

Implantação do Laboratório de Ecotoxicologia Aplicada à Indústria Metalúrgica (LECOMIN) do CETEM

Alinne dos Santos Ramos

Bolsista do Programa de Capacitação Interna, M.Sc

Silvia Gonçalves Egler

Orientadora, Bióloga, M.Sc

Zuleica Carmen Castilhos

Co-orientador, Farmacêutica, D.Sc

Resumo

Os testes de toxicidade são amplamente empregados para a avaliação dos efeitos adversos de agentes químicos sobre a biota terrestre e aquática e possibilitam a avaliação dos impactos de poluentes para organismos do solo e dos corpos receptores. O objetivo geral deste projeto é implantar um laboratório de ecotoxicologia, para a avaliação de impactos ambientais e para auxiliar na tomada de decisões sobre a eficiência de tecnologias de tratamento de efluentes e de remediação de solos. São realizados quatro tipos de testes utilizando minhocas da espécie *Eisenia foetida* na avaliação da contaminação de solos: teste de sensibilidade (averigua a qualidade da cultura de minhocas do laboratório), teste de ecotoxicidade aguda, teste de ecotoxicidade aguda com papel de contato e teste de fuga. Sendo assim, os testes de toxicidade podem ser realizados para avaliar o potencial de bioacumulação do contaminante fornecendo informações de toxicidade e biodisponibilidade, podendo ser uma importante ferramenta no auxílio do monitoramento de áreas degradadas.

1. Introdução

A toxicologia é o estudo dos efeitos nocivos dos agentes químicos ou físicos sobre os organismos vivos, tendo como objetivo principal estabelecer o uso seguro dos agentes químicos. As substâncias químicas de interesse incluem tanto os produtos químicos sintéticos quanto aqueles que existem naturalmente no ambiente. Na toxicologia, os efeitos são determinados, em geral, pela injeção ou administração oral de substâncias de interesse em animais, observando-se como a saúde desses é afetada, através da relação dose resposta (Baird, 2002).

A avaliação ambiental da integridade ou grau de degradação de ecossistemas terrestres e aquáticos, cujas variações físicas são acentuadas, exige que fatores mais estáveis sejam considerados como indicadores de avaliação, como por exemplo, fatores biológicos. Estes fatores podem indicar melhor o equilíbrio do ambiente através de índices bióticos, derivados da observação de espécies bioindicadoras (CETESB, 2005).

Uma forma bastante utilizada para se estimar se um ou mais agentes contaminantes podem causar efeitos tóxicos sobre o ecossistema terrestre e aquático é determinar suas concentrações nos compartimentos ambientais e comparar estes teores com os limites permitidos ou valores orientadores de qualidade do meio, como por exemplo os sugeridos pela CETESB (2001), para solos, e pela Resolução CONAMA 357 (2005),

para águas. A caracterização dos riscos subsidiará a definição das metas a serem atingidas na remediação ou nas medidas corretivas a serem tomadas (USEPA, 1996).

Um dos métodos mais empregados para a avaliação dos efeitos adversos de agentes químicos sobre a biota terrestre e aquática, são os testes de toxicidade. Neles são utilizados organismos-teste terrestres, de águas continentais, estuarinas e marinhas que ficam expostos aos contaminantes sob condições controladas (CETESB, 2005).

Estes estudos têm possibilitado o estabelecimento de limites permissíveis de várias substâncias químicas e na avaliação dos impactos de poluentes para organismos do solo e dos corpos receptores (CETESB, 2005), já que é economicamente inviável analítica e economicamente identificar todas as substâncias tóxicas em compartimentos ambientais e criar padrões para cada uma delas (CETESB, 2005). Normalmente, tais estudos envolvem testes de toxicidade simples, realizados em curto espaço de tempo. Entretanto, de acordo com a complexidade do estudo, testes de longa duração também podem ser realizados.

Visando a relevância da utilização dos testes de toxicidade como ferramenta importante para avaliação da qualidade ambiental, o Serviço de Desenvolvimento Sustentável (SEDS) do Centro de Tecnologia Mineral (CETEM/MCT), implantou em 2005 o Laboratório de Ecotoxicologia aplicado a Indústria Mineral (LECOMIN). Desenvolvendo, inicialmente, testes com o oligoqueta *Eisenia foetida*, tendo como principal objetivo atender aos estudos de recuperação ambiental de áreas mineradas, envolvendo amostras de solos, resíduos ou passivos de atividades minero-metalúrgicas e/ou industriais, bem como, na escolha de alternativas tecnológicas limpas.

Objetivos

O objetivo geral deste projeto é implantar um laboratório de ecotoxicologia, para a avaliação de impactos ambientais e para auxiliar na tomada de decisões sobre a eficiência de tecnologias de tratamento de efluentes e de remediação de solos, tendo como objetivos específicos:

- Implantar testes de toxicidade padronizados em amostras líquidas utilizando a alga clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata* e os microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* e solos utilizando o oligoqueta *Eisenia foetida*;
- Elaborar protocolos com os procedimentos adotados para todos os testes realizados;
- Estabelecer a inter-relação dose-resposta, fundamental em estudos de causalidade entre efeitos tóxicos e exposição a contaminantes, a serem utilizados em avaliações de impactos ambientais de atividades antrópicas;
- Testar a qualidade de efluentes e solos oriundos da atividade minero-metalúrgica, associando seus resultados às disponíveis e/ou novas tecnologias de tratamentos de efluentes, orientando os esforços para aquelas que melhores resultados obtiverem na avaliação ecotoxicológica;

2. Materiais e Métodos

O Laboratório de Ecotoxicologia aplicada à Indústria Mineral-metalúrgica tem implantado em sua rotina, os testes de toxicidade aguda e o teste de comportamento utilizando minhocas da espécie *Eisenia foetida*. Seguem abaixo a metodologia dos testes citados.

2.1. Peneiramento das amostras

Antes da realização dos testes de ecotoxicidade, os solos são peneirados em peneira de malha de 10 mesh, para remoção de detritos maiores e para a realização das análises dos compostos químicos, quando necessário.

2.2. Cultura das minhocas

Na cultura, as minhocas são separadas por idade (jovens - até 150 mg, sub-adultas - entre 150 e 300 mg e adultas - acima de 300 mg) e mantidas em bandejas plásticas, com aproximadamente 10.000 cm³ de esterco curtido.

A quantidade de minhocas por bandeja varia de acordo com o volume desta e com o peso das minhocas, no máximo 300 g, ou seja, 0,03 g de minhocas/cm³. As minhocas são depositadas na superfície da cama de esterco e deixadas para escavar.

As culturas são mantidas no LECOMIN/CETEM, com temperatura variando de 22 ± 2°C, pH próximo de 7, umidade entre 60-70 % e iluminação constante.

2.3. Teste de sensibilidade

O teste de sensibilidade é conduzido para avaliar a qualidade da cultura do laboratório, garantindo que os resultados obtidos em testes de toxicidade sejam exclusivamente ocasionados pela substância testada.

O teste de sensibilidade é realizado com solo artificial, uma vez por mês, utilizando a substância de referência 2-cloroacetamida em cinco (5) diferentes concentrações (20, 40, 60, 80 100 mg/kg) e um controle (solo artificial sem a substância de referência), conforme descrito na norma da ASTM (1995).

O solo artificial é preparado em lotes de 600 g por concentração, quantidade necessária para as triplicatas de 200 g distribuídas em béqueres de 600 mL, utilizando 70% de areia, 20% de caulim e 10% do musgo *Sphagnum* triturado. A quantidade de 2-cloroacetamida em solução a ser adicionada por lote é calculada segundo a fórmula descrita na norma do Washington State Department of Ecology (1996).

Após o preparo do lote, uma alíquota do solo é retirada para análise da umidade e do pH. A umidade é corrigida com adição das soluções de cloroacetamida até a umidade de 45 % e o pH ajustado com carbonato de cálcio (CaCO₃) até a neutralidade.

As réplicas são cobertas com papel filme perfurado e colocadas na sala de teste, distribuídas de modo aleatório, com as mesmas condições da sala de cultura (temperatura de 22 ± 2°C e iluminação constante) por 24 h, para equilíbrio. Neste mesmo dia, as minhocas utilizadas para o teste, 10 para cada réplica, são lavadas

e colocadas para purgar o conteúdo intestinal em recipiente com papel filtro umedecido com água destilada. Após este período, em cada réplica são colocadas 10 minhocas adultas, previamente lavadas e secas. As minhocas são depositadas sobre o solo testado e deixadas para escavar. Durante os 14 dias do ensaio, as minhocas são mantidas sem alimentação. O teste só é aceito se a mortalidade no solo controle for inferior a 10%.

2.4. Testes de Ecotoxicidade Aguda

O teste de ecotoxicidade é realizado tendo como base a norma da ASTM (ASTM E 1676 – 1995). Para tal, são utilizadas as amostras de solo contaminadas (óleo cru, mercúrio, zinco, rejeitos de carvão, entre outras) e um solo controle, artificial ou de referência, não contaminado.

Para o ensaio, o solo é preparado em lotes de 600 g por concentração, quantidade necessária para as triplicatas. Após o preparo do lote, uma alíquota do solo é retirada para análise da umidade e do pH. A umidade é corrigida com adição de água destilada até a umidade de 45 % e o pH ajustado com carbonato de cálcio (CaCO_3) até a neutralidade.

As réplicas são cobertas com papel filme perfurado e colocadas na sala de teste, distribuídas de modo aleatório, com as mesmas condições da sala de cultura (temperatura de 22 ± 2 °C e iluminação constante) por 24 h, para equilíbrio. Para cada réplica, são utilizadas 10 minhocas adultas que são lavadas, secas e colocadas durante 24 h para purgar o conteúdo intestinal. Esse procedimento é utilizado já que a perda da biomassa é usada como um dos parâmetros a ser avaliado.

Após as 24 h, as minhocas são novamente lavadas, secas e pesadas em grupos contendo 10 espécimes cada e colocadas no teste. Durante os 14 dias do ensaio, as minhocas são mantidas sem alimentação. Ao final dos 14 dias, as minhocas são retiradas do recipiente-teste e colocadas novamente para purgar o conteúdo intestinal durante 24 horas, e novamente pesadas. O teste só pode ser aceito se a mortalidade no controle for inferior a 10%.

2.5. Teste de Toxicidade Aguda com Papel de Contato.

O teste de toxicidade aguda com papel de contato é realizado para testar substâncias, conforme descrito na norma da Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD 207/1984), utilizando como substrato papel filtro umedecido com as soluções-teste de uma determinada substância.

Cada concentração é testada em 10 réplicas, com uma minhoca adulta em cada. Béqueres de 50 mL são utilizados como recipiente-teste e a lateral é recoberta pelo papel filtro umedecido com 1 mL de solução-teste e 1mL de água deionizada.

Durante o teste, os béqueres são colocados apoiados nas laterais e tampados com papel filme perfurado. O teste é mantido no escuro à temperatura de 20 ± 2 °C. A primeira verificação é realizada após 48h e os efeitos observados são anotados. Uma segunda verificação é realizada após 24h, completando 72h, quando o teste é encerrado.

2.6. Teste de Fuga ou Ensaio de Comportamento

O teste de fuga é realizado tendo como base o documento preliminar disponível da norma da International Organization for Standardization (ISO, 2002) (ou ISO - TC/190/SC 4/WG 2 N° 153 de 2003).

O teste tem como principal objetivo expor as minhocas simultaneamente a uma amostra de solo teste e um solo controle, avaliando assim o comportamento de fuga das minhocas. Para tal, são utilizadas amostras de solos contaminados e de solos controles não contaminados.

Para o ensaio, os solos-teste e o controle são distribuídos em lotes com a quantidade necessária para as triplicatas (aproximadamente 1200g de solo para cada replicata).

Uma alíquota do solo é retirada para análise da umidade e do pH. Um dia antes de o teste iniciar, a umidade é corrigida com adição de água destilada até a umidade de 60% e pH ajustado com carbonato de cálcio (CaCO_3) até a neutralidade.

Após o ajuste dos parâmetros físicos, os solos-teste e o solo controle são colocados no mesmo recipiente, em seções distintas, separadas por um divisor, formando dois compartimentos. Em um dos compartimentos é colocado o solo-teste e na outra seção é colocado o solo controle.

Depois que as amostras foram arrumadas no recipiente, o divisor é retirado formando uma linha onde são colocadas as 10 minhocas adultas purgadas.

O teste tem duração de 48h e é mantido a temperatura de 20 ± 2 °C, com iluminação contínua de 450 lux. e ciclos de claro/escuro de 16h:8h.

3. Resultados e Discussão

Na tabela 1, encontra-se o histórico de alguns testes realizados no LECOMIN, com os tipos de estudos de caso e/ou contaminantes testados, o tipo de norma e teste utilizado e a publicação gerada com os resultados encontrados.

Tabela 1: Histórico dos testes realizados no LECOMIN com os tipos de estudos de caso e/ou substâncias testadas, normas e tipos de testes utilizados e as publicações geradas.

Estudos de Caso e /ou substâncias testadas	Normas	Tipos de Testes de Toxicidade	Publicações geradas
Solos contaminados por mercúrio Descoberto-MG 1ª Coleta (4 amostras de solo)	ASTM 1676-95: Standard Guide for Conducting Soil Toxicity Tests for the Lumbricid <i>Eisenia foetida</i>	Teste agudo de 14 dias	Jornada de Iniciação Científica (2006) de Alinne dos Santos Ramos.
Cromo	OECD – 206/84 - Guideline for Testing Chemicals: Earthworms, Acute Toxicity Tests.	Teste agudo de 48 horas, usando como substrato papel filtro.	Jornada de Iniciação Científica (2006) da aluna Karen Marnello Santos Muniz.
Solos Contaminados por Óleo Cru	ASTM 1676-95: Standard Guide for Conducting Soil Toxicity Tests for the Lumbricid <i>Eisenia foetida</i>	Teste agudo 14 dias	Dissertação de mestrado da bolsista de capacitação interna Alinne dos Santos Ramos (2007)
Solos Contaminados por Óleo Cru	ISO: Avoidance test for testing the quality of soils and the toxicity of chemicals	Teste de 48 horas, tendo como principal parâmetro, a fuga dos espécimes de um solo contaminado para um solo não contaminado.	Dissertação de mestrado da bolsista de capacitação interna Alinne dos Santos Ramos (2007)
Solos contaminados por mercúrio Descoberto-MG 2ª Coleta (11 amostras de solo)	ASTM 1676-95: Standard Guide for Conducting Soil Toxicity Tests for the Lumbricid <i>Eisenia foetida</i>	Teste agudo 14 dias	XI Congresso Brasileiro de Geoquímica (2007)
Mercúrio	OECD – 206/84 - Guideline for Testing Chemicals: Earthworms, Acute Toxicity Tests.	Teste agudo de 48 horas, usando como substrato papel filtro, e de 14 dias, utilizando como substrato solo artificial tendo como base a norma da OECD 207-84	Trabalho realizado pela ex- aluna de iniciação científica Jacqueline Lopes Cardoso Xavier (2007)
Solos contaminados por rejeitos de Carvão	ASTM 1676-95: Standard Guide for Conducting Soil Toxicity Tests for the Lumbricid <i>Eisenia foetida</i>	Teste agudo 14 dias	Trabalho realizado pela equipe do LECOMIN para o projeto de Avaliação de Impactos Ambientais na Bacia Carbonífera de SC (2007)

Os testes já implantados no LECOMIN com minhocas permitem a realização de pesquisas de fomento e avaliações de efluentes e resíduos de mineradoras. A determinação das concentrações dos contaminantes testados nos organismos expostos permite estimativas da biodisponibilidade e relação de transposição do meio para a biota. A experiência desenvolvida permitiu a participação do CETEM na discussão para a elaboração da norma brasileira da ABNT sobre testes de toxicidade aguda com minhocas da espécie *Eisenia foetida*.

Como próximos passos a implantação dos testes de bioacumulação e reprodução com minhocas e os de toxicidade com amostras líquidas (CT-Mineral), fazem parte de ações para integração interna no CETEM, de setores envolvidos em inovação tecnológica e tratamento de efluentes como avaliação da eficácia dos tratamentos propostos, considerando a ecotoxicidade dos efluentes.

Poderá atender, ainda, a indústrias extrativas minerais e órgãos governamentais envolvidos no estabelecimento de critérios de qualidade de compartimentos ambientais (IBAMA, ANA, etc) e de controle de poluição ambiental (Secretarias estaduais de proteção ambiental), universidades e centros de pesquisa, empresas de consultoria envolvidas em avaliação de impacto ambiental (EIA/RIMA) por atividades minerais.

4. Conclusões

Os testes já implantados no LECOMIN com minhocas permitem a realização de pesquisas de fomento e avaliações de efluentes e resíduos de mineradoras. A determinação das concentrações dos contaminantes testados nos organismos expostos permite estimativas da biodisponibilidade e relação de transposição do meio para a biota. Sendo assim, os testes de toxicidade podem ser realizados para avaliar o potencial de bioacumulação do contaminante fornecendo informações de toxicidade e biodisponibilidade, podendo ser uma importante ferramenta no auxílio do monitoramento de áreas degradadas.

5.Referências Bibliográficas

- ASTM. Standard Guide for Conducting a Laboratory Soil Toxicity Test with Lumbricid Earthworm *Eisenia foetida*, American Society for Testing and Materials, Standard Designation E1676-95,1995.
- BAIRD, C. 2002. *Química Ambiental*, 2ª ed., Editora: Bookman, Porto Alegre –RS
- CETESB. Métodos de Avaliação da Toxicidade de Poluentes a Organismos Aquáticos- vol. 1, Orientações para Manutenção, Cultivo e Realização de Testes de Toxicidade com Organismos Aquáticos. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental 2005. São Paulo – SP.
- ISO. International Organization for Standardization. Avoidance Test for Testing the Quality of Soils and the Toxicity of Chemicals: test with earthworms. Designation: ISO/TC 190/SC 4 N 0238 DRAFT- 2003.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Earthworm, Acute Toxicity Tests. Designation 207-1984
- USEPA. United States Environmental Protection Agency. Quality Criteria for Water. Washington, 1986.
- Washington State Department of Ecology, 1996. Earthworm Bioassay Protocol for Soil Toxicity Screening.

