmo efeito foi verificado, a fitotoxicidade foi similar para os dois efluentes testados com amostras refrigeradas ou congeladas. Os valores de CI50;7 d do efluente 1 para amostra refrigerada e congelada foram, respectivamente, 7,1% e 9,1%, enquanto as CI50;7 d do efluente 2 foram de 7,3% e 9,5%, respectivamente.

Os autores concluíram que nos diferentes ensaios a refrigeração e o congelamento das amostras mantiveram de forma similar as propriedades tóxicas desses efluentes.

Em outro estudo similar, Larbaigt & Bonnefille (1988) apud Naudin *et al.* (1995) compararam as vantagens de refrigeração ou congelamento para a preservação das

propriedades tóxicas de nove amostras de efluentes industriais. A toxicidade após 0, 8 e 15 dias de estocagem foi determinada utilizando-se o teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*. Os resultados indicaram que nenhuma conclusão genérica pode ser obtida e que seria necessária avaliação específica em cada caso, contudo, observaram que não houve nenhuma diferença significativa entre os dois modos de preservação em termos de mudanças na toxicidade das amostras testadas.

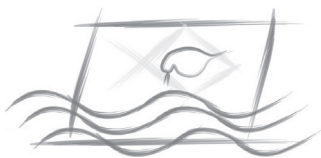
Logo, verifica-se que, em ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, a preservação de amostras de águas superficiais e de efluentes sob refrigeração ou congeladas em alíquotas, para serem utilizadas nas renovações das soluções-teste, apresenta a mesma eficiência na preservação da toxicidade das amostras.

Assim, com base nos dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que, para a renovação das soluções-teste nos ensaios de toxicidade crônica com águas superficiais utilizando-se *Ceriodaphnia dubia*, a preservação da amostra sob refrigeração (2 a 6°C) durante o período do ensaio produz resultados semelhantes àqueles das amostras congeladas. Portanto, a refrigeração das amostras pode continuar a ser utilizada sem causar desvios nos resultados obtidos.

*Agradecimentos* — Ao técnico de laboratório Ivo Freitas de Oliveira pelo preparo e congelamento das amostras utilizadas nos experimentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

- ABNT, 2005, NBR 13373, Assoc. Bras. de Normas Técnicas – *Ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica – método de ensaio com Ceriodaphnia spp.* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 15p.
- ABNT, 2004, NBR 12713, Assoc. Bras. de Normas Técnicas – *Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com Daphnia spp.* (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 21p.
- CETESB, 1991, *Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos*. Vol. I. Testes crônicos com *Ceriodaphnia*. São Paulo. 28p. + anexos.
- ENVIRONMENT CANADA, 1992, *Biological test method: test of reproduction and survival using the cladoceran Ceriodaphnia dubia*. EPS – Report EPS 1/RM/21. 72p.
- GULLEY, D., 1996, *Toxstat 3.5*, West Inc. University of Wyoming. Cheyenne, Wyoming.
- ISO 10706, 2000, *Water quality – Determination of long term toxicity of substances to Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)*. 17p.
- NAUDIN, S., GARRIC, J., VINDIMIAN, E., BRAY, M., MIGEON, B., VOLLAT, B. & LENON, G., 1995, Influence of the sample preservation mode to assess the chronic toxicity of an industrial effluent. *Ecotoxicol. and Environ. Safety*, 30: 54-62.
- SCHUYTEMA, G. S., NEBEKER, A. V., GRIFFIS, W. L. & MILLER, C. E., 1989, Effects of freezing on toxicity of sediments contaminated with DDT and endrin. *Environ. Toxicol. and Chemistry*, 8: 883-891.
- USEPA., 1982, *Handbook for sampling and sample preservation of water and wastewater*. EPA-600/4-82-029. Cincinnati, Ohio, 402p.
- USEPA, 2002, *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. EPA- 821-R-02-013. Washington, D.C., 335p.



SETAC – Brazil

## Avaliação de Metais Pesados na Baía de Paranaguá, PR, Brasil, sob Influência das Atividades Antrópicas

D. M. SANTOS,\* J. A. T. BOSSINI, K. H. PREUSSLER, E. C. VASCONSELOS,  
F. S. CARVALHO-NETO & M. A. S. CARVALHO-FILHO

Centro Universitário Positivo – UnicenP, Rua Prof. Pedro Viriato Parigot de Souza, 5300,  
CEP 81280-330, Campo Comprido, Curitiba, PR

### RESUMO

O estudo de metais pesados na coluna d'água é fundamental, pois pode contribuir de forma significativa para compreender a poluição de sistemas aquáticos, reafirmando-os como perigosos contaminantes tanto em escala local como global, por levarem stress às comunidades aquáticas e estarem associados a efeitos crônicos à saúde humana. Este trabalho teve por objetivo analisar os metais pesados presentes na água da Baía de Paranaguá. As amostras foram coletadas aleatoriamente em torno da Baía, totalizando dez amostras. Foi realizada a abertura das amostras, utilizando  $\text{HNO}_3$ . Em cada amostra foram determinadas as concentrações de Ni, Fe, Se, Zn, Pb e Cu pelo método de espectrofotometria de absorção atômica. De todos os elementos analisados no presente estudo, apenas para o Se foram detectadas concentrações elevadas, acima do limite adotado pelo CONAMA 20/86, o que demonstra a necessidade de monitoramento desse elemento no meio ambiente e em suas fontes poluidoras.

*Palavras-chave:* Baía de Paranaguá, selênio, análise de água.

### ABSTRACT

#### Assessment of the heavy metals in Paranaguá Bay, PR, Brazil, influenced by antropic activities

The study of heavy metals in the water column is fundamental, therefore it can contribute in a significant way for understanding the aquatic systems pollution, reassert itself into dangerous contaminants in local and global scale, leading to a stress of the aquatic communities and be associated to the chronic effect to human health. The present work had the aim of analyzing heavy metals found in the water in the Paranaguá Bay. The samples had been collected randomly around the Bay, totalizing ten samples. The opening of samples, using  $\text{HNO}_3$  was done. In each sample the concentrations of Ni, Fe, Se, Zn, Pb and Cu had been determined by the atomic absorption spectrophotometer method. Of all elements analyzed in the present study, only to Se was detected raised concentrations, above the limit established by CONAMA 20/86, being necessary the monitoring of this element in the environment and in its polluting sources.

*Key words:* Paranaguá Bay, selenium, water analysis.

### INTRODUÇÃO

Paranaguá é uma cidade de referência litorânea pela importância do Porto para a economia do Estado do Paraná. Possui um dos mais belos conjuntos arquitetônicos coloniais do Estado, extremamente valorizado em função da sua representatividade e de seu potencial turístico.

O aumento da população, com o correspondente crescimento das atividades agrônômicas e industriais e do Porto de

Paranaguá, vem modificando a conformação do contorno da Baía. Há preocupações com as condições ambientais do sistema (Silva *et al.*, 2003), pois 27% do volume total das mercadorias exportadas pelo porto corresponde a materiais perigosos ao meio ambiente. Entre esses destacam-se: derivados de petróleo, produtos químicos, sal, minérios, óleos vegetais, adubos, papel e os resíduos da soja. No caso de algum acidente, fatalmente as águas da baía e suas margens sofreriam danos irreversíveis (Martin, 1992, *apud* Caneparo, 1999).

\*Corresponding author: Dayana Moscardi dos Santos, e-mail: bioday@hotmail.com.

Em ambientes aquáticos, a distribuição de elementos e compostos químicos, contaminantes ou não, é controlada por processos químicos, físicos e biológicos que, em última análise, determinam sua concentração na coluna de água, nos sólidos suspensos e nos sedimentos (Bennett, 1987, *apud* Sá, 2003). No ambiente marinho, os metais se distribuem na água, nos sedimentos e nos organismos por meio de vários processos físico-químicos e biológicos (Amado *et al.*, 1994). A remoção dos metais da coluna d'água e sua deposição nos sedimentos depende, portanto, de fatores como floculação, condições de pH, condições redox, interação com materiais particulados e dissolvidos, orgânicos e inorgânicos (Bennett, 1987, *apud* Sá, 2003).

Vários estudos foram realizados sobre metais que contaminam o ambiente marinho. Trata-se de metais provenientes de fontes antropogênicas, como despejos industriais, lixo doméstico e emissões atmosféricas (Amado *et al.*, 1994).

Sá (2003) realizou um estudo sobre a distribuição e fracionamento de contaminantes nos sedimentos superficiais e as atividades de dragagem no complexo estuarino da Baía de Paranaguá (PR). O autor considerou que os teores de arsênio, cobre, cádmio, cromo, mercúrio, níquel, chumbo e zinco apresentaram concentrações elevadas, sendo que apenas o chumbo não apresentou concentrações acima do limite crítico adotado (Legislação Canadense).

A poluição por metais pesados está associada, por um lado, a metais presentes na forma dissolvida ou à matéria

particulada em suspensão na coluna de água; por outro, ao plâncton, pelo fato de os metais ingeridos pelos moluscos acumularem-se preferencialmente nos tecidos viscerais. Torna-se assim importante conhecer a quantidade de metal na forma livre iônica dissolvida que é, freqüentemente, muito menor do que o conteúdo total. O sedimento em suspensão é o principal meio de transporte dos metais na água. Em seguida, esses poluentes são depositados novamente em sedimentos do fundo, importantes reservatórios desses elementos para contaminação da coluna d'água e da biota (Amado Filho *et al.*, 1999).

Assim como as baías de Guanabara e a de Santos, a maioria dos ambientes costeiros tem sido afetada por diferentes tipos de poluentes orgânicos e inorgânicos. Portanto, a avaliação dos efeitos potenciais de cada contaminante e de sua interação com as algas constitui importante abordagem ecotoxicológica (Amado *et al.*, 1994).

O presente estudo apresentou como principal propósito a análise dos metais pesados presentes na água da Baía de Paranaguá, correlacionando os parâmetros analisados com o meio ambiente, saúde e de acordo com a Legislação vigente.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os pontos de coleta foram selecionados com base na carta náutica nº 1824 da Baía de Paranaguá. Ao todo foram dez pontos aleatórios em torno da Baía de Paranaguá (Figura 1), devidamente registrados com o auxílio de um GPS (Global Positioning System).



Figura 1 — Complexo estuarino da Baía de Paranaguá (FCL e LCL Cargas Marítimas, 2004).

As amostras foram coletadas em fevereiro de 2004, quando a temperatura no município de Paranaguá atingiu média de 22°C e com condições de maré de 0,8 m. Cada amostra foi coletada em vidro estéril devidamente identificado, sendo que no momento da coleta foram medidos valores de pH (phmetro), salinidade (com o auxílio de um salinômetro) e temperatura da água. Em seguida foram acondicionadas em gelo e transportadas até o laboratório em Curitiba.

Em Curitiba, as amostras foram levadas para o Laboratório de Toxicologia do Centro Universitário Positivo, onde foi realizada a abertura das amostras. O primeiro passo foi filtrar a amostra com o auxílio de um filtro Milipore tipo ME 25/21 0,45 µ e uma bomba a vácuo. Em seguida foram retirados 100 ml de cada amostra, adicionado-se 20 ml de ácido nítrico P. A. e levando ao aquecimento em chapa até evaporar 60 ml da solução. Após atingir a temperatura ambiente, foram adicionados 40 ml de água ultrapura, a fim de obter uma solução final de 100 ml de amostra para análise, permanecendo armazenada em balão volumétrico.

A leitura dos metais pesados presentes na água foi demonstrada através do Atomic Absorption Spectrophotometer AA-6800 Shimadzu. No presente estudo, foram analisados os seguintes metais: selênio, chumbo, ferro, níquel, zinco e cobre. Os gases utilizados para a leitura foram o acetileno e ar comprimido em análise de chama com lâmpadas de cátodo oco.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de metais pesados em águas marinhas envolve um instrumental bastante complexo devido às concentrações muito baixas, exigindo também alta frequência de amostragem

em função das variações bruscas que podem ocorrer nessas concentrações (Haug *et al.*, 1979, *apud* Guimarães *et al.*, 1982).

O sedimento em suspensão é o principal meio de transporte dos metais nas águas. Em seguida, esses poluentes são depositados novamente em sedimentos de fundo, importantes reservatórios desses elementos para a contaminação da coluna d'água e da biota (Amado Filho *et al.*, 1999).

O equipamento de absorção atômica utilizado para a leitura das amostras não abrangeu com precisão valores inferiores a 1 ppm, estando assim fora dos padrões de confiabilidade do aparelho.

Os resultados na análise deste trabalho são apresentados na Tabela 1. Foi utilizada como referencial a resolução nº 20, art. 8º do CONAMA de 18 de junho de 1986, que estabelece os teores máximos (mg/L) permitidos de metais pesados em águas salinas.

A análise de Ni das amostras apresentou concentrações inferiores ao nível de detecção do aparelho. Esse fato foi apontado por Fresenius *et al.* (1988), quando citam que o níquel ocorre em águas naturais somente em traços. O níquel pode estar contido em águas residuais de indústrias químicas, produção de metal ou mineração. Este elemento é um dos metais pesados mais móveis. Uma vez que Sá (2003) encontrou concentrações desse elemento acima do limite em sedimentos nesta mesma área, sugere-se que o níquel está ligado ao sedimento, formando complexos.

Já as concentrações de Zn, Cu, Fe e Pb encontradas nas amostras, apesar de detectadas pelo equipamento de Absorção Atômica, também apresentaram, em sua maioria, níveis inferiores ao padrão de confiabilidade do equipamento (1 ppm).

**Tabela 1** — Teores para os metais pesados analisados, expressos em ppm (mg/L), e teores máximos adotados pelo CONAMA 20/86.

Amostras	Ni	Zn	Cu	Fe	Pb	Se
Teores máximos (mg/L)	0,1	0,17	0,05	0,3	0,01	0,01
1	Não detectado	0,216	0,055	0,618	0,019	2,763
2	Não detectado	0,453	0,056	0,709	0,020	2,628
3	Não detectado	0,289	0,054	0,501	Não detectado	2,589
4	Não detectado	0,148	0,066	0,4956	Não detectado	2,570
5	Não detectado	0,426	0,071	0,4191	Não detectado	2,551
6	Não detectado	0,414	0,073	0,649	Não detectado	2,480
7	Não detectado	Não detectado	0,083	0,445	Não detectado	2,409
8	Não detectado	0,006	0,098	0,458	Não detectado	2,409
9	Não detectado	Não detectado	0,096	0,599	Não detectado	2,178
10	Não detectado	Não detectado	0,107	1,043	Não detectado	2,088

A partir das baixas concentrações desses metais nas amostras, pode-se sugerir que os sedimentos de fundo são melhores indicadores para análise de metais pesados porque permanecem, enquanto as águas estão sempre se renovando.

Contudo, embora esses metais não tenham sido detectados em níveis altos na água da Baía de Paranaguá, é necessário avaliar sua bioacumulação em organismos dessa região.

Os níveis de selênio obtidos nesta análise foram elevados em todos os pontos de coleta (Tabela 1). Esses valores ultrapassaram consideravelmente os níveis máximos estabelecidos pelo CONAMA, de 0,01 mg/L em águas salinas.

Como esse elemento está presente na composição de tintas antiincrustantes para embarcações, é possível que esta seja uma fonte importante de selênio nas águas da Baía de Paranaguá.

Segundo a pesquisadora da UFSC Anabelle Aruya Garcia, a tinta antiincrustante usada nas embarcações de madeira da Lagoa da Conceição e Canal da Barra está poluindo as águas com metais pesados (Martins, 2000).

De acordo com os dados apontados por Martin (1992), *apud* Caneparo (1999), entre os materiais perigosos ao meio ambiente exportados via Baía de Paranaguá estão os resíduos de soja.

O Porto de Paranaguá exportou em 2003 cerca de 5.931.950 toneladas de soja (APPA, 2004). Tendo em vista esse grande fluxo de soja no Porto, sugere-se que os altos níveis de selênio encontrados na água também possam ser provenientes do selênio presente na soja.

O selênio é severamente tóxico para peixes e invertebrados aquáticos, é conhecido por produzir tumores em animais e é listado como carcinogênico. Este elemento é um nutriente essencial para humanos, mas é tóxico em quantidades excessivas, desencadeando no homem sintomas similares aos do arsênio (Sittig, 1980).

No mês em que a coleta foi realizada, os níveis de precipitação foram elevados. Sugere-se que os níveis de selênio encontrados possam estar relacionados ao fato de os oceanos receberem poluentes provenientes da deposição atmosférica e de efluentes industriais e domésticos despejados nos rios.

Segundo Andrade Engenharia (1998), *apud* Caneparo (1999), na região portuária, composta pelo porto propriamente dito e indústrias a ele ligadas, a instalação dessas atividades modificou os cursos de drenagem do local, e também observaram-se a poluição do ar e a contaminação do meio aquático por produtos químicos gerados pelas indústrias aí instaladas, como, por exemplo, a Catallini e a Petrobras.

Diante do resultado obtido, sugere-se um estudo aprofundado sobre este metal, uma vez que em concentrações

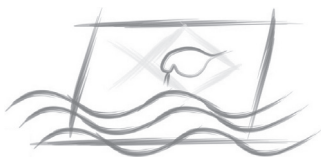
elevadas na coluna d'água está biodisponível para a biota, afetando o ecossistema como um todo. Sendo assim, sugerem-se fontes hipotéticas para esse elemento, como: tintas incrustantes dos cascos das embarcações, resíduos de soja, efluentes industriais, domésticos e de refinarias.

Ressalta-se a importância da realização de futuras pesquisas desenvolvidas na Baía de Paranaguá em relação a metais pesados, principalmente o selênio, pelos altos níveis encontrados, muito superiores aos valores estabelecidos pela legislação.

*Agradecimentos* — Ao Centro Universitário Positivo, pelo apoio e por ser uma instituição competente que preza pela qualidade e desenvolvimento científico.

## REFERÊNCIAS

- AMADO, G. M., KAREZ, C. S. & PFEIFFER, W. C., 1994, Algas e poluição por metais. *Ciência Hoje*, 18(105): 21-24.
- AMADO FILHO, G. M., REZENDE, C. E. & LACERDA, L. D., 1999, Poluição da baía de Sepetiba já ameaça outras áreas. *Ciência Hoje*, 25(149): 46-49.
- APPA – Associação dos Portos de Paranaguá e Antônia. *Cais comercial*. Disponível em: <http://www.pr.gov.br/portos/Acesso> em 4 mai. 2004.
- CANEPARO, S. C., 1999, *Manguezais de Paranaguá: uma análise da dinâmica espacial da ocupação antrópica 1952-1996*. Tese de Doutorado em Meio Ambiente e Desenvolvimento, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 263 p.
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. *Resolução nº 20 de junho de 1986*. O Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, no uso das atribuições que lhe confere o art. 7º, inciso IX, do decreto 88.351, de 1º de junho de 1983, e o que estabelece a resolução CONAMA nº 003, de 5 de junho de 1984.
- FRESENIUS, W., QUENTIN, K. E., SCHNEIDER, W., 1988, *Water analysis*. Springer-Verlag, Stuttgart, 804p.
- GUIMARÃES, J. R. D., LACERDA, L. D. TEIXEIRA, V. L., 1982, Concentração de metais pesados em algas bentônicas da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, com sugestão de espécies monitoras. *Rev. Brasil. Biol.*, Rio de Janeiro, 42(3): 553-557.
- MARTINS, C. *Metais pesados poluem água na Lagoa*. Disponível em: <http://an.uol.com.br/ancapital/2000/ago/04/Acesso> em: 6 maio 2004.
- SÁ, F., 2003, *Distribuição e fracionamento de contaminantes nos sedimentos superficiais e atividades de dragagem no complexo estuarino da baía de Paranaguá (PR)*. Dissertação de Mestrado em Geologia Ambiental, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Sul, 106p.
- SILVA, L., MANGRICH, A. S., BARRETO, R. A., SANTOS, E. J. & HERRMANN, A. B. *Determinação de metais pesados em sedimentos da Baía de Paranaguá*. Disponível em: <http://www.sbgq.org.br/ranteriores/23/resumos/1386/>. Acesso em: 22 set. 2003.
- SITTIG M., 1980, Selenium, pp. 324-328. In: *Priority toxic pollutants: Health impacts and allowable limits*. Noyes Data Corp., New Jersey.



SETAC – Brazil

## Comparação de Bioensaios Laboratoriais e “in situ” Utilizando *Chironomus xanthus* na Avaliação da Toxicidade de Sedimentos do Rio Monjolinho (São Carlos, SP)

C. B. DORNFELD,<sup>1\*</sup> E. L. G. ESPÍNDOLA,<sup>1,3</sup> R. FRACÁCIO,<sup>2</sup> B. K. RODRIGUES<sup>1</sup> & A. NOVELLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. Avenida Trabalhador São-carlense, 400, CEP 13566-970, São Carlos, SP

<sup>2</sup>Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Hidrobiologia, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luís, km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP

<sup>3</sup>Prof. Associado do Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, Avenida Trabalhador São-carlense, 400, CEP 13566-970, São Carlos, SP

### RESUMO

Os bioensaios “in situ” e laboratoriais (96 h), com *Chironomus xanthus*, foram realizados em outubro/03 e janeiro/04, em 4 estações de coleta no rio Monjolinho (São Carlos, SP). Nos bioensaios laboratoriais foram utilizados 60 g de sedimento e 240 ml de meio ASTM, e 6 organismos foram expostos em cada réplica, avaliando-se a toxicidade final pela porcentagem de sobrevivência. As câmaras para os bioensaios “in situ” foram montadas com tubos de PVC e telas com malha de 300 µm. Adicionou-se o sedimento de cada estação nas câmaras e colocaram-se dez organismos do IV ínstar em cada réplica, sendo contabilizada a sobrevivência ao final do bioensaio. Os ensaios laboratoriais apresentaram variação espacial e temporal acentuada, com valores de sobrevivência entre 0% (Federal, out/03) e 100% (Federal, jan/04). Os resultados dos bioensaios “in situ” demonstram alta mortalidade dos organismos (entre 84% e 97% em out/03 e entre 60% e 70% em jan/04). No entanto, os resultados não indicam, necessariamente, as estações com maior ou menor grau de toxicidade, já que ocorreu alta mortalidade na nascente, nos bioensaios “in situ” (acima de 60%), o que pode estar associada a outros fatores, como saturação da malha com material em suspensão e diferentes texturas do sedimento. A presença de organismos invasores nas câmaras também foi observada, indicando competição e predação no interior das mesmas. Diante do exposto, pode-se inferir que há a necessidade de um aprimoramento metodológico dos bioensaios “in situ”, minimizando a ação de fatores externos que dificultam a avaliação dos resultados obtidos.

*Palavras-chave:* bioensaios “in situ”, sedimento, *Chironomus xanthus*, rio Monjolinho.

### ABSTRACT

#### Comparison between laboratory and “in situ” bioassays using *Chironomus xanthus* in the assessment of sediment toxicity in the Monjolinho river (São Carlos, SP)

“In situ” bioassays (96 h), using *Chironomus xanthus*, were conducted in October/03 and January/04, in 4 sampling stations at Monjolinho river. Laboratory bioassays were conducted using 60g of sediment and 240 ml of ASTM medium, for 96 h. Six organisms were added to each test-chamber and the toxicity evaluation was given by the mean survival. The “in situ” bioassay test chambers (PVC) were covered by a 300 µm mesh. The sediment of each sampling station was added to the chambers together with 10 organisms at IV instars. The laboratory bioassays showed survivals ranging between 0% (Federal, oct/03) and 100% (Federal, jan/04). The results “in situ” bioassays showed high mortality (between 84% and 97% in Oct/03 and between 60% and 70% in Jan/04). However, the results did not show, necessarily, that the sediments were toxic or not, because of the high mortality that occurred in the river’s spring (over 60%), which may be associated to other factors,

\*Corresponding author: Carolina B. Dornfeld, e-mail: carol\_buso@yahoo.com.br.

like screen saturation with suspended matter and different sediment textures. The presence of indigenous organisms may have influenced the results, due the competition and predation in the chamber. Thus, we can infer that the protocol for “in situ” bioassays using *C. xanthus* must be improved in order to minimize the influence of confounding factors on the tests results.

*Key words:* “in situ” bioassay, sediment, *Chironomus xanthus*, Monjolinho river.

## INTRODUÇÃO

Historicamente, pesquisas sobre o desenvolvimento e padronização de métodos para avaliação da toxicidade em sedimentos têm enfatizado bioensaios laboratoriais, sendo que muitos desses têm sido incorporados nos programas de avaliação e monitoramento de sedimentos contaminados e no desenvolvimento de critérios de qualidade de sedimento. Recentemente, maior ênfase tem sido dada ao desenvolvimento e uso de técnicas para avaliação da contaminação de sedimentos em bioensaios “in situ” (Sibley *et al.*, 1999), os quais consistem em expor os organismos-teste no próprio ambiente, avaliando as respostas reais do funcionamento da área de estudo em questão.

Segundo Meregalli *et al.* (2000), vários bioensaios “in situ” têm sido desenvolvidos para monitorar os sistemas aquáticos, envolvendo organismos-teste como peixes, dafnídeos, anfípodos, quironomídeos, entre outros.

No Brasil, no entanto, a realização de testes “in situ” ainda é incipiente, sendo necessário maior esforço para o estabelecimento de metodologias mais adequadas às condições encontradas em países tropicais, já que as adaptações de ensaios de regiões temperadas podem não ser totalmente satisfatórias. Nesse sentido, o presente estudo teve por objetivo comparar a aplicabilidade de técnicas de bioensaios “in situ” e laboratoriais com a espécie *Chironomus xanthus* na avaliação da qualidade de sedimentos do rio Monjolinho (São Carlos, SP).

## MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no rio Monjolinho (21°57' e 22°06'S; 47°50' e 48°05'W), localizado no município de São Carlos, SP. Com 43,25 km de extensão, o rio percorre áreas rurais e urbanas do município, sendo um sistema impactado por atividades industriais e agropecuárias (cultivo de cana-de-açúcar e criação de gado).

Os bioensaios utilizando *Chironomus xanthus* (Chironomidae, Díptera) foram realizados em outubro/03 e janeiro/04. O sedimento foi coletado com draga de Eckman e, no caso dos ensaios em laboratório, foi mantido resfriado a 4°C. Os organismos-teste foram obtidos no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia de Organismos Aquáticos (NEEA/CRHEA/EESC/USP), onde são mantidos em bandejas plásticas contendo areia limpa e meio de cultivo ASTM (pH entre 6,5 e 7,5 e dureza entre 12 e 16 mgCaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>), aeração constante, temperatura

entre 23 e 25°C e alimentação diária composta por uma solução de ração para peixes Tetramin®, na proporção de 0,04 mg.ml<sup>-1</sup> de água de cultivo (USEPA, 2000). Os bioensaios laboratoriais foram realizados segundo Fonseca (1997), utilizando a proporção 1:4 de sedimento:água e expondo-se 6 organismos em cada réplica, com duração de 96 h, contabilizando os organismos sobreviventes. Os bioensaios “in situ” foram realizados utilizando câmaras montadas com tubos de PVC (comprimento de 30 cm e diâmetro de 7 cm) e telas com malha de 300 µm nas laterais e nas extremidades, conforme recomendações de Sibley *et al.* (1999), adaptadas para bioensaios com quironomídeos. As câmaras, em triplicata, foram amarradas com arame em uma estaca de madeira, colocadas na água e fixadas no sedimento 24 h antes do início do bioensaio. No dia seguinte, adicionou-se o sedimento, após uma pré-triagem para retirada de organismos nativos e, em seguida, foram adicionados 10 organismos do IV instar em cada réplica. O tempo de exposição foi de 96 h, contabilizando a sobrevivência ao final desse período. Experimentos “controle” foram conduzidos com amostras de sedimento provenientes do cultivo, uma vez que a região não apresenta locais não impactados (Espíndola *et al.*, 2000). Simultaneamente foram realizadas as medidas de pH, condutividade, oxigênio dissolvido e temperatura da água (multi-sensor Horiba U-10) e matéria orgânica (Trindade, 1980); Cr e Cu potencialmente biodisponíveis (digestão com HCl 0,1 N e leitura em espectrofotômetro de absorção atômica por forno de grafite, modelo SpectrAA220 – Varian, segundo Silvério, 1999) e granulometria (ABNT, 1968) do sedimento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos bioensaios “in situ” demonstram baixa sobrevivência dos organismos (entre 3% e 16% em out/03 e entre 30% e 40% em jan/04), como mostra a Figura 1, enquanto os controles laboratoriais apresentaram 95% (out/03) e 90% (jan/04) de sobrevivência, com baixa sobrevivência mesmo na Nascente (10% e 40%, em out/03 e jan/04, respectivamente), o que não era esperado. Os ensaios laboratoriais apresentaram grande variação na sobrevivência, sendo de 95,5% na Nascente (em ambos os períodos), 0% na Federal (out/03), 66,7% na Ponte Caída (out/03) e 100% na Federal (jan/04). Quando se comparam os dois tipos de testes, observa-se que nos bioensaios laboratoriais as porcentagens de sobrevivência foram sempre superiores às apresentadas nos bioensaios “in situ”, ocorrendo acentuada diferença entre os métodos.

Na Figura 2 observa-se tendência ao aumento da mortalidade conforme aumenta a porcentagem de silte + argila e de matéria orgânica, com os maiores valores na estação Federal. Em geral, o sedimento avaliado foi considerado arenoso (mais de 85% de areia) e inorgânico (menos de 10% de matéria orgânica). Segundo Salomons & Forstner (1984), quanto maior a porcentagem de partícula finas no sedimento (silte + argila), maior a adsorção de metais, podendo apresentar características de maior toxicidade à biota se este metal se tornar disponível aos organismos por alguma alteração nas condições ambientais. Este fato pode ser visualizado na Figura 3, quando se observa a estação Federal em out/03 (ambos os testes) e verifica-se a alta mortalidade em decorrência, provavelmente, das maiores

concentrações de Cr e Cu (4,5 e 13,8  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , respectivamente), aliadas à baixa concentração de oxigênio dissolvido (Tabela 1). Em jan/04, as concentrações de Cr e Cu na Federal foram inferiores e a concentração de oxigênio dissolvido foi superior, em comparação com out/03, podendo justificar as diferenças na mortalidade entre os dois períodos analisados. Em geral, os resultados dos três metais analisados foram equivalentes aos encontrados por Brigante & Espíndola (2003) no rio Mogi-Guaçu (SP/MG) e inferiores ao obtido por Espíndola *et al.* (2004) para o rio Atibaia, SP. Segundo os critérios propostos por Thomas (1987), o sedimento do rio Monjolinho é classificado como não poluído para os 3 metais em questão (concentração de Cd < 6  $\mu\text{g.g}^{-1}$  e concentrações de Cu e Cr < 25  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ).

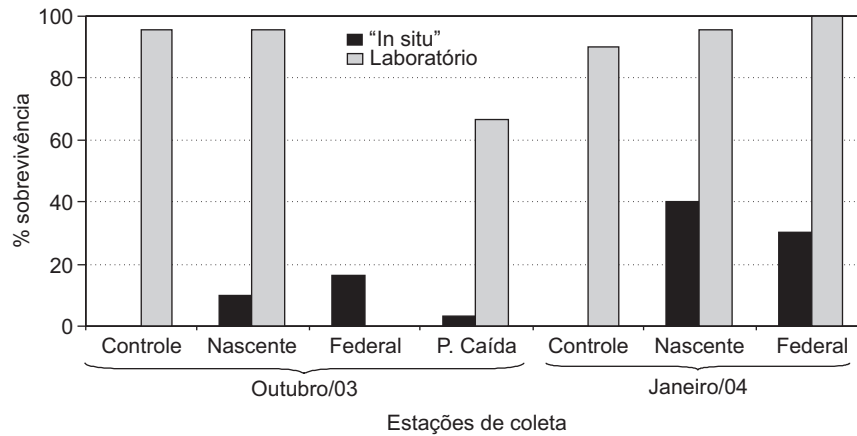


Figura 1 — Comparação da sobrevivência de *C. xanthus* nos bioensaios “in situ” e laboratoriais.

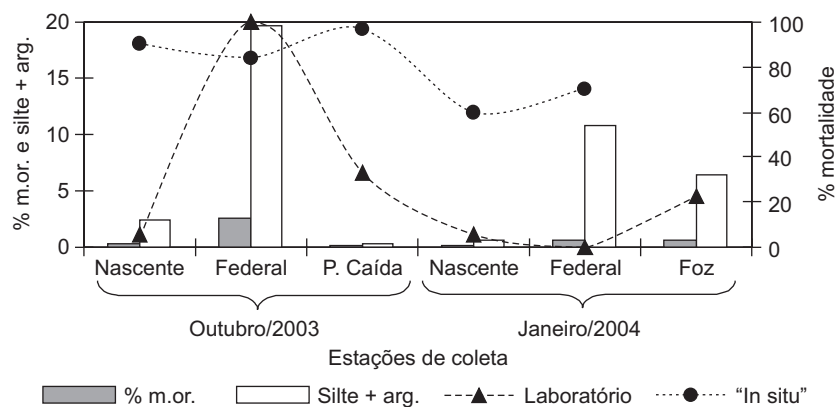


Figura 2 — Porcentagem de matéria orgânica, de silte + argila e de mortalidade nas estações de coleta do rio Monjolinho (São Carlos, SP).

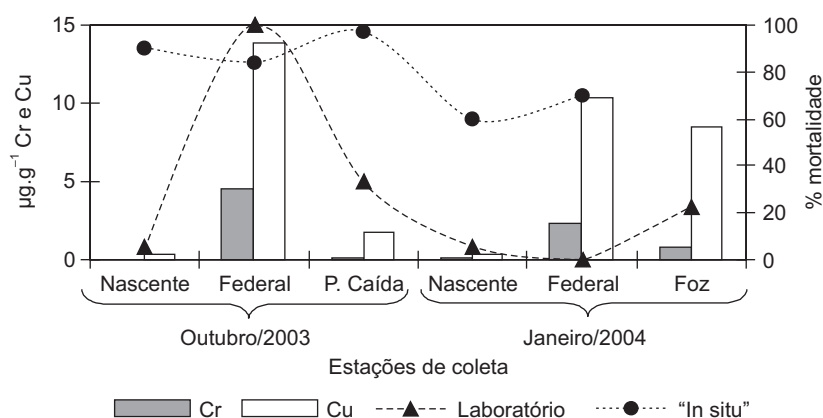
A mortalidade observada na Nascente, no bioensaio “in situ”, pode ser atribuída a diferentes fatores que confundem a avaliação final dos experimentos, como também observado por Castro *et al.* (2003), como saturação da malha com material em suspensão (alterando o fluxo de água e diminuindo a aeração das câmaras), diferentes texturas do sedimento e qualidade da água que flui pelas câmaras. Na Tabela 1 observa-se o baixo pH da água da Nascente em jan/04 (entre 4,77 e 5,62), o que também pode diminuir a sobrevivência dos organismos expostos. Para as demais estações amostradas, observa-se que, além das baixas concentrações de oxigênio dissolvido, a presença de organismos invasores nas câmaras pode influenciar os resultados, considerando que foram encontrados oligoquetas, hirudíneos e outras espécies de quironomídeos, podendo haver competição e predação no interior das mesmas durante o período de exposição.

Além dos problemas relacionados ao organismo-teste, como a não adaptação às variáveis ambientais (tipo de

sedimento da nascente, por exemplo), deve-se considerar as características do próprio ambiente, o qual é impactado por atividades da pecuária, plantios de hortaliças, café e laranja. Apesar de o sedimento ser arenoso, não favorecendo a adsorção de contaminantes (baixos valores de Cr e Cu), e classificado como não poluído (Thomas, 1987), deve-se reconhecer que os organismos nos testes “in situ” também estão em contato com a água que passa pelas câmaras, a qual apresenta concentrações de metais e organoclorados acima do recomendado pela legislação brasileira vigente (Espíndola *et al.*, 2000; Pelaez-Rodrigues, 2001). A reduzida concentração de oxigênio dissolvido em algumas estações de coleta também pode ter colaborado para a maior mortalidade dos organismos expostos. Por outro lado, os resultados dos bioensaios laboratoriais apontam para um sedimento não tóxico para a espécie testada, corroborando com as baixas concentrações de Cr e Cu e também com a classificação proposta por Thomas (1987).

**Tabela 1** — Variáveis iniciais e finais dos bioensaios “in situ”. Condutividade ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), oxigênio dissolvido ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

Parâmetros	Outubro de 2003				Janeiro de 2004			
	pH	Cond.	OD	Temp.	pH	Cond.	OD	Temp.
	Nascente – 10% de sobrevivência				Nascente – 40% de sobrevivência			
<b>iniciais</b>	6,13	8,00	6,48	21,70	4,77	8,00	8,07	20,40
<b>finais</b>	6,09	8,00	6,50	20,10	5,62	10,00	7,76	20,70
	Federal – 16% de sobrevivência				Federal – 30% de sobrevivência			
<b>iniciais</b>	6,63	58,00	2,70	22,00	5,54	57,00	3,29	25,20
<b>finais</b>	6,70	85,00	0,33	23,80	5,61	27,00	5,86	21,60
	Ponte Caída – 3% de sobrevivência				Foz			
<b>iniciais</b>	6,65	159,00	3,66	19,50	Devido à forte chuva após a montagem do bioensaio, as câmaras foram perdidas.			
<b>finais</b>	7,01	159,00	1,05	20,50				



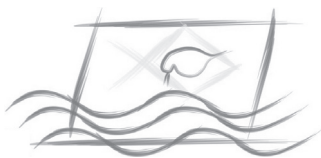
**Figura 3** — Concentração de metais potencialmente biodisponíveis no sedimento (Cr e Cu) e porcentagem de mortalidade nas estações de coleta do rio Monjolinho (São Carlos, SP).

Portanto, os resultados deste estudo apresentam diferença entre os bioensaios “in situ” e os laboratoriais. Em relação à qualidade do sedimento, os testes laboratoriais indicam ausência de toxicidade (condições ambientais mais controladas e uso de água do meio cultivo), porém, os bioensaios “in situ” demonstram toxicidade elevada (acima de 60%), caracterizando efeito sinérgico dos compartimentos água e sedimento, mas não revelando o potencial de contaminação isolado do sedimento justamente pela passagem de água pelas câmaras. A análise dos dados permite concluir que testes “in situ” são ferramentas importantes para avaliar o potencial de toxicidade do ambiente de forma mais ampla (água + sedimento), uma vez que está sujeito às interferências locais, mas não revela, de forma isolada, os efeitos de toxicidade do compartimento sedimento. Reconhece-se, desta forma, que bioensaios laboratoriais e “in situ” são ferramentas importantes, sendo os resultados complementares na avaliação ambiental.

*Agradecimentos* — Os autores agradecem à equipe técnica do Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (EESC/USP) e à FAPESP pela concessão do Auxílio Pesquisa, processo nº 2002/10494-6.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT, 1968, *Análise granulométrica de solos*. 32p.
- BRIGANTE, J. & ESPÍNDOLA, E. L. G., 2003, *Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu*. RiMa Editora, São Carlos, SP, 255p.
- CASTRO, B. B., GUILHERMINO, L. & RIBEIRO, R., 2003, In situ bioassay chambers and procedures for assessment of sediment toxicity with *Chironomus riparius*. *Environ. Poll.*, 125: 325-335.
- ESPÍNDOLA, E. L. G., 2000, O Rio Monjolinho: um estudo de caso. In: ESPÍNDOLA, E. L. G., SILVA, J. S.V., MARINELLI, C. E & ABDON, M. M. A *Bacia Hidrográfica do rio Monjolinho*. RiMa Editora, São Carlos, Cap. 3, pp. 36-40.
- ESPÍNDOLA, E. L. G., LEITE, M. A. & DORNFELD, C. B., 2004, *Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): caracterização, impactos e proposta de manejo*. RiMa Editora, São Carlos.
- FONSECA, A. L., 1997, *Avaliação da qualidade da água do rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados*. Escola de Engenharia de São Carlos (USP), 211p.
- MEREGALLI, G., VERMEULEN, A. C. & OLLEVIER, F., 2000, The use of chironomidae deformation in an in situ test for sediment toxicity. *Ecotox. and Environ. Saf.*, 47: 231-238.
- PELÁEZ-RODRIGUES, M., 2001, *Avaliação da qualidade da água da Bacia do Alto Jacaré-Guaçu/SP (Ribeirão do Feijão e Rio do Monjolinho) através de variáveis físicas, químicas e biológicas*. Escola de Engenharia de São Carlos (USP), 190p.
- SALOMONS, W. & FÖRSTNER, U., 1984, *Metals in the hydrocycle*. Springer-Verlag, 349p.
- SIBLEY, P. K., BENOIT, D. A., BALCER, M. D., PHIPPS, G. L., WEST, C. W., HOKE, R. A. & ANKLEY, G., 1999, In situ bioassay chamber for assessment of sediment toxicity and bioaccumulation using benthic invertebrates, *Environ. Toxic. and Chem.*, 18(10): 2325-2336.
- SILVÉRIO, P. F., 1999, *Partição, biodisponibilidade e toxicidade de metais pesados a organismos bentônicos em sedimentos*. Universidade Federal de São Carlos, 77p.
- THOMAS, R. L. 1987. A protocol for the selection of process-oriented remedial options to control *in situ* sediment contaminants. *Hydrobiologia*, 149: 247-258.
- TRINDADE, M., 1980, *Nutrientes em sedimento da represa do Lobo (Brotas/Itirapina, SP)*. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 219p.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2000, USEPA/600/R – 99/064. *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminant with freshwater invertebrates*. 2 ed. Washington, D.C., 192p.



## Avaliação Ecotoxicológica do Ácido Hexadecanóico e do $\beta$ Sitosterol para *Daphnia similis* Claus 1876 (Cladocera, Crustacea)

R. GALVANI-SOBREIRA,<sup>1\*</sup> T. HEID-FURLEY,<sup>1</sup> J. I. EFFIGEN<sup>2</sup> & A. C. DE OLIVEIRA-FILHO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>APLYSIA Pesquisas Ambientais, Av. Américo Buaiz, 501 Praia do Suá, Vitória, ES

<sup>2</sup>Aracruz Celulose S.A., Rod. Aracruz s/n, Barra do Riacho, ES

### RESUMO

A madeira utilizada como matéria-prima pelas fábricas de celulose e papel possui altos teores de extrativos com elevado potencial tóxico, como os ácidos graxos e o *phytosterol*  $\beta$  sitosterol, que promovem efeitos tóxicos (masculinização das fêmeas, dentre outros) a organismos aquáticos como peixes e invertebrados. Em função da crescente preocupação com o meio ambiente no Brasil, fábricas como a Aracruz Celulose S.A. realizam rotineiramente testes ecotoxicológicos para avaliar os efeitos de seus efluentes no ambiente e antecipar possíveis problemas ambientais. O presente estudo foi realizado em duas etapas com o objetivo de relacionar a toxicidade do efluente misto da Aracruz Celulose com alguns dos extrativos mencionados. A primeira etapa consistiu na identificação e quantificação dos ácidos graxos e do  $\beta$  sitosterol, presentes nos efluentes setoriais através de análises cromatográficas. Na segunda etapa, foram realizadas análises ecotoxicológicas com dois dos extrativos mais abundantes e com o efluente misto (não tratado), para avaliar se a toxicidade aguda desse efluente para o organismo *Daphnia similis* está relacionada com as concentrações atuais dos extrativos testados. A quantificação dos extrativos presentes nos efluentes setoriais da Aracruz Celulose mostrou que os efluentes da depuração, branqueamento ácido e evaporação contribuíram com as maiores concentrações desses compostos, ao passo que os efluentes do pátio de madeira e branqueamento alcalino contribuíram com os menores valores. Os ácidos graxos linoleico, hexadecanóico, hexacosanóico, octadecanóico e docosanóico foram os mais abundantes, e o  $\beta$  sitosterol foi identificado em todos os efluentes analisados, estando em maior concentração no efluente da depuração. Os extrativos escolhidos para os testes de toxicidade foram o ácido graxo hexadecanóico e o  $\beta$  sitosterol. Estes não apresentaram toxicidade aguda aos organismos-teste, mesmo em concentrações dez vezes maiores que as presentes nos efluentes setoriais da Aracruz Celulose, entretanto, os resultados dos três testes de toxicidade do efluente misto para *D. similis* apresentaram toxicidade aguda, com EC50 iguais a 16,66%, 23,62% e 52,02%. Desta forma, concluiu-se que a toxicidade aguda exibida pelo efluente misto (não tratado) não está relacionada aos extrativos analisados.

*Palavras-chave:* testes de toxicidade, *Daphnia similis*, extrativos, ácido hexadecanóico,  $\beta$  sitosterol.

### ABSTRACT

#### Toxicological evaluation of the hexadecanoic acid and $\beta$ sitosterol for *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladoceran, Crustacean)

The wood used as substance cousin for the plants of pulp and paper mill possesss high texts of extractives with raised potential toxic, as acid the greasy ones, and *phytosterol*  $\beta$  sitosterol, that they promote toxic effects (transform male into females, amongst others) to the aquatic organisms such as fish and invertebrates. In function of the increasing concern with the environment in Brazil, industries as Aracruz Celulose S.A. carry through ecotoxicologics tests routinely to evaluate the effect of its effluent ones in the environment and to anticipate possible ambient problems. The present study it was carried through in two stages with the objective to relate the toxicity of the effluent compound (not treated) of the Aracruz Cellulose with some of the mentioned extractives. The first stage consisted of the acid identification and quantification of greasy and the  $\beta$  sitosterol, effluent gifts in the sectorial ones of the plant, through chromatographic analyses. In the second stage, ecotoxicologics analyses with two of the extractives most abundant and with the effluent compound had

\*Corresponding author: Romena Galvani Sobreira, e-mail: romena@aplysia.com.br.

been carried through (not treated), to evaluate if the acute toxicity of these effluent for organism *Daphnia similis* this related with the current concentrations of the tested extractives. The quantification of the extractives effluent gifts in sectorial of the Aracruz the Cellulose showed that the effluent ones of the purification, acid bleaching and evaporation, had contributed with the biggest concentrations of these composites, to the step that effluent of the wooden patio and the alkaline bleaching, had contributed with the lesser values. Acid greasy the linoleic, hexadecanoic, hexacosanoic, octadecenoic and docosanoic had been most abundant, and the  $\beta$  sitosterol was identified in all the effluent ones analyzed, being in bigger concentration in the effluent one of the purification. The extractives chosen for the toxicity tests had been acid the greasy hexadecanoic and the  $\beta$  sitosterol. These had not presented acute toxicity to the organism-test, exactly in concentrations ten bigger times that the effluent gifts in sectorial of the Aracruz Cellulose, however, the results of the three tests of toxicity of the effluent compound for *D. similis* had presented acute toxicity, with EC50 equals to 16.66%; 23.62%; and 52.02%. Of this form, the acute toxicity shown by the effluent compound was concluded that (not treated) not this related to the analyzed extractives.

**Key words:** toxicity test, *Daphnia similis*, extractive, hexadecanoic acid,  $\beta$  sitosterol.

## INTRODUÇÃO

A madeira utilizada como matéria-prima pelas fábricas de celulose e papel possui altos teores de extrativos com elevado potencial tóxico, que podem promover alterações morfológicas, fisiológicas e mortalidade a organismos aquáticos, como peixes e invertebrados. Dentre esses compostos estão os extrativos, como os ácidos graxos, resínicos e *phytosterols*, encontrados nos efluentes gerados no processo industrial. O efluente gerado no polpeamento da madeira apresenta alta toxicidade (Dube & MacLachy, 2000), pois é rico em soda, sulfato, metanol, terpenos, acetona, produtos fenólicos e compostos naturais como lignina, ácidos graxos e resínicos e  $\beta$  sitosterol (Peng & Roberts, 2000; Furley *et al.*, 2003), como é o caso dos efluentes setoriais da evaporação (EVA) e depuração (DEP), em que acontece, respectivamente, a recuperação de produtos químicos do processo de produção, como, por exemplo, do licor negro, rico em lignina, e a separação de impurezas (nós, areia, pedras, etc.) da madeira após o processo de cozimento.

Já no branqueamento da polpa, realizado nos setores de branqueamento ácido e branqueamento alcalino, o efluente é rico em oxidantes como cloro, dióxido de cloro e peróxido de hidrogênio (Furley *et al.*, 2003; Perissoto *et al.*, 2003), além de fenóis, ácidos graxos, resínicos e *phytosterols* (Herstad *et al.*, 2003). As demais áreas da fábrica normalmente contribuem com ínfima quantidade de compostos tóxicos (Furley *et al.*, 2003), como é o caso do pátio de madeira (PM), caldeira (CALD), desmineralização (DESMI), secagem (SEC), onde, respectivamente, é realizada lavagem, descascamento e picagem da madeira; cozimento da mesma para transformá-la em polpa; retirada de sais minerais e impurezas da água que alimenta as caldeiras através dos processos de osmose reversa e troca iônica; e remoção de água da folha de celulose antes de passar à secagem por vapor.

Estudos com ácidos graxos e com o *phytosterol*  $\beta$  sitosterol mostram que esses compostos apresentam toxicidade para invertebrados (Kaplin *et al.*, 1997) e peixes, podendo

interferir no sistema hepático e hormonal, ou seja, causando redução da gônada, redução dos hormônios sexuais no fluxo sanguíneo, deterioração do embrião e masculinização das fêmeas (Gilman *et al.*, 2002).

Estudos realizados com o efluente misto (efluente não tratado, formado no tanque de mistura por todos os efluentes produzidos em cada setor de produção) da Aracruz Celulose nos anos 90 mostraram toxicidade aguda para *D. similis*. Entretanto, não foi verificado se a causa dessa toxicidade era decorrente da presença de altas concentrações de ácidos graxos e  $\beta$  sitosterol. Desse modo, o presente trabalho teve por objetivo avaliar se a toxicidade aguda exibida pelo efluente misto ao organismo *D. similis* está relacionada às concentrações do ácido graxo hexadecanoico e do *phytosterol*  $\beta$  sitosterol existentes nos efluentes setoriais (produzidos nos setores de produção da fábrica); e buscar controle interno desses efluentes, a fim de que os mesmos não cheguem com alta toxicidade à Estação de Tratamento de Efluentes (ETE), acarretando a redução da eficiência do tratamento biológico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado em duas etapas. A primeira consistiu na extração, identificação e quantificação dos ácidos graxos e do  $\beta$  sitosterol presentes nos efluentes setoriais do pátio de madeira (PM), caldeira (CALD), desmineralização (DESMI), evaporação (EVA), depuração (DEP), branqueamento ácido (BA), branqueamento alcalino (BALC) e secagem (SEC).

A parte orgânica dos efluentes setoriais foi extraída utilizando diclorometano. Uma alíquota do efluente foi transferida para um funil de separação, onde foi adicionado diclorometano. A fase aquosa foi desprezada e a fase orgânica foi recolhida em erlenmeyer de 250 ml com sulfato de sódio anidro, o qual depois foi transferido para um balão volumétrico de 250 ml, sendo filtrado em algodão previamente extraído com acetona.

Após a extração, o conteúdo foi concentrado utilizando o rotavapor modelo BUCHI 461 e então transferido para um

frasco de vidro previamente pesado e levado para estufa a  $\pm 60^\circ\text{C}$  até que ocorresse a evaporação completa dos solventes da alíquota concentrada.

Em seguida, o extrato concentrado foi analisado através do processo de separação, identificação e quantificação por cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização de chamas (FID) e acoplado a um espectrômetro de massa.

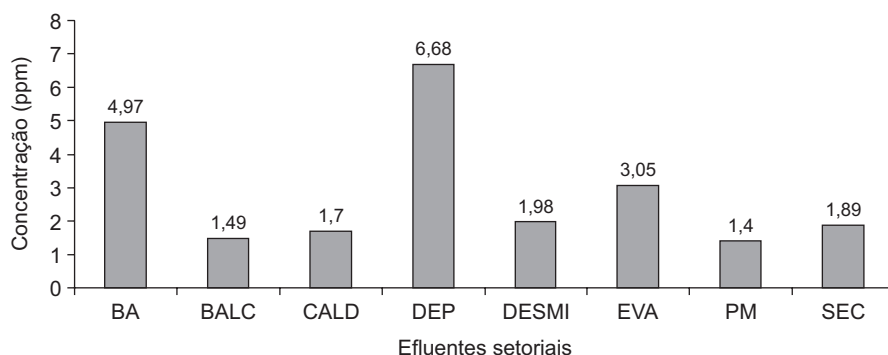
A segunda fase do trabalho consistiu na realização dos testes de toxicidade com o efluente misto, em três diferentes amostragens, com o ácido hexadecanóico e com o  $\beta$  sitosterol em concentrações até dez vezes maiores que as encontradas nos efluentes setoriais da fábrica. Para esse estudo foram realizados três testes com cada objeto de estudo, a fim de confirmar e obter boa reprodutibilidade dos resultados. Os testes de toxicidade foram realizados nas concentrações de 5%, 25%,

50% e 75% para o efluente misto e nas concentrações de 5,0 mg/L, 10,0 mg/L, 15,0 mg/L e 20,0 mg/L para o ácido hexadecanóico e para o  $\beta$  sitosterol de acordo com a norma CETESB L5.018.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efluentes da depuração, branqueamento ácido e evaporação apresentaram maiores quantidades de extrativos, como observado por Peng & Roberts (2000). Os demais efluentes contribuem com pequena quantidade desses compostos (Figura 1).

Os testes realizados com o efluente misto apresentaram toxicidade aguda para *D. similis* (Tabela 1), o que não foi observado nos testes com o ácido hexadecanóico e  $\beta$  sitosterol (Tabelas 2 e 3), mesmo em concentrações dez vezes maiores que as encontradas nos efluentes setoriais analisados.



**Figura 1** — Concentração total de extrativos nos efluentes setoriais da Aracruz Celulose. Legenda: BA = branqueamento ácido, BALC = branqueamento alcalino, CALD = caldeira, DEP = depuração, DESMI = desmineralização, EVA = evaporação, PM = pátio de madeira e SEC = secagem.

**Tabela 1** — Valores de EC50 (%) do teste agudo com o efluente misto para o cladóceros *Daphnia similis*.

Teste	EC50 (%)	UT*	Intervalo de confiança
1ª amostragem	16,66	0,06	11,88-23,39
2ª amostragem	23,62	0,04	18,48-30,21
3ª amostragem	52,02	0,01	45,67-59,27

\*Unidade tóxica.

**Tabela 2** — Porcentagem de organismos mortos ou imóveis por concentração de ácido hexadecanóico.

Concentração (mg/L)	Porcentagem de organismos imóveis		
	Teste 1	Teste 2	Teste 3
Controle (H <sub>2</sub> O diluição)	0	0	0
5	15	0	0
10	10	0	0
15	10	5	0
20	20	0	15

**Tabela 3** — Porcentagem de organismos mortos ou imóveis por concentração de  $\beta$  sitosterol.

Concentração (mg/L)	Porcentagem de organismos imóveis		
	Teste 1	Teste 2	Teste 3
Controle (H <sub>2</sub> O diluição)	0	0	0
5	15	5	20
10	10	10	5
15	40	15	35
20	20	0	30

Apesar de não ter causado efeito a 50% dos organismos, o  $\beta$  sitosterol mostrou-se com potencial tóxico mais elevado que o ácido hexadecanóico, já que a porcentagem de organismos imóveis foi maior que no teste com o ácido hexadecanóico.

De acordo com trabalhos realizados por Sayeed *et al.* (2000), esses extrativos causam toxicidade crônica em peixes e em *Ceriodaphnia dubia* (Markris & Banerjee, 2000) expostos a essas substâncias.

Desta forma, conclui-se que outros compostos podem estar sendo responsáveis pela atual toxicidade aguda do efluente misto da Aracruz Celulose à *D. similis*, como, por exemplo, compostos sulfurados, metanol, terpenos, acetonas, produtos fenólicos, cloro (Dube & MacLatchy, 2000; Furley *et al.*, 2003), dióxido de cloro, hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio (Dalvi & Silva, 2002), não descartando também outros subprodutos da madeira que não foram testados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CETESB L5.018, 1998, *Teste de toxicidade aguda com Daphnia similis Claus, 1876 (Cladocera; Crustacea)*. São Paulo, SP.
- DALVI, L. & SILVA, C. M., 2002, *Efeito do residual de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do ClO<sub>2</sub> sobre o sistema de lodos ativados de indústria de celulose Kraft branqueado*. 35<sup>o</sup> Congresso Anual de Celulose e Papel da ABTCP. São Paulo SP.
- DUBE, M. G. & MACLATCHY, D. L., 2000, *Reverse Osmoses Treatment of condensates from a bleached Kraft pulp mill: effects on acute and chronic toxicity of process streams and final effluent*. 4<sup>th</sup> International Conference on Environmental Impacts of Pulp and Paper Industry. p. 270-276.
- FURLEY, T. H., OLIVEIRA, A. C. & EFFIGEN, J. I., 2003, *Balanço da toxicidade dos efluentes setoriais da Aracruz Celulose S/A*. 36<sup>o</sup> Congresso Anual de Celulose e Papel da ABTCP. São Paulo, SP.
- GILMAN, C. I., LEUSCH, F. D. L., BRECHENRIDGE, W. C. & MACLATCHY, D. L., 2002, Effects of phytosterol mixture on male fish plasma lipoprotein fractions and testis P450sc activity. *General and Comparative Endocrinology*, 130: 172-184.
- HERSTAD, S. S., RENBERG, L., BASTA, J., HOLTINGER, L. & WÄNE, G., 1997, *Chemical characterization of the organic content in bleached plan effluents*. 3<sup>rd</sup> International Conference on Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents. New Zealand, pp. 135-145.
- KAPLIN, C., HOLBOM, B. & HUHTINIEMI, N., 1997, *Removal and degradation of wood resin components in an activated sludge treatment plant*. 3<sup>rd</sup> International Conference on Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents. New Zealand, pp. 146-152.
- MAKRIS, S. P. & BANERJEE, S., 2001, Fate of resin acids in pulp mill secondary treatment systems. *Water Research*, (36): 2878-2882.
- PENG, G. & ROBERTS, J. C. 2000. An improved method for analyzing resin acid in woods, pulp process water and effluent samples. *TAPPI Journal*, 82(12): 1-7.
- PERISSOTO, D., SALVADOR, E. & RAMOS, L. P., 2003, *Estudo comparativo da composição química de polpa kraft convencional e kraft MCC*. 36<sup>o</sup> Congresso Anual de Celulose e Papel da ABTCP. São Paulo, SP.
- SAYEED, I., AHMAD, I., FÁTIMA, M., HAMID, T., ISLAM, F. & RAISUDDIN, S. 2000. Inhibition of brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPASE activity in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) exposed to paper mill effluent. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*.



SETAC – Brazil

## Toxicidade e Genotoxicidade do Sulfato de Cobre em Planárias de Água Doce e Camundongos

D. PRÁ,<sup>1</sup> T. GUECHEVA,<sup>1,2</sup> S. I. R. FRANKE,<sup>1,3</sup> T. KNAKIEVICZ,<sup>1</sup> B. ERDTMANN<sup>1,4</sup> & J. A. P. HENRIQUES<sup>1,4,5\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS

<sup>2</sup>Departamento de Biologia e Química, UNIJUÍ, Ijuí, RS

<sup>3</sup>Curso de Nutrição, Departamento de Educação Física e Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, RS

<sup>4</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS

<sup>5</sup>Curso de Farmácia, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS

### RESUMO

A contaminação ambiental com compostos contendo metais pesados é preocupante, pois estes têm alta toxicidade, capacidade de bioacumulação e potencialidade de induzir danos ao material genético. O sulfato de cobre tem largo emprego tanto em processos industriais quanto na agricultura. A comparação dos efeitos tóxicos e genotóxicos entre espécies é fundamental para avaliar o risco biológico de poluentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar os danos gerados pelo sulfato de cobre em diferentes sistemas biológicos. Foram utilizados dois eucariotos distintos no que diz respeito à posição evolutiva: planárias, um dos primeiros metazoários, e camundongos, um metazoário complexo que possui ampla similaridade biológica com os humanos. Em planárias, o sulfato de cobre induziu danos ao DNA de forma dose-dependente ( $r = 0,984$ ;  $p < 0,001$ ), quando avaliado pelo teste cometa. As doses maiores ( $3-5 \times 10^{-5}$  M  $\text{CuSO}_4$ ) induziram significativamente mais danos que os controles negativos. Doses dez vezes menores induziram efeitos significativos no tratamento crônico. Estudos de reparo, por sua vez, mostraram a persistência do dano ao DNA 24 h após a exposição aguda. O pós-tratamento com  $\text{CuSO}_4$  diminuiu o reparo dos danos causados pelo agente alquilante de DNA metil metanosulfonato (MMS). O sulfato de cobre (nas doses de 0,06 a  $1,2 \times 10^{-5}$  M  $\text{CuSO}_4$ ) também induziu alterações na regeneração das planárias, de maneira dose-dependente ( $r = 0,822$  e  $p < 0,001$ ). Em camundongos, a dose de 20,72 mg  $\text{CuSO}_4$  por kg de peso corporal induziu aumento significativo dos danos no DNA, quando avaliados pelo ensaio cometa após 24 h. O reparo foi efetivo após 48 h ( $p < 0,01$ ). Os resultados deste estudo revelaram o potencial tóxico e genotóxico do sulfato de cobre e a capacidade de interferência com processo de reparo do dano no DNA causado por outras substâncias, sugerindo possível efeito modulador da genotoxicidade em combinação com outros agentes no ambiente.

*Palavras-chave:* sulfato de cobre, planária, camundongo, genotoxicidade, teste cometa.

### ABSTRACT

#### Toxicity and genotoxicity of copper sulphate in freshwater planarians and mice

Environmental contamination with copper-containing compounds is significant. Copper sulfate is largely applied in industrial and agricultural processes. To compare the toxicity of compounds between species is fundamental for predicting environmental hazards. The goal of this paper is to compare the toxicity and genotoxicity of copper sulfate between planarians, an early eukaryote, and mice, a mammal with striking similarities with humans. In planarians, copper sulfate induced DNA damages in a dose-related fashion ( $r = 0.984$ ;  $p < 0.001$ ) and the higher doses of the compound induced more damage than the controls when evaluated by the comet assay. Doses ten fold lower than the used in acute tests induced significant genotoxicity in chronic tests. Repair studies showed a low repair capability for the acute doses after 24 h. The post-treatment with  $\text{CuSO}_4$  reduced the repair of the DNA damages generated by the DNA alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS). The copper sulfate also induced significant concentration-related influence in planarian

\*Corresponding author: João Antonio Pêgas Henriques, e-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br.

regeneration ( $r = 0.822$  and  $p < 0.001$ ). In mice, a dose of 20.72 mg CuSO<sub>4</sub> per kg of body weight induced a significant increase in DNA damage 24 h after the exposure; and the repair was effective after 48 h from the exposure, when evaluated by the comet assay. Results indicate toxicity and genotoxicity as well as repair interference potential for copper sulfate, supporting a possible interference of the metal in the toxicity of environmental pollutants.

*Key words:* cupric sulfate, planarian, mouse, genotoxicity, comet assay.

## INTRODUÇÃO

Estudos recentes apontam que metais como ferro, cobre e cromo atuam em ciclo redox, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) (Stohs & Bagchi, 1995). As EROs e o estresse oxidativo gerado por estas induzem a peroxidação de lipídios, danos no DNA e alteram a homeostasia de diversos minerais essenciais. Adicionalmente, o estresse oxidativo afeta diversas rotas metabólicas, incluindo aquelas envolvidas no reparo de danos ao DNA. O sulfato de cobre tem largo emprego tanto em processos industriais quanto na agricultura, como fungicida, e na dieta humana, como suplemento alimentar. O cobre é comumente encontrado em diversos compartimentos dos ecossistemas, sendo um poluente de importância significativa (Teisseire *et al.*, 1998).

A comparação dos efeitos tóxicos e genotóxicos entre espécies é fundamental para avaliar o risco biológico de poluentes, particularmente para compostos persistentes no meio ambiente (Bolognesi *et al.*, 1999). Planárias de água doce são sensíveis a poluentes, têm ampla distribuição, são de cultivo fácil e barato, atributos que favorecem a sua utilização como bioindicador. Os camundongos têm amplo emprego em estudos, são similares aos humanos e compartilham o mesmo habitat com os últimos.

O ensaio cometa é uma ferramenta sensível para quantificar danos no DNA, bem como o processo de reparação dos mesmos, e é amplamente empregado em estudos de genética toxicológica e monitoramento ambiental (Fairbairn *et al.*, 1995; Tice, 1995; Collins *et al.*, 1997). A versão alcalina do teste, descrita por Singh *et al.* (1988), permite medir a ocorrência de quebras simples e dupla, sítios alcali-lábeis e cross-links no DNA.

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos tóxicos e genotóxicos do sulfato de cobre em planárias e camundongos, além de elucidar alguns aspectos do reparo de danos no DNA induzidos pelo sulfato de cobre nos dois organismos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Testes em planárias

Foram utilizadas neste estudo planárias da espécie *Girardia schubarti*. Os animais foram cultivados em água reconstituída e alimentados semanalmente com fígado bovino. Planárias medindo entre 5 e 8 mm foram expostas aos tratamentos. Para determinação da toxicidade, as planárias foram expostas a sulfato de cobre dissolvido em água de cultivo em

diferentes concentrações por 24 h ou por 7 dias (com as soluções sendo trocadas diariamente) a 19°C. Em cada experimento 8 planárias foram analisadas.

Planárias regenerantes foram obtidas pela decapitação na região imediatamente abaixo das aurículas para os estudos de alteração na regeneração. Grupos de 20 planárias regenerantes foram submetidas a soluções de sulfato de cobre nas concentrações de 0,06, 0,15, 0,6 e 1,2 µm de Cu, dissolvidos em água de cultivo. Os seguintes marcadores de regeneração foram observados: a) aparecimento de cicatriz (dia 1); b) emergência de blastema (dia 2); c) formação de ocelos completos (dia 3); e d) emergência de aurículas (dia 4). As planárias não foram alimentadas durante os testes e os animais foram avaliados em intervalos subsequentes de 24 h, quando o número de animais apresentando um marcador de regeneração específico foi anotado (Calevro *et al.*, 1998, 1999).

A genotoxicidade do sulfato de cobre foi avaliada pelo ensaio cometa: a 2 h, nas concentrações de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 × 10<sup>5</sup> M; e a 7 dias, nas concentrações de 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 × 10<sup>5</sup> M. O teste cometa também foi utilizado para avaliar a cinética de reparo do DNA. As planárias foram tratadas por duas horas com MMS [8 × 10<sup>5</sup> M] e, posteriormente, incubadas por 2, 4 e 24 h em água de cultivo (pós-incubação) ou por 2, 4 e 24 h na presença de 2 × 10<sup>5</sup> M CuSO<sub>4</sub> (pós-tratamento). Planárias não tratadas foram também incubadas por 2, 4 e 24 h em água de cultivo contendo ou não CuSO<sub>4</sub> [2 × 10<sup>5</sup> M].

### Camundongos

Camundongos da linhagem CF1 pesando entre 25 e 30 gramas, com idade entre 5 e 7 semanas, foram obtidos da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre, RS. Antes dos testes os animais foram aclimatizados por 7 dias, recebendo ração e água *ad libitum* e, então, foram tratados por gavagem.

### Ensaio cometa

A versão alcalina do teste cometa foi executada segundo Tice (1995). Para as planárias, as lâminas foram confeccionadas a partir de uma suspensão celular obtida pela tripsinização dos organismos (4-8 por amostra). Já, para cada camundongo, uma gota de sangue da cauda foi coletada em um microtubo contendo heparina, o que se constituiu no material de interesse. Cem células selecionadas aleatoriamente foram analisadas para cada amostra/animal. As células foram classificadas de acordo com o formato da imagem em cinco classes (sem dano = 0, dano máximo = 4). Desse modo, constituindo um índice de dano

para cada amostral/animal variável de 0 (sem dano algum – 100 células  $\times$  0) a 400 (dano máximo – 100 células  $\times$  4).

### Análises estatísticas

As análises estatísticas foram executadas pelo programa GraphPad Prism 3.0. Os dados de toxicidade foram analisados pela análise de Probit para determinar os valores de  $LC_{50}$ . Os danos ao DNA nos camundongos em relação ao controle e entre 24 e 48 h foram comparados pelo teste *t* de Student. Para as análises de correlação foi utilizado o coeficiente de Pearson. O nível de significância foi de 0,05.

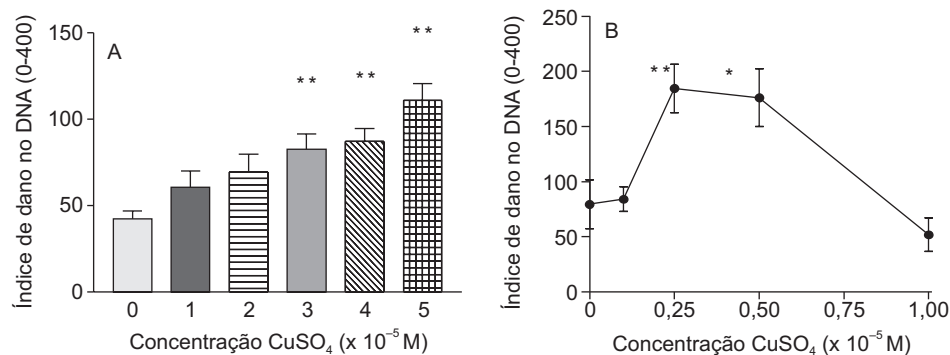
## RESULTADOS

Em planárias, a  $LC_{50}$  foi de 1230  $\mu$ g Cu/L a 24 h e de 480  $\mu$ g Cu/L a 7 dias. O sulfato de cobre causou atraso na

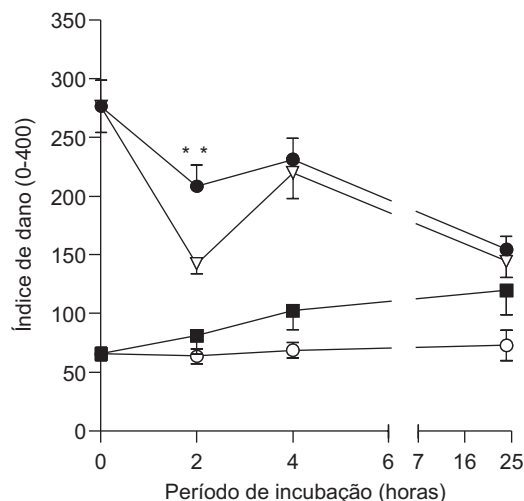
regeneração de maneira concentração-dependente ( $r = 0,822$ ;  $p = 0,001$ ) num intervalo de concentrações que variou de 0,06 a  $1,2 \times 10^{-5}$  M  $CuSO_4$ .

Foi observado aumento no dano ao DNA de forma concentração-dependente após 2 h (Figura 1A) e 7 dias (Figura 1B) de exposição ao cobre quando avaliado pelo ensaio cometa.

As planárias tratadas com MMS e incubadas na presença de sulfato de cobre mostraram persistência de lesões ao DNA após 2 h (Figura 2). A 4 h, houve aumento no dano de DNA em relação ao dano após 2 h, que pode ser atribuído a quebras no DNA introduzidas durante o reparo. O dano no DNA no grupo de pós-incubação permanece elevado em relação ao controle 24 h e 48 h após tratamento. O tratamento de 48 h com sulfato de cobre  $2 \times 10^{-5}$  M mostrou-se tóxico tanto no grupo controle como no grupo de pós-tratamento.



**Figura 1** — Efeito genotóxico do sulfato de cobre em planárias. A – após 2 h de tratamento. B – após 7 dias de tratamento. Média e desvio-padrão de 4-6 experimentos. Significativamente diferente do controle: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  pelo teste de ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnet.



**Figura 2** — Cinética de reparo do dano ao DNA causado por MMS na presença de  $CuSO_4$  em planárias. Tratamento por 2 h com MMS ( $8 \times 10^{-5}$ ) e incubadas em água de cultivo ( $\nabla$ ) – pós-incubação, ou na presença de  $2 \times 10^{-5}$   $CuSO_4$  ( $\bullet$ ) – pós-tratamento. Planárias não tratadas também foram incubadas em água de cultivo ( $\circ$ ), ou na presença de  $2 \times 10^{-5}$  M  $CuSO_4$  ( $\blacksquare$ ). Média e desvio-padrão de 5-7 experimentos. \*\*Significativamente diferente do valor correspondente à pós-incubação,  $p < 0,01$ .

Em camundongos, o sulfato de cobre induziu aumento de dano ao DNA em relação ao controle negativo, após 24 h. Uma redução significativa, em comparação com 24 h, nos danos ao DNA foi observada 48 h após exposição ( $p < 0,01$ ).

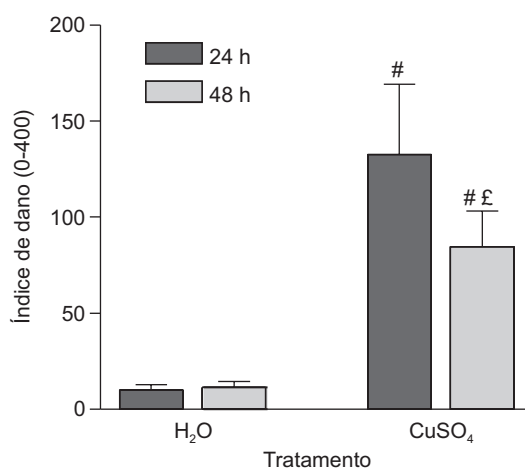
## DISCUSSÃO

Nossos resultados apontaram efeito tóxico e genotóxico do sulfato de cobre em planárias de água doce e em camundongos. Os testes de regeneração apontaram um potencial teratogênico, principalmente em relação ao tempo de regeneração. Esse atraso poderia indicar o risco de mal-formações embrionárias. O efeito genotóxico pode ser atribuído à indução de EROs, via reação do tipo Fenton, que pode causar danos em componentes celulares como DNA e proteínas. Diferentemente dos estudos *in vitro*, nossos resultados, *in vivo* com planárias e camundongos, apontam reparo mais lento, de modo que o dano ao DNA não volta ao nível basal 24 h ou 48 h do início da exposição. Isso acentua a importância dos testes *in vivo* que permitem avaliar a influência da homeostasia sobre a estabilidade do material genético.

O ensaio cometa não prevê necessariamente o potencial mutagênico das substâncias testadas, uma vez que detecta alterações no DNA que podem ou não ser reparadas eficientemente. Contudo, vários trabalhos já apontaram o efeito mutagênico de compostos contendo cobre. Uma das possíveis razões da genotoxicidade do cobre é a interferência do elemento

sobre os mecanismos celulares de reparo do DNA. Para avaliar isso, as planárias foram expostas ao MMS, um agente alquilante de ação direta, e, posteriormente, incubadas na ausência e na presença de  $\text{CuSO}_4$ . Observou-se inibição do reparo, que pode ser atribuída à inibição das enzimas de reparo: a) pela ligação ao sítio ativo, em substituição ao co-fator responsável pela reatividade das moléculas; b) pela desnaturação mediada pela interação do cobre com os grupos sulfidril; e c) pela inibição dos passos de polimerização e ligação na fita do DNA durante o processo de reparo. Além disso, pode ocorrer efeito sinérgico gerado pelas EROs produzidas pelo cobre. A inibição do reparo de DNA em presença de sulfato de cobre poderia acentuar o efeito mutagênico do MMS e, supostamente, de outros agentes alquilantes.

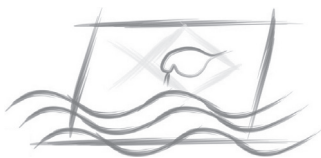
A concordância das respostas genotóxicas em planárias e em camundongos valida o uso de planárias para a avaliação da toxicidade e genotoxicidade de compostos metálicos *in vivo* pelo ensaio cometa. Além disso, reforça a utilidade dos estudos de regeneração em planárias. Desse modo, as planárias podem ser utilizadas para avaliar riscos ambientais relacionados à exposição aguda e crônica a químicos, em ecossistemas aquáticos. O efeito inibitório dos íons de cobre sobre o reparo de lesões ao DNA induzidas por MMS aponta efeito modulatório do metal sobre o efeito genotóxico de misturas ambientais de natureza complexa. Estudos adicionais são necessários para analisar a interferência de metais sobre o reparo de DNA



**Figura 3** — Genotoxicidade do sulfato de cobre em células sanguíneas de camundongos avaliada pelo ensaio cometa. # Significativamente maior em relação à água a 24 h e a 48 h ( $p < 0,01$ ). £ significativamente menor que o dano a 24 h ( $p < 0,01$ ). Análise pelo teste *t* de Student.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BOLOGNESI, C., LANDINI, E., ROGGIERI, P., FABBRI, R. & VIARENGO, A., 1999, Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies. *Environ. Mol. Mutagen.*, 33: 287-292.
- CALEVRO, F., FILIPPI, C., DERI, P., ALBERTOSI, C. & BATISTONI, R., 1998, Toxic effects of Aluminum, Chromium and Cadmium in intact and regenerating freshwater planarians. *Chemosphere*, 37: 651-659.
- CALEVRO, F., CAMPINI, S., FILIPPI, C., BATISTONI, R., DERI, P., BUCCI, S., RAGGHIANI, M. & MANCINO, G., 1999, Bioassays for testing effects of Al, Cr and Cd using development in the amphibian *Pleurodeles waltl* and regeneration in the planarian *Dugesia etrusca*. *Aquatic Ecosystem Health Management.*, 2: 281-288.
- COLLINS, A. R., DUSINSKA, M., FRANKLIN, M., SOMOROVSKA, M., PETROVSKA, H., DUTHIE, S., PANAYIOTIDIS, M., RASLOVA, K. & VAUGHAN, N., 1997, Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. *Environ. Mol. Mutagen.*, 30: 139-146.
- FAIRBAIRN, D. W., OLIVE, P. L. & O'NEILL, K. L., 1995, The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, 339: 37-59.
- SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R. & SCHNEIDER, E. L., 1988, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175: 184-191.
- STOHS, S. J. & BAGCHI, D., 1995, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.*, 18: 321-336.
- TEISSEIRE, H., COUDERCHET, M. & VERNET, G., 1998, Toxic responses and catalase activity of *Lemna minor* L. exposed to folpet, copper, and their combination. *Ecotox. Environ. Safety.*, 40: 194-200.
- TICE, R. R., 1995, Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants, In: F. M. Butterworth (ed.), *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change*. Plenum Press, New York, pp. 314-327.



SETAC – Brazil

## Impacto Automotivo em Populações de *Ctenomys minutus* na Planície Costeira do RS: Avaliação do Teor de Metais Tóxicos e Medição de Lipoperoxidação

M. T. RAYA-RODRIGUEZ,<sup>1\*</sup> C. J. S. FERREIRA<sup>2</sup> & J. C. F. MOREIRA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ecologia e PPG em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

<sup>2</sup>PPG em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

<sup>3</sup>PPG em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

### RESUMO

O objetivo deste trabalho é verificar o impacto ambiental causado pelo tráfego automotivo através da determinação de metais tóxicos em diferentes compartimentos ambientais em áreas próximas a estradas e a sua correlação com a formação de lipoperoxídidos na população de *Ctenomys minutus* (tucu-tucos). Foram capturados indivíduos em três locais de diferente impacto automotivo nas quatro estações do ano. De cada animal foi retirado sangue para quantificação do índice de lipoperoxidação, através do ensaio bioquímico TBARs (espécies reativas ao ácido barbitúrico). Em cada ponto de amostragem foram retiradas alíquotas de pêlos e pelotas fecais dos animais, da vegetação fonte alimentar e do solo para determinação de Cd, Ni, Pb e Zn. Esta análise verificou diferença significativa em relação aos metais nos compartimentos ambientais de pontos próximos à estrada em relação à área controle. O teste TBARs indicou forte diferença sazonal, e no verão, com maior pressão de tráfego, o índice de dano foi maior em todas as áreas e os animais mais próximos à estrada apresentaram maior nível de dano.

*Palavras-chave:* *Ctenomys minutus*, impacto automotivo, metais tóxicos, lipoperoxidação.

### ABSTRACT

#### **Automotive impact in populations of *Ctenomys minutus* in the coastal plain in southern Brasil: evaluation of heavy metal contents and quantification of lipoperoxidation levels**

The present work aims to check the automotive traffic impact caused by analyze toxic metal concentration in environmental samples in areas near and far from the road and its correlation with lipoperoxides formation in population of *Ctenomys minutus* (tucu-tucos). Individuals were captured seasonally in three different traffic impact area. From each individual were collected blood to quantify lipoperoxidation by the biochemical assay TBARs (Tiobarbituric acid reactive). In samples of fur, spraints, soils and food vegetation were analyzed Cd, Ni, Pb and Zn. This study show significant difference of toxic metals in areas near the traffic road. The TBARs assay indicates strong seasonal differences. In summer, when the traffic road increase, the index injury was biggest in all the study areas and even greater near the road.

*Key words:* *Ctenomys minutus*, automotive impact, toxic metals, lipoperoxidation.

### INTRODUÇÃO

A exposição às emissões provenientes dos veículos tem sido considerada preocupante pelos seus efeitos na saúde humana. Alguns estudos experimentais e evidências epidemiológicas indicam que a gasolina e o óleo diesel têm

efeito mutagênico e/ou carcinogênico em animais e no homem (Lonnrot *et al.*, 1996).

Os efeitos de poluentes ambientais podem ser estimados através do uso de bioindicadores, que são organismos que refletem o estado do ambiente, podendo indicar poluição por sua presença ou ausência, frequência, distribuição, abundância,

\*Corresponding author: Maria Teresa Raya-Rodriguez, e-mail: mayte@ecologia.ufrgs.br.

sobrevivência e respostas a determinadas condições ambientais. Processos bioquímicos são usados para bioindicação, pois permitem o reconhecimento precoce de danos causados aos bioindicadores.

Uma provável maneira de os metais causarem carcinogênese é através da formação de radicais livres. Cádmio e níquel são classificados como carcinogênicos pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC).

A lipoperoxidação é uma evidência da injúria causada pelos radicais livres nos sistemas biológicos (Zwart et al., 1999). O nível de lipoperoxidação (dano oxidativo em lipídios) pode ser estimado pela determinação de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBAR).

Os tuco-tucos são pequenos roedores fossoriais, do gênero *Ctenomys*, que vivem em tocas individuais no solo e nestas desenvolvem todas as atividades biológicas. Neste trabalho estudaram-se indivíduos da espécie *Ctenomys minutus* (Freitas, 1995), que são herbívoros, têm ampla distribuição na Planície Costeira do Rio Grande do Sul e ocorrem em áreas relativamente povoadas ou de intensa atividade humana, inclusive próximo a rodovias. Essas características qualificam-no para este estudo como um potencial organismo bioindicador.

Este trabalho pretende avaliar o impacto causado pelo tráfego automotivo através de bioindicação ambiental e verificar se o aumento do tráfego de veículos na estrada relaciona-se com o aumento do dano nos bioindicadores utilizados.

## MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo deste trabalho situa-se na Planície Costeira do Rio Grande do Sul (Brasil), compreendida entre os paralelos

29°45'S e 30°15'S e os meridianos 50°00 e 50°30'W', onde se encontra o sistema lagunar da região Osório-Tramandaí, às margens da estrada RS 030. O fluxo de veículos nesta estrada é relativamente baixo, porém aumenta significativamente nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro, período de veraneio.

Foram selecionadas três áreas de coleta considerando os ventos predominantes na região (Hasenack & Ferraro, 1989). Dois pontos margeiam a estrada e um terceiro foi selecionado em área a cerca de 2000 m da rodovia mais próxima, representando o controle. A Fazenda Maribo representa o ponto menos impactado; as Fazendas Weber e Amaral nas margens da rodovia representam pontos de impacto direto.

A amostragem dos bioindicadores foi realizada em cada área de coleta nas quatro estações climáticas entre julho de 2000 e junho de 2001. O Quadro 1 apresenta as datas das coletas e o fluxo de veículos correspondente a cada ponto de amostragem.

Foram capturados em todo o período de avaliação 108 indivíduos de *Ctenomys minutus* com auxílio de armadilha do tipo Oneida-Victor nº zero. Os animais, anestesiados com Zoletil, tiveram retiradas alíquotas de pêlos para dosagem de metais. Coletou-se também 0,5 a 1,5 ml de sangue imediatamente armazenado a -40°C em gelo seco por aproximadamente seis horas. Posteriormente foram transferidos em laboratório para freezer a -70°C até os procedimentos dos testes bioquímicos; 79 amostras foram testadas e consideradas válidas para análise estatística.

Em cada área de amostragem foram retiradas três alíquotas de solo superficial, vegetação e pelotas fecais ao redor da toca de cada animal capturado, a fim de compor uma amostra composta para a dosagem de metais.

Quadro 1 — Fluxo de veículos e datas de captura.

Estação	Fazenda	Data coleta	Veículos/dia
Inverno	Maribo	17/8/2000	4900
	Weber	25/7/2000	5000
	Amaral	1/8/2000	4600
Primavera	Maribo	17/11/2000	6200
	Weber	21/11/2000	8200
	Amaral	28/11/2000	7400
Verão	Maribo	19/3/2001	6400
	Weber	13/3/2001	8300
	Amaral	6/3/2001	8900
Outono	Maribo	21/5/2001	5500
	Weber	4/6/2001	5700
	Amaral	24/5/2001	4800

Para a quantificação de metais em pêlos, solo e gramíneas, as amostras foram digeridas com ácido nítrico em microondas (CEM – MDS 2000). A determinação de Pb, Ni e Cd foi realizada por forno de grafite no Espectrofotômetro de Absorção Atômica SIMAA 6000 e a determinação de Zn, por chama no modelo 3300 (Perkin-Elmer, 1982).

O índice de peroxidação de lipídios usado foi o TBARs – Espécies Reativas de Ácido Tiobarbitúrico (Dal-Pizzol, 2001). Para esta determinação as amostras de sangue foram homogeneizadas em solução tampão e ácido tricloroacético 10% foi adicionado a cada amostra padronizada para precipitação de proteínas. Após a centrifugação, ao sobrenadante foi adicionado ácido tiobarbitúrico e incubado em banho-maria. O resultado foi obtido por espectrofotometria a 535 nm.

Utilizaram-se os programas Estatística for Windows, SPSS e SAS, e a análise de componentes principais foi realizada utilizando-se a “carga” conjunta dos metais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de metais está apresentada nos Quadros 2 a 5.

A Figura 1 apresenta o gráfico de escores fatoriais para solo. Observa-se tendência de baixos valores na fazenda Maribo para o conjunto integrado dos quatro metais analisados nos compartimentos solo em relação aos valores apresentados nas fazendas Amaral e Weber. A vegetação apresentou o mesmo comportamento.

Esse comportamento evidencia estatisticamente que diferentes cargas de metais atuam no ponto controle (Maribo)

e nas duas áreas marginais à estrada (Amaral e Weber). Nos compartimentos ambientais (pêlos e pelotas fecais) este comportamento não foi evidenciado.

Analisando-se as concentrações de cada metal isoladamente nos compartimentos ambientais dos três locais avaliados, verifica-se, através da variância, comportamento diferente entre o ponto controle (Maribo), sempre associado a baixos escores, e as Fazendas Amaral e Weber, associadas a altos escores, Quadro 6.

A análise estatística indicou que maiores concentrações de Pb, Ni e Zn nos diferentes compartimentos estão associadas à proximidade da estrada, sendo que Ni (solo, vegetação e pêlos) é o que mais está associado à proximidade da estrada.

Os valores do índice de peroxidação de lipídios (nmol TBA/mg de proteína) sazonal sugerem diferença entre a estação do verão e as demais estações do ano, Quadro 7. Já o resultado da análise multivariada, apresentado no Quadro 8, indica não haver diferença significativa entre os locais de coleta dentro de uma mesma estação. Porém, quando se compara o dano em um mesmo local de coleta nas diferentes estações, o Verão mostra-se significativamente diferente das demais estações para os pontos de impacto direto da estrada.

O coeficiente de Pearson (r), considerando todo o período avaliado, apresenta o valor de 0,667, indicando correlação positiva, ou seja, quanto maior o fluxo de veículos, maior o dano oxidativo. Já para a situação de verão, o coeficiente de Pearson (r) apresenta o valor de 0,836, indicando ser este o período de correlação entre o dano oxidativo e o fluxo de veículos, pois para as demais estações a correlação é nula.

**Quadro 2** — Concentração de cádmio ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) nos compartimentos ambientais dos locais avaliados da Planície Costeira, RS – 2000/2001.

Estação	Local	Solo	Vegetação	Pêlos	Pelotas fecais
	Maribo	6,35	29,5	39,4	78,2
Inverno	Weber	5,91	51,3	28,2	25,4
	Amaral	6,85	14,7	50,8	75,5
	Maribo	2,84	23,4	24,8	46,1
Primavera	Weber	8,31	9,03	43,6	41,9
	Amaral	3,82	22,1	28,2	81,8
	Maribo	2,10	19,9	8,96	36,1
Verão	Weber	2,02	30,7	23,0	33,4
	Amaral	2,41	21,0	22,1	48,7
	Maribo	nd	33,0	nd	89,0
Outono	Weber	1,0	54,0	20,0	42,0
	Amaral	nd	72,0	2,00	26,0

**Quadro 3** — Concentração de chumbo ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) nos compartimentos ambientais dos locais avaliados da Planície Costeira, RS – 2000/2001.

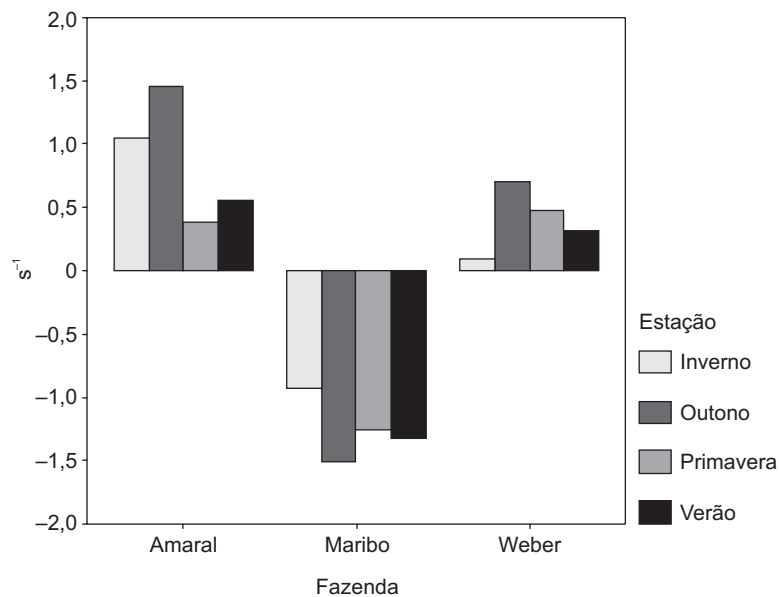
<b>Estação</b>	<b>Local</b>	<b>Solo</b>	<b>Vegetação</b>	<b>Pêlos</b>	<b>Pelotas fecais</b>
	Maribo	1,93	1,36	3,01	2,32
Inverno	Weber	3,09	3,38	2,16	1,65
	Amaral	3,87	2,21	1,21	2,98
	Maribo	1,75	1,73	5,60	1,96
Primavera	Weber	3,45	1,77	7,95	2,14
	Amaral	2,98	1,01	7,87	3,95
	Maribo	1,26	1,44	0,32	0,39
Verão	Weber	2,14	2,05	1,17	0,64
	Amaral	2,70	0,62	0,82	1,59
	Maribo	1,26	0,78	1,22	2,11
Outono	Weber	2,74	1,98	1,08	1,30
	Amaral	4,23	1,74	1,27	2,53

**Quadro 4** — Concentração de níquel ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) nos compartimentos ambientais dos locais avaliados da Planície Costeira, RS – 2000/2001.

<b>Estação</b>	<b>Local</b>	<b>Solo</b>	<b>Vegetação</b>	<b>Pêlos</b>	<b>Pelotas fecais</b>
	Maribo	0,38	0,42	1,05	0,88
Inverno	Weber	0,94	1,89	1,96	3,25
	Amaral	1,67	2,11	1,66	3,84
	Maribo	0,24	0,55	1,30	0,87
Primavera	Weber	0,98	0,62	3,16	1,66
	Amaral	1,45	1,35	1,91	2,23
	Maribo	0,24	0,40	0,32	0,82
Verão	Weber	1,67	2,35	1,50	2,08
	Amaral	1,51	1,29	0,83	2,08
	Maribo	0,16	0,16	0,57	0,19
Outono	Weber	1,18	1,06	1,36	0,93
	Amaral	1,64	1,20	1,24	1,98

**Quadro 5** — Concentração de zinco ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) nos compartimentos ambientais dos locais avaliados da Planície Costeira, RS – 2000/2001.

Estação	Local	Solo	Vegetação	Pêlos	Pelotas fecais
	Maribo	0,98	56,8	179	194
Inverno	Weber	2,92	54,2	144	125
	Amaral	3,92	75,6	131	152
	Maribo	0,58	54,4	163	116
Primavera	Weber	4,20	58,8	148	165
	Amaral	3,68	37,6	161	216
	Maribo	2,69	54,1	212	170
Verão	Weber	6,40	81,8	203	256
	Amaral	7,42	79,8	235	301
	Maribo	1,93	26,4	222	191
Outono	Weber	12,6	81,3	1,64	145
	Amaral	10,2	122	204	459

**Figura 1** — Escores fatoriais das concentrações dos quatro metais analisados para o compartimento solo, nos três locais de coleta, ao longo das estações do ano.

Os níveis de lipoperoxidação podem ser correlacionados à carga poluente relativa à época de maior fluxo de veículos anterior à semana da coleta. Desta forma, pelo exposto, os níveis

aumentados de lipoperóxidos medidos no sangue de *Ctenomys minutus* e expressos por TBARs (Quadro 7) sugerem ser este um potencial e promissor parâmetro de bioindicação ambiental.

**Quadro 6** — Escores fatoriais de cada metal nas diferentes áreas avaliadas.

Metal/Compartmento	Fazenda/Escore		
Ni/Solo	M b	W a	A a
Ni/Vegetação	M b	W a	A a
Ni/Pêlos	M b	W a	A ab
Pb/Solo	M b	W a	A a
Pb/Pelotas	M b	W b	A a
Zn/Solo	M b	W a	A a

Fazenda: M = Maribo, W = Weber e A = Amaral.

Escores: a = alto e b = baixo. Para caracteres iguais na mesma linha não existe diferença significativa; Diferença significativa entre a e b na mesma linha para um  $\alpha = 5\%$ .

**Quadro 7** — Índice médio de peroxidação de lipídios (nmol TBA/mg proteína) e erro-padrão em sangue de *Ctenomys minutus* por estação do ano nas áreas avaliadas.

Fazendas	Estações			
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
Maribo	0,0378 ± 0,0037	0,0097 ± 0,0058	0,0133 ± 0,0008	0,0144 ± 0,0029
Weber	0,0501 ± 0,0071	0,0156 ± 0,0034	–	0,0139 ± 0,0017
Amaral	0,0882 ± 0,0136	0,0155 ± 0,0041	0,0124 ± 0,0007	0,0105 ± 0,0011

**Quadro 8** — Escores médios com os resultados da comparação múltipla do nível de peroxidação de lipídios, por estação do ano, no sangue de *Ctenomys minutus* nas diferentes áreas avaliadas.

Fazendas	Estações			
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
Maribo	61,75 a A	15,90 a B	35,75 a AB	27,21 a B
Weber	65,50 a A	31,56 a B	NA	33,50 a B
Amaral	73,57 a A	32,10 a B	30,20 a B	22,33 a B

Os ranks seguidos pela mesma letra não diferem significativamente com um  $\alpha = 0,05$ .

Letras minúsculas consideram linhas dentro das colunas (a).

Letras maiúsculas consideram colunas dentro das linhas (A).

Tabela de comparação múltipla de Kruskal Wallis Rank Test,  $\alpha = 0,05$  e  $p < 0,0001$ .

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A quantificação e a análise dos metais nos compartimentos ambientais das três áreas mostram claramente que há diferença significativa entre os locais mais próximos à estrada (Amaral e Weber) em relação à área controle (Maribo) mais distante da mesma.

Os compartimentos solo e vegetação indicaram que a área Maribo apresenta tendência diferenciada em relação às outras duas áreas, quando avaliado o conjunto da carga de metais presentes.

Com relação ao teste bioquímico para TBARs, há tendência diferente entre as áreas avaliadas. No verão, observa-se comportamento diferenciado nas áreas que margeiam a estrada, tendo os animais desses locais apresentado maior nível de dano.

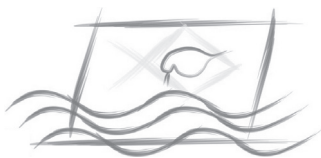
O teste bioquímico para TBARs indicou forte diferença sazonal, sendo que no verão o índice de dano obtido foi maior nas três áreas avaliadas.

As avaliações bioquímicas empregadas foram mais sensíveis que a quantificação de metais para indicar dano recente

nos tuco-tucos, salientando as diferenças entre as três áreas avaliadas com diferente impacto de tráfego.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DALL PIZZOL, F., 2001, *Estresse oxidativo e suplementação com retinol em células de Sertoli cultivadas*. Tese de Doutorado, UFRGS.
- FREITAS, T. R. O., 1995, Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 30: 53-59.
- HASENACK, H. & FERRARO, L. W., 1989, Considerações sobre o clima da região de Tramandaí, RS. *Pesquisas*, 22: 53-70.
- LONNROT, K., METSA-KETELA, T., MOLNAR, G., AHONEN, J., LATVALA, M., PELTOLA, J., PIETILA, T. & ALHO, H., 1996, The effect of ascorbate and ubiquinone supplementation on plasma and csf total antioxidant capacity. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(2): 211-217.
- PERKIN-ELMER, 1982, *Analytical methods for atomic absorption spectroscopy*. n. 332. West Germany.
- ZWART, L. L., MEERMAN, J. N. H., COMMANDEUR, J. M. N. & VERMEULEN, N. P. E., 1999, Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radicals and Medicine*, 26: 202-226.



SETAC – Brazil

## Um Estudo sobre a Utilização de Agrotóxicos e os Riscos de Contaminação num Assentamento de Reforma Agrária no Norte Fluminense

M. A. PEDLOWSKI,<sup>1\*</sup> S. L. DE AQUINO,<sup>2</sup> M. C. CANELA<sup>3</sup> & I. L. A. DA SILVA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Estudos do Espaço Antrópico, Centro de Ciências do Homem, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento, Agricultura e Sociedade, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

<sup>3</sup>Laboratório de Ciências Químicas, Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ

### RESUMO

O desenvolvimento de substâncias químicas destinadas à eliminação de ervas daninhas e pragas foi um dos aspectos que mais marcaram a evolução da agricultura mundial durante o século XX. Contudo, os resultados positivos trazidos pela incorporação de agrotóxicos na produção agrícola foram obscurecidos por crescentes debates acerca dos efeitos negativos sobre a saúde humana e o meio ambiente. O presente artigo apresenta os resultados de um estudo sobre a utilização de agrotóxicos em um assentamento de reforma agrária localizado na região norte fluminense, a partir da aplicação de questionários em uma amostra aleatória composta por cem assentados. Os dados coletados incluíram informações sobre aspectos demográficos e educacionais da população estudada e sobre a utilização de agrotóxicos. Os resultados obtidos mostram a utilização de agrotóxicos em cerca da metade das propriedades visitadas para combater ervas daninhas e diferentes tipos de pragas agrícolas em onze culturas. Do ponto de vista da toxicidade destes compostos utilizados, os dados mostram o predomínio de substâncias moderadamente tóxicas para a saúde humana e altamente perigosas para o meio ambiente. Os dados mostram também que o risco de contaminação associado à utilização destes produtos é aumentado pelo baixo nível de escolaridade dos assentados, pela falta de treinamento e equipamentos de segurança para a utilização dos agrotóxicos, pelo descarte inadequado de embalagens vazias e pela venda descontrolada dos produtos. Finalmente, os resultados deste estudo deixam claro a necessidade de um processo educativo entre os usuários de agrotóxicos sobre os riscos envolvidos na utilização incorreta dos produtos e de um trabalho de mapeamento da contaminação ambiental nos corpos de água próximos às culturas agrícolas.

*Palavras-chave:* agrotóxicos, meio ambiente, reforma agrária, toxicidade, saúde.

### ABSTRACT

#### **Studying the use and risks of contamination by pesticides in a land reform settlement in the north fluminense region, Brazil**

During the twentieth century, the agricultural economy benefited tremendously from new developments in chemical pesticides. This progress, however, has resulted in unintended consequences to human health and the environment. This article presents the results of a study carried out on land reform settlement located on the North Fluminense region. Data was obtained by surveying one hundred land reform settlers through a random sample questionnaire. Variables studied include household demography and education, types of pesticides, targeted crops, levels of training for pesticides handling, disposal of empty containers and use of safety equipments. Our results show that about half of the households were using pesticides to eradicate weeds and different types of agricultural pests on eleven crops. Data also showed a dominance of products with moderate toxicity for human health and high toxicity for the environment. The risk for increased contamination associated to pesticides utilization was greatly enhanced by a general lack of understanding regarding health and environmental risks. Most settlers declared having previously received no formal training for the handling and disposing of products being

\*Corresponding author: Marcos A. Pedlowski, e-mail: pedlowma@uenf.br.

used in their lots. We also found that most settlers were littering their lots with empty containers and had unrestricted access to pesticides retailers. Finally, our results show the need for the education on the health and environmental risks involved in misguided utilization of pesticides, and for the mapping of aquatic systems environmental contamination associated to pesticides utilization.

*Key words:* pesticides, environment, land reform, toxicity, health.

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da sociedade humana sempre esteve ligado à obtenção de alimentos e, por conseguinte, ao desenvolvimento da agricultura. Assim, a Revolução Industrial já acenava a importância de aumentar e aperfeiçoar a produção alimentar em virtude do crescimento populacional, sobretudo nas áreas urbanas (Chaim, 1999). Em consequência da exigência de uma demanda cada vez maior de alimentos, práticas agrícolas como as das monoculturas foram amplamente adotadas como estratégia para fornecer alimentos para os grandes mercados urbanos. Como resultado, o mundo experimentou uma transformação tecnológica nos sistemas produtivos, em que a utilização de agrotóxicos torna-se fundamental para minimizar o tempo de trabalho e combater um crescente número de pragas. As evidências científicas acerca dos impactos sócio-ambientais decorrentes da difusão de agrotóxicos e as consequentes restrições em torno do uso crescente dessas substâncias não detiveram a sua difusão em todo o mundo, especialmente nos países tropicais que buscavam participar do mercado mundial com frutas e legumes, e onde a ocorrência de pragas agrícolas é especialmente prevalente (Ecobichón, 2001; Nunes & Tabajara, 1998). Segundo o World Resources Institute, a maioria dos agrotóxicos comercializados nos países subdesenvolvidos consiste de organoclorados e carbamatos que são conhecidos por sua alta toxicidade (WRI, 1998). Para Waichman *et al.* (2003), a alta toxicidade de tais produtos, atrelada à falta de informações sobre possíveis riscos envolvidos na sua utilização e à carência de informações acerca da maneira correta de aplicá-los, é um fato que predomina entre os agricultores e que tem sido responsável por altos graus de contaminação ao meio ambiente e à saúde humana. Neste sentido, o Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos, produzido pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, 1996), divide os possíveis danos à saúde humana causados pela utilização dos mesmos em três tipos de intoxicação: aguda, subaguda e crônica, de acordo com o tempo de exposição e a toxicidade das substâncias manuseadas. Ainda de acordo a OPAS, os danos causados pela intoxicação por agrotóxicos variam muito, dessa forma, envolvem fatores que vão desde as características químicas dos produtos, passando pelas próprias características da pessoa exposta até as condições de exposição. No mesmo sentido, Schafer *et al.* (1999) afirmam que os efeitos subagudos causados pela utilização dos agrotóxicos, mesmo sendo difíceis de identificar, às vezes podem ser constatados e tratados apropriadamente. Não obstante, se é difícil diagnosticar os efeitos subagudos, os efeitos em longo prazo, causados pela intoxicação crônica, são

muito mais complexos para diagnosticar com precisão, uma vez que tais intoxicações estão relacionadas a problemas como surgimento de câncer, defeitos de nascimento, danos ao sistema nervoso, etc., que podem se desenvolver após 15 ou até 30 anos decorridos da exposição aos produtos. Além disso, o estabelecimento de doses fatais para seres humanos é seguido de uma identificação dos níveis de toxicidade de cada produto. Schafer *et al.* indicam ainda que o trabalho na agricultura pode ser considerado uma modalidade de alta periculosidade, bastando analisar o exemplo dos Estados Unidos, onde a taxa de mortalidade entre os trabalhadores agrícolas em 1996 foi maior do que a dos trabalhadores das indústrias. No Brasil, todo produto deve apresentar nos seus rótulos uma faixa colorida indicativa de sua classe toxicológica (OPAS, 1996). No que se refere à classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental, as tipologias existentes se baseiam em uma série de parâmetros que incluem: a taxa de bioacumulação, a persistência no meio ambiente, o tipo de transporte, o nível de toxicidade para diversos organismos e os potenciais mutagênico, teratogênico e carcinogênico. Wilson & Tisdell (2001) afirmam que a presença de agrotóxicos no meio ambiente afeta grande número organismos vivos e não simplesmente as pragas agrícolas. Além disso, outras interferências ambientais provocadas pela ação dos agrotóxicos incluem: a quebra da matéria orgânica, a interferência na respiração dos solos, a contaminação de recursos hídricos e o desequilíbrio biológico entre presas e predadores. Cabe ressaltar ainda que Langenbach (1999) indica que as estatísticas têm mostrado que, apesar do uso dos agrotóxicos, o número de pragas nas lavouras está aumentando, isso porque as mesmas estão desenvolvendo mecanismos de resistência aos produtos. Wilson & Tisdell (2001) explicam esse fato argumentando que, se os agrotóxicos contribuem para a redução das pragas e para o aumento da produção agrícola num primeiro momento, com o passar do tempo, as pragas passam a desenvolver resistências aos mesmos e, com isso, causam um efeito “esteira”, em que para combater essas pragas as aplicações dos produtos são aumentadas sem que seja alcançada sua eliminação, acarretando aumento na utilização de agrotóxicos até um ponto em que a utilização desses produtos se torna economicamente inviável.

## MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo do presente trabalho foi o Assentamento Zumbi dos Palmares que se localiza entre as coordenadas 21°32' e 21°45'S e 41°11' e 41°16'W, englobando território dentro dos municípios de Campos dos Goytacazes e São Francisco do Itabapoana (Figura 1).

O Assentamento Zumbi dos Palmares foi resultado da ocupação organizada pelo MST em 12 de abril de 1997 no complexo de terras da Usina São João, que havia entrado em processo falimentar alguns anos antes. A área de aproximadamente 8.500 ha, que havia sido usada historicamente para o plantio de cana e para a prática da pecuária, foi dividida em cinco núcleos após o seu parcelamento em lotes individuais. A coleta de dados para esta pesquisa foi feita através de um questionário projetado especificamente para este estudo. O questionário visava a obter informações sobre as características demográficas e socioeconômicas, os principais sistemas agrícolas que estão sendo adotados, a utilização de equipamentos de proteção por parte dos agricultores assentados, os tipos de agrotóxicos utilizados e seus níveis de toxicidade e as evidências dos problemas de saúde causados pela manipulação dos agrotóxicos. Os questionários foram aplicados a cem famílias entre julho de 2003 e janeiro de 2004, que foram selecionadas aleatoriamente, sendo os questionários respondidos voluntariamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população estudada é composta majoritariamente por pessoas adultas, ainda que o grupo etário com maior número de indivíduos seja o de 0 a 8 anos. Além disso, os dados mostram que a aplicação de agrotóxicos é basicamente exercida por adultos. Por outro lado, no que concerne ao nível de escolaridade dos assentados, 60% da população estudada cursou apenas os primeiros quatro anos escolares. Os dados coletados indicam ainda que 46% dos agricultores estudados fazem uso dos agrotóxicos em seus sistemas agrícolas, sendo esta uma quantia significativa que reflete a intensidade dessa prática

no assentamento. Além disso, entre os 54% dos entrevistados que não utilizam agrotóxicos, muitos declararam que só não fazem uso dos produtos porque ainda não têm condições financeiras para adquiri-los, mas que pretendiam utilizá-los no futuro caso acumulassem o capital necessário para tanto. No tocante à mão-de-obra utilizada na aplicação de agrotóxicos, apenas 20% dos assentados contratam mão-de-obra para realizar a tarefa, ao passo que os outros 80% dependem da mão-de-obra familiar para realizar as atividades relacionadas ao manuseio e utilização dos produtos e para o descarte de vasilhames. Por outro lado, quando perguntados sobre por que utilizam agrotóxicos em seus sistemas agrícolas, a maioria dos assentados afirmou que o motivo principal seria a diminuição do tempo de trabalho. Assim sendo, os assentados utilizam ampla gama de produtos para cuidar da erradicação de ervas e pragas, sem a exigência de trabalho braçal. Após identificarmos a incidência do uso de agrotóxicos pelos agricultores assentados foi feito um levantamento acerca das culturas agrícolas em que os mesmos estavam sendo utilizados. A partir dos dados obtidos foi possível constatar que nas lavouras de abacaxi os agrotóxicos são utilizados de forma mais intensa, ainda que o uso destas substâncias esteja presente num número maior de culturas que incluem o milho, abóbora, coco, maracujá, aipim, diversos tipos de cítricos e a cana-de-açúcar. A quantidade de culturas em que os agrotóxicos são utilizados demonstra que estes produtos se tornaram uma peça-chave para os assentados. Por outro lado, a relação entre os plantios de abacaxi e a intensa utilização de agrotóxicos ficou demonstrada no Assentamento Zumbi dos Palmares, pois está concentrada entre nos núcleos IV e V, cujos sistemas agrícolas incluem extensas áreas de maracujá e abacaxi.

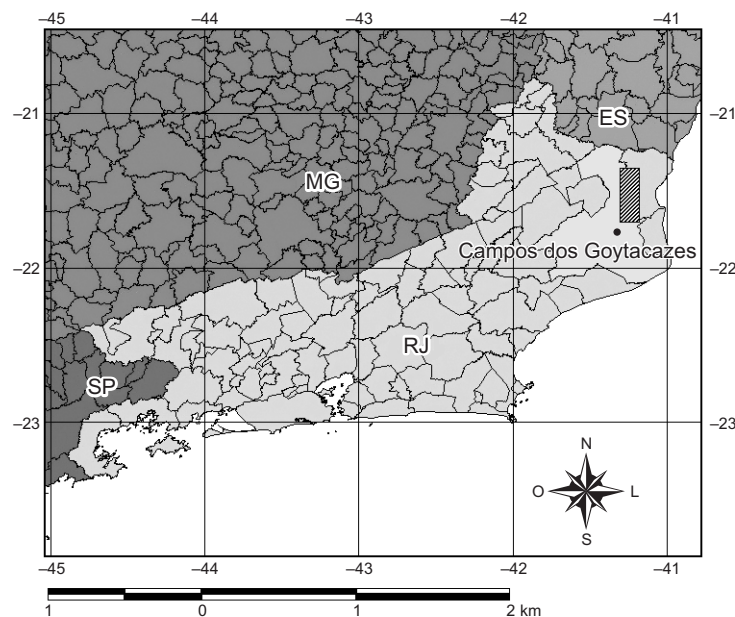


Figura 1 — Localização do Assentamento Zumbi dos Palmares.

Além de identificar quais produtos são utilizados, também foram identificadas as informações quanto à sua função, a praga a ser combatida e as culturas em que estavam sendo aspergidos. Os resultados demonstram, no que se refere às funções, que no Zumbi dos Palmares são utilizados uma série de produtos diferentes, incluindo os de combate a ervas daninhas, fungos e insetos e também os usados para acelerar o crescimento (Tabela 1).

O abacaxi foi a cultura que mais recebeu a aplicação de diversos tipos de agrotóxicos, o que evidencia não só sua dependência em relação ao uso de substâncias químicas, como também que foi a cultura com a qual os assentados demonstraram maior expectativa de retorno financeiro. Contudo, além da classificação entre as funções dos agrotóxicos encontrados, separamos os produtos levando em conta sua classificação toxicológica humana e ambiental. Neste aspecto, dentre os agrotóxicos encontrados no assentamento há prevalência de produtos situados na faixa III (moderadamente tóxico) no que se refere à toxicidade humana (toxicidade crônica) e da faixa II (produtos muito perigosos no que se refere à toxicidade ambiental) (Tabela 2).

Embora haja separação entre toxicidade humana e ambiental, pois a primeira está relacionada diretamente a testes dos produtos com organismos vivos, a contaminação ambiental pode se refletir em longo prazo na saúde humana. A contaminação indireta do meio ambiente através da atmosfera, solo e principalmente água modifica o cenário de toxicidade, uma vez que os compostos chegam até a população por outras vias, que não apenas a de aplicação do produto. No caso dos assentados verificou-se que a maior parte deles utiliza água de poços artesianos de baixa profundidade e muito próximos às áreas onde as culturas são plantadas. Além disso, foi observado que as embalagens desses produtos estão sendo descartadas de forma inadequada, o que poderá agravar a contaminação do solo e dos recursos hídricos do assentamento. Embora o número de produtos no local de estudo seja grande, a maior parte pertence ao grupo dos organofosforados (Folidol e Tamaron, usados nas lavouras de abacaxi e maracujá, pertencem a este grupo), sendo que muitos deles apresentam o mesmo ingrediente ativo em sua composição. Os produtos Bravik, Folisuper e Folidol são diferentes formulações da parationa metílica, e são classificados com grau de toxicidade humana I e II e ambiental II, dependendo da concentração em sua formulação. Os organofosforados são os pesticidas responsáveis pelo maior número de intoxicações e mortes no País. Sua ação no organismo se dá pela inibição de enzimas colinesterases, principalmente a acetilcolinesterase, levando a um acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas e desencadeando uma série de efeitos parassimpaticomiméticos (OPAS, 1996).

Outro fator de risco advém da presença desses produtos no Assentamento Zumbi dos Palmares, que é agravado pelo baixo nível de escolaridade dos assentados, com o conseqüente impacto sobre a habilidade dos assentados em manuseá-los de forma segura. Neste estudo foi constatada a incapacidade da maioria dos assentados em entender o significado dos

rótulos colocados nos vasilhames dos agrotóxicos, incluindo-se informações sobre dosagens apropriadas, toxicidade dos produtos e a maneira correta de realizar o seu uso. Além disso, cerca de 80% dos assentados declararam nunca ter participado de cursos ou treinamento para o manuseio e utilização de agrotóxicos, tendo iniciado o uso dos produtos de forma artesanal a partir do contato com vizinhos e parentes. Como fator agravante, a maioria dos assentados declarou desconhecer as leis que controlam o manuseio e uso de agrotóxicos, tendo grande facilidade em adquirir agrotóxicos nas lojas de artefatos agrícolas, sem seguir o que manda a lei que regula a sua comercialização. Num aspecto particularmente importante para a elevação dos riscos para os assentados, a maioria dos entrevistados acredita que somente o consumo das frutas, legumes e verduras cultivadas com o auxílio de agrotóxicos pode causar danos à saúde humana, e por isso cultivam alimentos sem a utilização dos produtos para consumo próprio. Entretanto, no que se refere ao uso de equipamentos de proteção para o manuseio e aplicação de agrotóxicos, muitos agricultores não utilizam equipamentos de segurança básicos como luvas, botas e máscara. Finalmente, no quesito auto-identificação dos sintomas causados em virtude da utilização dos agrotóxicos, 29% dos assentados afirmaram ter algum sintoma que pode ser relacionado ao uso de agrotóxicos, porém, isso pode ser uma subestimativa, porque a maioria dos sintomas provocados pela exposição a esses produtos (por exemplo, dor de cabeça, tontura, náusea) pode ser atribuída a uma grande variedade de causas.

## CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho indicam que a adoção de agrotóxicos é significativa dentro de uma população que até recentemente se caracterizava pelo desenvolvimento de sistemas agrícolas com baixo nível de aplicação de insumos agrícolas. Nossos resultados indicam ainda que os agrotóxicos estão sendo utilizados primariamente para diminuir a carga de trabalho dos assentados no controle de ervas daninhas e pragas agrícolas. Por outro lado, este estudo detectou que a incorporação de agrotóxicos nos sistemas agrícolas não está sendo acompanhada pelo correto treinamento dos assentados no que se refere ao manuseio e utilização dos agrotóxicos, bem como no descarte de vasilhames. Além disso, o não cumprimento da legislação que controla a comercialização desses produtos implica acesso descontrolado aos mesmos. Essa situação implica a possibilidade de risco tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente, pois entre os produtos utilizados encontra-se um número significativo de substâncias com alta toxicidade. Em função dos resultados encontrados fica evidente a necessidade de um processo educativo entre os assentados acerca dos riscos envolvidos pela não utilização correta dos produtos e de um trabalho de mapeamento da contaminação ambiental nos corpos de água próximos às culturas agrícolas.

**Tabela 1** — Agrotóxicos encontrados e suas funções.

	<b>Tipo de praga</b>	<b>Produto</b>	<b>Cultura aspergida</b>
Espalhante adesivo	Ervas daninhas	Herbitensil	Abacaxi
Fungicida	Brocas e fungos	Benlate, Bravic 600, Cercobin, Folicur, Folidol Folisuper e Orthocide 500	Abacaxi, abóbora e cítricos
Herbicida	Ervas daninhas	DMA 806 BR, Gesapax Glifosato (Roundup), Karmex Krovar, Padron, Tordon, Velpar	Abacaxi, cana-de-açúcar, cítricos e pastagem
Inseticida	Brocas, lagartas, formigas e insetos em geral	Decis 25 CE, Dipterex, Expurgran, Lebaycid Nor-trin, Tamaron BR, Trigard	Abacaxi, abóbora, aipim, coco, feijão, maracujá
Inseticida/Acaricida	Lagartas, ácaros	Hostation	Cítricos, milho
Regulador de crescimento	—	Ethrel	Abacaxi

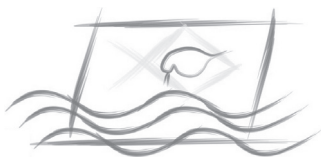
**Tabela 2** — Classificação toxicológica humana e ambiental dos produtos utilizados no Assentamento Zumbi dos Palmares.

<b>Produto</b>	<b>Toxicidade humana<sup>1</sup></b>	<b>Toxicidade ambiental<sup>1</sup></b>
Benlate	—	—
Bravic 600	I	*
Cercobin	IV	II
Folicur	III	II
Folidol	II	II
Folisuper	I	*
Herbitensil	IV	*
Orthocide 500	III	*
2,4 D	I	III
DMA 806 BR	I	*
Gesapax	IV	II
Glifosato, Roundup	IV	III
Karmex	III	II
Krovar	III	II
Padron	III	II
Tordon	I	*
Velpar	III	*
Decis 25 CE	III	I
Dipterex	II	III
Ethrel	III	III
Expurgran	III	III
Hostation	I	II
Lebaycid	II	II
Tamaron BR	II	II
Trigard	IV	III

\*Sem classificação definida, 1. quanto maior o número na classificação, menor o risco associado.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAIM, A., 1999, *O passado e o presente da tecnologia de aplicação de agrotóxicos*. Disponível em: [http://www.radiobras.gov.br/ct/artigos/1999/artigo\\_011099.htm](http://www.radiobras.gov.br/ct/artigos/1999/artigo_011099.htm).
- ECOBICHÓN, D. J., 2001, Pesticide use in developing countries. *Toxicol.*, 160: 27-33.
- LANGENBACH, T., 1999, Na lógica do controle de Agrotóxicos. *Rev. Ciência Hoje*, 25: 62-64.
- NUNES, M. V. & TAJARA, E. H., 1998, Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. *Rev. de Saúde Publ.*, 32: 372-383.
- OPAS, 1996, *Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos*. Organização Pan-Americana da Saúde, Brasília, 69p.
- SCHAFER, K., REEVES, M. & KATTEN, A., 1999, *Campos envenenados, los trabajadores agrícolas y los Pesticidas en California*. 54p. Disponível em: <http://www.panna.org>.
- WAICHMAN, A., NINA, N. E. & RÖMBKE, J., 2003, Agrotóxicos: elemento novo na Amazônia. *Rev. Ciência Hoje*, 32: 70-73.
- WILSON, C. & TISDELL, C., 2001, Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs? *Ecol. Econ.*, 39: 449-462.
- WORLD RESOURCES INSTITUTE, 1998, *World Resources, 1998/1999*. Oxford University Press, p. 384.



SETAC – Brazil

## Como o Produtor Rural Usa Agrotóxicos

L. M. SCATENA<sup>1\*</sup> & R. DE G. DUARTE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense, 400, C.P. 359, CEP 13560-970, São Carlos, SP

<sup>2</sup>Profa. Dra. da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense, 400, C.P. 359, CEP 13.560-970, São Carlos, SP, Consultora do IDEMA.

### RESUMO

A proposta deste trabalho foi, após levantar informações sobre o uso de agrotóxicos por produtores rurais, elaborar material didático em educação ambiental, em linguagem técnica apropriada ao público-alvo, com o objetivo de prover o produtor rural de conhecimentos necessários à melhoria de sua qualidade de vida. Para caracterizar o perfil da comunidade e melhor entender o posicionamento do pequeno agricultor quanto ao uso e ocupação do solo, sistema de produção e estrutura fundiária, foram levantadas informações em órgãos federais, estaduais e municipais. O estudo foi realizado na microbacia do Córrego da Capituva, município de Macedônia, SP, cuja característica marcante é a existência de pequenas propriedades rurais (sítios de 1 a 10 ha, representando 36%, e de 10 a 50 ha, 47%) que, basicamente, utilizam mão-de-obra familiar (69% apenas mão-de-obra familiar e 22% mão-de-obra familiar e diaristas). O perfil de produção está 67% baseado na pecuária de corte e leite e 16%, em citros. Os agrotóxicos são assim usados pelos agricultores: 76% fazem uso de produtos agrotóxicos; 82% nunca utilizaram equipamentos de proteção individual na preparação das calda; 83% nunca utilizaram equipamentos de proteção para aplicações dos produtos; 5% raramente observam o período de reentrada nas áreas de aplicação dos agrotóxicos; 8% usualmente abastecem o equipamento de pulverização em cursos de água; 5%, de alguma forma, freqüentemente reutilizam as embalagens vazias desses produtos; 54% seguem orientação técnica no momento da compra; 35% buscam orientação de outras pessoas; e 11% fazem a seu próprio modo. Nas palestras com produtores rurais para aplicação do material didático, ficou patente que o atual modelo econômico justifica o uso de agrotóxicos pela necessidade de uma *agricultura produtiva*, capaz de atender à demanda mundial por alimentos e garantir sua própria sobrevivência econômica. O agricultor acredita, também, que *o agrotóxico prejudica apenas a saúde de quem não está acostumado*.

*Palavras-chave:* educação ambiental, agrotóxicos, produtor rural.

### ABSTRACT

#### How rural producers use pesticides

The objective of this work was elaborate instructive material in environmental education for rural producers, in appropriate technical language to the public-objective. To characterize the community's profile and best to understand the small farmer's positioning as for the use and occupation of the soil and production system were lifted up information in public organs. The study was accomplished in the Capituva watershed, Macedônia/SP, Brazil. The watershed's characteristic is the existence of small rural properties (1 to 10 ha, representing 36% and 10 to 50 ha, 47%) that, basically, use family labor (69% just family labor and 22% family labor and diarists). The production is 67% base on the cut livestock and milk, and 16% in citros. The pesticides are used like: 76% make use pesticides products; 82% never used equipments for individual protection in the preparation of the syrups; 83% never used protection equipments for applications of the products; 5% rarely observe the period of having rendered in the areas; 8% usually supply the pulverization equipment in courses of water; 5%, in some way, frequently reuse the empty packing of those products; 54% follow technical ori-

\*Corresponding author: Lúcia Marina Scatena, e-mail: lmscatena@uol.com.br.

entation to buy; 35% look for other people's orientation; and 11% make in their own way. In the lectures with rural producers was patent that the economical model justifies the use of pesticides, capable to assist to the work demand for foods and to guarantee own economical survival. *The farmer believes, also, that the pesticide just harms the health of who is not familiar with.*

*Key words:* environmental education, rural producers, pesticides.

## INTRODUÇÃO

O elevado uso de agrotóxicos, sem os cuidados necessários, tem contribuído para a degradação ambiental e o aumento das intoxicações ocupacionais.

Os agrotóxicos começaram a ser usados em escala mundial após a Segunda Guerra Mundial. Os países que tinham a agricultura como principal base de sustentação econômica – África, Ásia e América Latina – sofreram fortes pressões de organismos financiadores internacionais para adquirir essas substâncias químicas. A alegação era de que os agrotóxicos garantiriam a produção de alimentos para combater a fome. Com o inofensivo nome de “defensivos agrícolas” foram incluídos, compulsoriamente, junto com adubos e fertilizantes químicos. Sua utilização na agricultura nacional em larga escala ocorreu a partir da década de 1970.

Hoje, segundo Ambrosano (1999), o problema da fome no mundo não se trata de uma questão tecnológica; resulta, sobretudo, da má distribuição de recursos e conhecimento.

Atualmente, o uso descontrolado, a não utilização de equipamentos de proteção e o pouco conhecimento dos riscos são alguns dos responsáveis pela intoxicação dos trabalhadores rurais. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as intoxicações agudas por agrotóxicos são da ordem de 3 milhões anuais, com 2,1 milhões de casos somente nos países em desenvolvimento.

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em agosto de 2004, divulgou o relatório de indicadores de Desenvolvimento Sustentável, no qual revela que o uso de agrotóxico no Brasil aumentou de 2,3 kg/ha para 2,8 kg/ha, uma elevação de 22%. O Brasil está entre os maiores usuários do produto, perdendo apenas para a Holanda, Bélgica, Itália, Grécia, Alemanha, França e Reino Unido, segundo dados do Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas (Sindag).

No Brasil, estima-se que morrem 5.000 trabalhadores/ano vítimas de agrotóxicos. Grande parte dessas mortes poderia ser evitada se houvesse uso de equipamentos de proteção individual – EPI (luvas, máscara, óculos de proteção, avental, outras vestimentas de proteção, botas e chapéu) por parte dos agricultores que manuseiam o produto.

A proposta deste trabalho foi, após levantar informações sobre o uso de agrotóxicos por produtores rurais, elaborar material didático em educação ambiental, em linguagem técnica apropriada ao público-alvo, com objetivo de prover o produtor rural de conhecimentos necessários à melhoria de sua qualidade de vida.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para caracterizar o perfil da comunidade e melhor entender o posicionamento do pequeno agricultor quanto ao uso e ocupação do solo, sistema de produção – incluindo o uso de agrotóxicos – e estrutura fundiária, foram levantadas informações em órgãos federais, estaduais e municipais. O estudo foi realizado na microbacia do Córrego da Capituvá, município de Macedônia, SP, cuja característica marcante é a existência de pequenas propriedades rurais (sítios de 1 a 10 ha, representando 36%, e de 10 a 50 ha, 47%) que, basicamente, utilizam mão-de-obra familiar (69% apenas mão-de-obra familiar e 22% mão-de-obra familiar e diaristas) (CATI, 1997).

Para conscientizar o produtor rural da importância do uso correto dos agrotóxicos e os riscos para a saúde do homem e do meio ambiente, foi proposto um ciclo de palestras que abordaram os seguintes temas:

- Para que servem os agrotóxicos;
- Classe toxicológica;
- Como manipular, misturar e aplicar;
- Transporte, armazenamento e descarte de embalagens;
- Conseqüências do uso de agrotóxicos para a saúde do homem e do meio ambiente; e
- Cultivo sem agrotóxicos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil de produção está 67% baseado na pecuária de corte e leite e 16% em citros. Os agrotóxicos são assim usados pelos agricultores: 76% fazem uso de produtos agrotóxicos; 82% nunca utilizaram equipamentos de proteção individual na preparação das caldas; 83% nunca utilizaram equipamentos de proteção para aplicações dos produtos; 5% raramente observam

o período de reentrada nas áreas de aplicação dos agrotóxicos; 8% usualmente abastecem o equipamento de pulverização em cursos de água; 5%, de alguma forma, freqüentemente reutilizam as embalagens vazias desses produtos; 54% seguem orientação técnica no momento da compra; 35% buscam orientação de outras pessoas; e 11% fazem a seu próprio modo.

Os valores obtidos confirmam o descaso e o despreparo do produtor rural em relação ao uso de equipamentos de proteção durante o preparo e aplicação dos defensivos agrícolas. E também corroboram o grande uso desses produtos, na microbacia de estudo, com dados que coincidem com as estatísticas nacionais. Durante as palestras pôde-se perceber que alguns produtores acreditam ser desnecessário o uso de EPIs. Acreditam, também, que *o agrotóxico prejudica apenas a saúde de quem não está acostumado. “Depois de aplicar é só tomar leite.” “Alguns acham que isto é coisa para homem, mulher não agüenta.” “E a maioria acredita que plantar sem agrotóxico é certeza de perda total da lavoura.”*

Para alguns produtores, a leitura do rótulo dos produtos e da receita fornecida pelo técnico é desnecessária devido ao fato de eles já conhecerem o produto há bastante tempo.

De acordo com Peres *et al.* (2001), em entrevistas com trabalhadores rurais, verificaram que para eles não existem alternativas ao uso de agrotóxicos na lavoura (“se não usar, não colhe”), afirmação determinista controlada pela indústria química por seus diversos meios de comunicação.

Ainda, segundo o mesmo autor, nos discursos de profissionais que atuam no campo, foi observada a reprodução dos mandamentos do capital industrial internacional, como forma de justificar (ou legitimar) as práticas de uso de agrotóxicos. Alguns pontos que foram observados no conteúdo dos discursos:

- legitimação de práticas agrícolas “intensivas” (leiam-se químicas, científicas) pela demanda de alimentos de uma população que cresce “incessantemente”;
- necessidade de uma agricultura que não interfira no ambiente. O discurso é paradoxal, pois pressupõe que preservar o ambiente é tão-somente proteger as florestas, evitar que elas virem áreas disponíveis à agricultura e esquecer o impacto ambiental causado pelos próprios agrotóxicos, cujo uso esse discurso estimula. Nesse sentido, não parece verossímil o interesse ambiental dessas indústrias; talvez seja uma forma de sustentar a própria imagem, apoiando-se no grande interesse da população mundial pelas questões ambientais nas duas últimas décadas;
- responsabilidade imputada à população, de modo geral, de garantir o alimento para as gerações futuras.

Segundo Romeiro (1998), o atual padrão tecnológico resulta da convergência de diversas trajetórias tecnológicas e envolve diferentes setores industriais. Essas trajetórias evoluíram em resposta a um quadro complexo de incentivos e restrições, em um processo constante de ajustes que lhes

conferem importantes ganhos de eficiência: economias de escala, de localização, de aprendizado na produção e no uso de novas tecnologias, etc. As novas demandas de uma agricultura equilibrada ecologicamente teriam, portanto, forte impacto no complexo agroindustrial a montante caso se generalizasse a substituição de fertilizantes químicos de alta solubilidade por fertilizantes orgânicos e por fertilizantes químicos de baixa solubilidade (fosfatos naturais, nitrogênio atmosférico fixado por bactérias, etc.); a redução do consumo de defensivos químicos e/ou substituição por defensivos biológicos e outras alternativas; e a mudança radical nos tipos de equipamentos para o trabalho de solo, nas regiões tropicais, com a substituição da aração pelo plantio direto.

Porém, uma transição desse tipo tem custos, os quais não podem simplesmente recair sobre os produtores. É importante ressaltar que boa parte dos impactos ambientais provocados pelas atuais práticas agrícolas não atinge diretamente os custos de produção, seja porque seus efeitos são de longo prazo (como, por exemplo, os efeitos cumulativos da contaminação química dos solos), seja porque estes são mascarados por outros fatores (por exemplo, os efeitos sobre a saúde humana da contaminação dos alimentos por resíduos de praguicidas). O Estado, por meio da política agrícola, tem condições de começar a induzir essas mudanças, propiciando incentivos econômicos, reorientando os serviços de pesquisa e extensão rural, etc. Esses custos teriam, obviamente, de ser aceitos pela sociedade. O problema se situa justamente no fato de a opinião pública não ter, ainda, clara consciência da necessidade e da viabilidade dessa mudança.

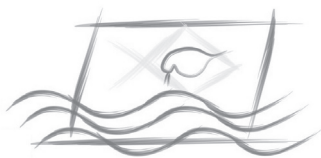
Branco (2002) sugere uma “mudança” moral da sociedade devido à necessidade de uma tomada de consciência por parte desta, que pode ocorrer por meio de um processo de conhecimento intelectual progressivo que ofereça, “aos membros da sociedade atual, dados sobre a situação e as projeções sobre a degradação do ambiente, refletindo a situação real, e uma abordagem teórico-conceitual sobre as causas, as necessidades de mudanças no comportamento social em função desse problema e a natureza das soluções preventivas e corretivas cabíveis. Uma vez que parte da sociedade adquira a convicção da necessidade dessas abordagens, ela passará a exercer pressão sobre os órgãos oficiais e as forças vivas da sociedade, no sentido de que sejam providenciadas as medidas legais, bem como sua divulgação nos principais meios causadores dos impactos ambientais”.

Essas novas convicções têm de ser inculcadas por meio de um processo de divulgação na forma de Educação Ambiental para, somente então, serem naturalmente admitidas como preceitos fundamentais ao seu comportamento social.

Desse modo, acreditamos ter contribuído para alertar e informar o produtor rural dos cuidados necessários com o uso de agrotóxicos e difundir a existência de novas tecnologias que utilizam menores quantidades de agrotóxicos. Ainda, estimular o produtor rural a buscar, em órgãos oficiais, responsáveis pela extensão rural, informações sobre agrotóxicos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROSANO, E. (coord.), 1999, *Agricultura ecológica*. Livraria e Editora Agropecuária Ltda, Guaíba, RS, 398p.
- BRANCO, S. M., 2002, *Meio ambiente: uma questão de moral*. Editora OAK, São Paulo, 223p.
- COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL – CATI, 1997, Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Governo do Estado de São Paulo. Programa Estadual de Microbacias Hidrográficas. São Paulo.
- PERES, F. *et al.*, 2001, Comunicação relacionada ao uso de agrotóxicos em região agrícola do Estado do Rio de Janeiro. *Rev Saúde Pública*, 35(6): 564-570.
- ROMEIRO, A. R., 1998, *Meio ambiente e dinâmica de inovações na agricultura*. Editora Annablume; FAPESP, São Paulo, SP, 277p.



SETAC – Brazil

## Avaliação do Teor de Chumbo em Mexilhões da Espécie *Perna perna* na Região Metropolitana da Cidade do Rio de Janeiro

C. B. MAIA,<sup>1\*</sup> A. C. M. ALMEIDA<sup>2</sup> & F. R. MOREIRA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>UFRJ/IQ/Departamento de Química Analítica, Cidade Universitária,  
CT, Bloco A, sala 507, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, RJ

<sup>2</sup>PUC-Rio/Departamento de Química, Rua Marquês de São Vicente, 225, Gávea, CEP 22453-900, Rio de Janeiro, RJ

<sup>3</sup>Fundação Oswaldo Cruz/ENSP/CESTEHLaboratório de Toxicologia,  
Rua Leopoldo Bulhões, 1480, Manguinhos, CEP 21041-210, Rio de Janeiro, RJ

### RESUMO

Os efluentes da cidade do Rio de Janeiro são lançados normalmente sem tratamento no ambiente costeiro. A Baía de Guanabara é a principal receptora dos rejeitos que atingem e poluem as praias interiores da zona metropolitana da cidade. Os moluscos bivalves têm grande capacidade de concentrar certos poluentes em seus organismos, a partir de soluções muito diluídas, sem a ocorrência de efeitos adversos visíveis. O mexilhão é um bioacumulador de metais, considerado como indicador de poluição do ambiente em que vive. Natural da região, a espécie *Perna perna*, por ser acessível e resistente, é utilizada na dieta da população de baixa renda e de rua. O chumbo é um contaminante comum no ambiente devido às inúmeras atividades industriais. É considerado tóxico para homens e animais e sem nenhuma função fisiológica no organismo. Seus efeitos nocivos afetam praticamente todos os órgãos e sistemas do organismo. Neste trabalho determinou-se por espectrometria de absorção atômica eletrotérmica a concentração de chumbo em mexilhões *Perna perna* coletados nas praias do Flamengo, Vermelha e Vidigal, localizadas na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro. A concentração média de chumbo encontrada ( $2,0 \pm 0,93$  mg.kg<sup>-1</sup>) é quase dez vezes superior àquela do mexilhão não exposto, analisado como grupo controle e proveniente de Penha (SC). Este valor encontra-se no limite máximo permitido pela Legislação Brasileira para consumo de pescado (2,0 mg.kg<sup>-1</sup>), representando um risco à população, principalmente se o seu uso na dieta se der de forma continuada.

**Palavras-chave:** mexilhão *Perna perna*, chumbo, bioacumulação, riscos da exposição, espectrometria de absorção atômica eletrotérmica.

### ABSTRACT

#### Assessment of the lead content in *Perna perna* mussels in the Metropolitan Region of the Rio de Janeiro City

Guanabara Bay is the most important estuarine system in Rio de Janeiro City and receives the most untreated effluents of the city. As a consequence of this impact the beaches in the metropolitan zone are heavily polluted. Bivalves mollusks are able to store a wide variety of pollutants from very diluted solutions without visible damage. The *Perna perna* mussel is a bivalve organism that accumulates metal and thus it is considered an environmental pollution indicator. Native from the region, this species is consumed in the diet by poor people since it is easily available. Lead is one of the most common pollutants in the environment. It is considered toxic to human beings and animals and without any physiological known function in the organism. Lead toxic effects can affect almost all organs and systems of the body. In this work electrothermal atomic absorption spectrometry was used to determine lead concentration in *Perna perna* mussels collected at Flamengo, Vermelha and Vidigal beaches located in the metropolitan region of the Rio de Janeiro City. The mean lead concentration found was ( $2.0 \pm 0.93$  mg.kg<sup>-1</sup>) almost 10 times greater than that found for non exposed mussel, used as the control group from Penha (SC). This value is the upper limit allowed by the Brazilian legislation (2.0 mg.kg<sup>-1</sup>), meaning a risk to those people with a rich diet in mussels.

**Key words:** *Perna perna* mussel, lead, bioaccumulation, exposure risks, electrothermal atomic absorption spectrometry.

\* Corresponding author: Cristina Baptista Maia, e-mail: cbmaia@iq.ufrj.br.

## INTRODUÇÃO

Os estuários e as regiões costeiras são muito utilizados para a disposição de efluentes urbanos e industriais, acarretando a contaminação das águas e da vida marinha por diversos poluentes. Pode-se verificar, mundialmente, aumento nos níveis desses contaminantes, e essa constatação tem levado à formulação de estratégias para diminuir o impacto causado nesses ecossistemas que sustentam a maior parte da biodiversidade marinha, os principais recursos pesqueiros e as reservas energéticas mundiais. Do ponto de vista da saúde, o grau de contaminação desses ecossistemas pode colocar em risco a saúde das populações ribeirinhas que utilizam essas águas tanto para a pesca quanto para o lazer.

Situada no Estado do Rio de Janeiro, a Baía de Guanabara é a segunda maior baía brasileira em extensão, com uma área superficial de cerca de 377 km<sup>2</sup>, perímetro de 131 km e volume total de água de 2,2 milhões de m<sup>3</sup>, apresentando ocupação desordenada de seu entorno, que tem comprometido gravemente o seu ecossistema. A população situada em suas margens concentra-se principalmente nas cidades do Rio de Janeiro e Niterói, com cerca de 11 milhões de habitantes localizados na sua área metropolitana (JICA, 1994; FEEMA, 1998).

A contribuição de esgotos e efluentes industriais, suas principais fontes de poluição, é enorme, e o grau de tratamento é extremamente deficiente. Às suas margens está situado o 2º maior parque industrial do País, que contribui diariamente com óleo, fenóis, metais pesados e outros poluentes tóxicos, além do chorume proveniente de vários vazadouros de lixo (FEEMA, 1991; Amador, 1997).

Apesar da diminuição de sua lâmina d'água, o que evidencia a ação antrópica, a Baía de Guanabara apresenta circulação efetiva devido às fortes correntes que são determinadas pelo regime de marés e que promovem a renovação rápida de suas águas pela entrada de água oceânica (Amador, 1997). Isso possibilita que a vida marinha ainda resista, principalmente nas áreas mais próximas à sua barra. A atividade pesqueira e marisqueira, em especial a extração do mexilhão da espécie *Perna perna*, é exercida tanto para comercialização como para consumo pela população ribeirinha, principalmente desempregados e aposentados com baixa remuneração, e pela população de rua.

O mexilhão é um alimento muito nutritivo devido aos seus altos teores protéico e vitamínico. Sua fonte protéica é de excelente qualidade nutritiva, superando a de muitas espécies marinhas, o que o torna excelente alternativa alimentar. Portanto, o aproveitamento desses moluscos como fonte alternativa de alimento torna-se uma atividade importante, tendo em vista a carência de proteína animal na alimentação da população mais pobre em qualquer grande cidade do mundo.

Os mexilhões são organismos filtradores e sua capacidade de bioacumulação de metais pesados entre outras substâncias é bem conhecida e descrita na literatura (Ravera & Riccardi, 1997). Além disso, por serem bentônicos e resistentes a

variações nos fatores abióticos, como temperatura e salinidade, podem ser usados como indicador biológico de poluição e de transferência da mesma ao longo da cadeia trófica, em dada região. Vários programas mundiais utilizam bivalves nativos para monitorar áreas impactadas e também para avaliar ações de melhorias ambientais, como é o caso do Programa Mussel Watch (Farrington et al., 1983; O'Connor, 1998).

A espécie *Perna perna*, conhecida vulgarmente como mexilhão, foi escolhida para este estudo por ser nativa da região, visto que sua ocorrência estende-se do Espírito Santo ao sul do Rio Grande do Sul, ser resistente, de fácil acesso e, portanto, consumida pela população. Sua principal fonte de alimentação compreende os detritos orgânicos e o nanoplâncton trazidos pela água, sendo capazes de bombear entre 0,5 e 4 litros de água por hora, o que varia com o tamanho do exemplar e as condições ambientais. A escolha do chumbo deve-se ao fato de esse metal ser um contaminante comum no ambiente, considerado tóxico para homens e animais e sem nenhuma função fisiológica no organismo. As inúmeras atividades industriais favorecem sua ampla distribuição, inclusive em plantas e animais que servem de alimento às pessoas. Seus efeitos nocivos afetam praticamente todos os órgãos e sistemas do organismo.

O objetivo deste trabalho é avaliar os riscos da exposição ao chumbo associados à utilização de mexilhões *Perna perna* pela população em geral, por meio da determinação da concentração do metal no tecido mole por espectrometria de absorção atômica eletrotérmica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Instrumental

- forno de microondas OI Analytical;
- espectrômetro de absorção atômica 5100 com correção de fundo com efeito Zeeman (Perkin Elmer);
- HGA 600 e AS 60 (Perkin Elmer);
- lâmpada de cátodo oco de Pb ( $\lambda = 283,3$  nm, 10 mA) (Perkin Elmer);
- tubos de grafite recobertos piroliticamente com plataformas de grafite pirolítico (Perkin Elmer).

### Reagentes

- grau analítico; água Milli-Q (Millipore);
- solução estoque de 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Pb (Merck);
- HNO<sub>3</sub> 65% (Merck);
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% (Merck);
- Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 10 g.L<sup>-1</sup> (Merck);
- Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 10 g.L<sup>-1</sup> (Merck).

### Amostragem

Os mexilhões foram coletados no período de um ano em duas amostragens realizadas na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro, em locais de fácil acesso e normalmente utilizados pela população carente. Os pontos amostrados foram

Praia do Flamengo (PF) e Praia Vermelha (PV), ambas situadas na zona leste da cidade, e Praia do Vidigal (PV), situada na região costeira entre os bairros do Leblon e São Conrado, zona sul da cidade. Para fins de comparação foram analisados também mexilhões provenientes de Fazenda Marinha (Penha, SC) e aqui denominados de grupo controle (GC). Após a coleta os mexilhões foram acondicionados em sacos plásticos e guardados em isopor com gelo durante o transporte até o laboratório.

#### Preparo das amostras de mexilhão

No laboratório, o tecido mole dos mexilhões foi separado da carapaça utilizando-se um bisturi de aço inoxidável. Para cada ponto de coleta o tecido mole de 20 mexilhões adultos com carapaças entre 4-8 cm foi homogeneizado para formar uma amostra composta. Essas amostras foram então liofilizadas por 24 horas, maceradas e guardadas em recipientes descontaminados para posterior análise.

#### Dissolução das amostras em forno de microondas

Massas em torno de 200 mg foram pesadas para abertura no microondas. Amostras e brancos foram digeridos em HNO<sub>3</sub> 65% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%, submetidos ao mesmo programa por 20 min e, em seguida, levados a um volume final de 25 ml. A Tabela 1 apresenta o Programa do Microondas utilizado neste trabalho.

#### Determinação de Pb por espectrometria de absorção atômica eletrotérmica

As amostras foram dispensadas sem diluição diretamente na plataforma (10 µL), seguido da adição do mesmo volume de modificador químico Pd/Mg. A Tabela 2 apresenta o Programa de Temperatura usado para a determinação de chumbo nas amostras de mexilhão. Para minimizar o efeito de matriz devido à complexidade das amostras, estas foram analisadas utilizando-se curvas analíticas feitas com a própria matriz, que apresentaram coeficientes de correlação variando de 0,9988 a 0,9998. A exatidão do método usado foi avaliada submetendo-se a amostra de referência de mexilhão NIST 1566a, [Pb] = 0,371 ± 0,014 mg.kg<sup>-1</sup> aos mesmos procedimentos das amostras reais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a concentração de chumbo são apresentados na Tabela 3. O método utilizado neste trabalho para a determinação de chumbo mostrou-se exato, como se pode observar pelos resultados concordantes entre o valor de referência e o obtido experimentalmente. Esse resultado também demonstra que a abertura no microondas foi eficiente e que não houve perda significativa do analito.

A rapidez de análise foi assegurada pelo uso de amostras compostas, pela abertura em microondas e pela utilização de curva de calibração em vez de adição-padrão.

Tabela 1 — Programa do microondas.

Etapa	Potência (W)	Tempo (min)
1	250	4
2	800	6
3	450	7
4	800	6
5	450	7

Tabela 2 — Programa de temperatura para Pb.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	“Hold” (s)	Fluxo de N <sub>2</sub> (ml.min <sup>-1</sup> )
1*	90	1	10	300
2	120	20	20	300
3	1100	10	20	300
4	20	1	10	300
5**	1900	0	5	0
6	2600	1	3	300
7	20	1	5	300

\*Amostra/modificador. \*\*Leitura.

**Tabela 3** — Resultados obtidos para a concentração de Pb.

Amostras	Conc. Pb (mg.kg <sup>-1</sup> )
Praia do Flamengo	1,1 ± 0,31
Praia Vermelha	2,5 ± 1,1
Praia do Vidigal	2,1 ± 0,40
Grupo controle (GC)	0,26 ± 0,14
NIST 1566a	0,359 ± 0,23

A concentração média de chumbo encontrada ( $2,0 \pm 0,93$  mg.kg<sup>-1</sup>) é quase dez vezes superior àquela do mexilhão não exposto (GC). Este valor encontra-se no limite máximo permitido pela Legislação Brasileira para consumo de pescado ( $2,0$  mg.kg<sup>-1</sup>), representando um risco à população, principalmente se o seu uso na dieta se der de forma continuada (Ministério da Saúde, 1990).

### CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho apontam para a necessidade de monitoramento das populações sob risco e do ambiente, a fim de que se possa dar subsídios para a implantação de programas de controle da poluição ambiental, contribuindo assim para a melhoria da qualidade de vida da população.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMADOR, E. S., 1997, *Baía de Guanabara e ecossistemas periféricos: homem e natureza*. Reproarte Gráfica e Editora Ltda., Rio de Janeiro, 539p.
- FARRINGTON, J. W. *et al.*, 1983, U.S. Mussel Watch 1976-1978: an overview of the trace- metal, DDC, PCB, hydrocarbon, and artificial radionuclide data. *Environm. Sci. Technol.*, 17(8): 490-496.
- FEEMA, 1991, *Qualidade ambiental do ecossistema da Bacia Hidrográfica da Baía de Guanabara em 1990*. Secretaria do Estado do Rio de Janeiro, Governo do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 30p.
- FEEMA, 1998, *Qualidade da água da Baía de Guanabara – 1990 a 1997*. Secretaria de Estado de Meio Ambiente, Rio de Janeiro.
- JICA (Japan International Cooperation Agency), 1994, *The study on recuperation of Guanabara Bay Ecosystem*. Toquio, Kokusai Kogyo Co. 4 vol.
- Ministério da Saúde, 1990, Portaria nº 16 – DINAL/MS. In: *Compêndio da Legislação de Alimentos*. Atos do Ministério da Saúde, v. 1, p. 3153.
- O'CONNOR, T. P., 1998, Mussel Watch results from 1986 to 1996. *Mar. Poll. Bull.*, 37(1-2): 14-19.
- RAVERA, O. & RICCARDI, N., 1997, Biological monitoring with organisms accumulator of pollutants. *Mar. Chem.*, 58: 313-318.