

Avaliação da toxicidade de dois elementos do grupo dos lantanídeos para organismos aquáticos

Toxicity evaluation of two elements from the lanthanides group for aquatic organisms

Tamine Martins Roldão

Bolsista Capacitação Institucional, Bióloga, M.Sc.

Silvia Gonçalves Egler

Supervisora, Bióloga, M.Sc.

Resumo

O interesse pelos Elementos de Terras Raras (ETRs) vem crescendo nos últimos tempos devido à variedade de suas aplicações, particularmente, em altas tecnologias. O aumento na utilização destes elementos, faz crescer a probabilidade de exposição e contaminação ambiental e assim, tornando crucial a avaliação ecotoxicológica dos ETRs. O presente estudo visa avaliar o efeito de samário e lantânio, individualmente e em mistura, sobre a reprodução e sobrevivência de organismos aquáticos pertencentes a dois níveis tróficos. Foram avaliados os efeitos tóxicos, agudo e crônico, de duas soluções sintéticas dos ETRs lantânio e samário, sobre bioindicadores aquáticos. Representando os consumidores primários na cadeia trófica foi avaliado o microcrustáceo *Daphnia similis*, que foi mais sensível a ambos os lantanídeos, sendo lantânio mais tóxico que samário para este organismo. A biodisponibilidade dos elementos estudados foi reduzida pela presença de EDTA e da vitamina B12, constituintes do meio MS utilizado, em vista do efeito quelante destes compostos e, portanto, seu uso deve ser evitado em ensaios para avaliação da toxicidade dos ETRs. Representando os produtores, foram avaliadas as microalgas *Raphidocelis subcapitata*, *Chlorella vulgaris* e *Ankistrodesmus falcatus* porém, até este momento apenas com o ETR samário. Não houve diferença significativa entre as respostas obtidas nos ensaios com algas, no entanto, novos ensaios ainda serão realizados para avaliar o efeito individual de lantânio e em misturas com samário para as diferentes espécies destas algas.

Palavras chave: elementos de terras raras, toxicidade, bioindicadores

Abstract

The Interest in Rare Earth Elements (REE) has been growing in recent years, due to the variety of their applications, particularly in high technologies. The growth of the use of these elements, increases the probability of environmental exposure and contamination. In this context, REE ecotoxicological evaluation is crucial. The present study aims to evaluate the effect of samarium and lanthanum, individually and in mixture, on the reproduction and survival of aquatic organisms belonging to two trophic levels. The toxic effects, acute and chronic, of two synthetic solutions of REE lanthanum and samarium were analysed over aquatic bioindicators. The microcrustacean *Daphnia similis* was used to represent the primary consumers of food chain. This organism was more sensitive to both lanthanides, being lanthanum the most toxic for it. The bioavailability of the studied elements was reduced by the presence of EDTA and B12 vitamin, both being constituents of the used medium, in view of their chelating effects and therefore their use should be avoided in trials aiming to evaluate the toxicity of the REE. Until this moment, only samarium toxicity was evaluate for the microalgae *Raphidocelis subcapitata*, *Chlorella vulgaris* and *Ankistrodesmus falcatus* (food chain producer representatives). There was no significant difference between the responses obtained in the algae assays, however, new trials will be performed to evaluate the individual effect of lanthanum and its mixtures with samarium, for the different species of these algae.

Keywords: rare earth elements, toxicity, bioindicators

1. Introdução

Os elementos de terras raras (ETR) são um grupo de elementos, da tabela periódica, compostos por 15 lantanídeos além do escândio e ítrio. Os lantanídeos possuem propriedades muito similares em consequência de sua distribuição eletrônica (GONZÁLEZ *et al.*, 2015). Os lantanídeos possuem características similares ao cálcio e alta afinidade por grupos fosfato em moléculas biológicas. Em consequência, interagem com sistemas biológicos provocando toxicidade, influenciando no metabolismo e comprometimento funcional (GONZÁLEZ, *et al.*, 2015). Os ETRs são encontrados nos minerais: monazita, bastnasita, xenotima, loparita e nas argilas lateríticas. Em geral ocorrem em baixas concentrações no solo, sedimentos e na água e o crescente interesse por eles deve-se a variedade de aplicações, principalmente, em altas tecnologias (GONZÁLEZ *et al.*, 2015).

O lantânio (La) é o lantanídeo mais eletropositivo entre os ETRs e apresenta propriedades químicas similares as dos alcalinos-terrosos. O La é muito utilizado em fertilizantes, no entanto, Barry e Meehan (2000) demonstraram que o La causou toxicidade em *Daphnia*. O samário (Sm) é um lantanídeo que pode formar fluoretos, cloretos e sulfetos, entre outros compostos e assim como outros ETRs pode influenciar o metabolismo de organismos. Apesar de sua toxicidade parecer ser baixa, Blaise *et al.* (2008) demonstraram que Sm causou toxicidade em bioindicadores de diferentes grupos taxonômicos.

A mineração e o descarte inapropriado são as principais fontes de contaminação ambiental por estes elementos. O destino e mecanismos pelos quais os ETRs podem afetar o ambiente, não são claros pois fatores físico-químicos podem afetar sua mobilidade e biodisponibilidade. Esses fatos reafirmam a necessidade do entendimento dos efeitos tóxicos provocados pelos ETRs (GONZÁLEZ *et al.*, 2015). Em consequência, estudos sobre ecotoxicidade, bioacumulação e modo de ação devem ser desenvolvidos para um melhor entendimento e prevenção dos riscos associados a esta disposição (GONZÁLEZ *et al.*, 2015), uma vez que há pouca informação disponível sobre suas toxicidades (BARRY; MEEHAN, 2000).

Estudos ecotoxicológicos são ferramentas para o monitoramento da qualidade ambiental, avaliando os impactos de contaminantes (e seus metabólitos) sobre organismos vivos ou ecossistemas, considerando a influência de fatores ambientais (ROLDÃO, 2014), para prever níveis de exposição seguros. Para a realização destes estudos, são aplicados ensaios de toxicidade (agudos e crônicos), padronizados nacional e internacionalmente, com o uso de bioindicadores (ROLDÃO, 2014). Existe muito pouca literatura focando na avaliação dos efeitos tóxicos de ETRs sobre bioindicadores, o que eleva a importância deste estudo.

2. Objetivo

O presente estudo visa avaliar o efeito de samário e lantânio, individualmente e em misturas, sobre a reprodução e sobrevivência de organismos aquáticos pertencentes a dois níveis tróficos.

3. Material e Métodos

Os organismos testes utilizados neste estudo foram: *Daphnia similis* (microcrustáceo planctônico de água doce) e as microalgas clorofíceas *Ankistrodesmus falcatus*, *Chlorella vulgaris* e *Raphidoceles subcapitata* (unicelulares de água doce), cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia aplicado à Indústria Minerometalúrgica (LECOMIN) da Coordenação de Processos Metalúrgicos e Ambientais (COPMA) do Centro de Tecnologia Mineral (CETEM). Estes organismos são bioindicadores padronizados para análises ecotoxicológicas e utilizados em larga escala por pesquisadores da área.

O cultivo de *Daphnia similis* pré-estabelecido no LECOMIN/COPMA/CETEM foi iniciado em 2009 e segue a norma da ABNT-NBR 12713/09 (ABNT, 2016). O meio de cultivo utilizado é o MS (ABNT, 2016), o pH do meio é mantido entre 7 e 7,6 e a dureza entre 40 e 48 mg de CaCO₃/L, com oxigênio dissolvido (O.D.) superior a 5 mg/L. Os organismos são mantidos na temperatura de 20 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro e iluminação de 500 a 1000 lux. O meio de cultivo é trocado duas vezes por semana e a alimentação é diária com a microalga *Raphidoceles subcapitata*, na quantidade de 1 a 5 x 10⁵ células por organismo. Com o objetivo de avaliar a qualidade e padronização das culturas, mensalmente foram realizados ensaios de sensibilidade para o estabelecimento da faixa de sensibilidade a uma substância de referência (NaCl) (ABNT, 2016).

As microalgas foram cultivadas em meio L.C. Oligo, que é trocado semanalmente, mantendo o cultivo em fase de crescimento exponencial, o que é ideal para a aplicação em ensaios ecotoxicológicos. O cultivo é mantido com aeração constante com bombas de aquário, a 25 ± 2 °C e iluminação contínua de 4500 lux (± 10%). Mensalmente foram realizados ensaios de sensibilidade com a substância de referência (KCl) (ABNT, 2011).

Os ensaios com os organismos-teste, cultivados no LECOMIN, seguiram as normas da ABNT NBR, ensaio agudo de 48 h com *D. similis* (ABNT, 2016) e crônico de 96 h com as microalgas (ABNT, 2011). As soluções-testes foram preparadas a partir de uma solução-estoque de 5 g/L de samário e lantânio diluída no meio de cultivo específico de cada organismo, individualmente e em misturas dos dois elementos nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1. As soluções-estoque foram preparadas a partir da solubilização de óxidos dos lantanídeos estudados em ácido nítrico (HNO₃). Devido ao uso de ácido nítrico no preparo da solução-estoque, foram realizados ensaios de toxicidade de HNO₃ agudo (*D. similis*) e crônico (*C. vulgaris*), utilizando como maior concentração aquela presente na solução-estoque.

Com os resultados dos ensaios, foram avaliados os efeitos letais e subletais para os bioindicadores e estes foram expressos em relação às concentrações nominais (iniciais) CE(I)_{50, 48h}, (concentração efetiva mediana inicial que causou toxicidade em 50% dos organismos testados) que possui relação inversa com a toxicidade, quanto menor o valor, maior a toxicidade; UT (unidade tóxica = 100/CE₅₀) onde a relação é direta, quanto maior o valor da UT mais alta é a toxicidade para *D. similis* e CI_{50, 96h}, (concentração de inibição mediana inicial que causou 50% de efeito na multiplicação das células) para as microalgas.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas Statistica 13.1, *Trimmed Spearman-Kärber* e *Linear Interpolation*.

Os ensaios agudos (cladocero *Daphnia similis*) foram realizados em beckeres de vidro de 25 mL, sob temperatura constante (21 °C) e sem iluminação e alimento, por um período de 48 horas. Para tal, foram utilizados 20 neonatos com 6 a 24 horas de nascidos, divididos em quadruplicatas de cinco indivíduos, por concentração-teste e controle. As concentrações utilizadas estavam na faixa entre 2 e 25 mg/L de ETR. Para diluição das soluções de ETRs e seu controle, foram utilizados os meios de cultivo MS completo (ABNT, 2016) e o MS incompleto, caracterizado pela ausência de EDTA e Vitamina B12 (ABNT, 2016). Os parâmetros pH e Oxigênio Dissolvido (OD) foram monitorados no início e no final dos ensaios para cada concentração-teste e controle. Ao final das 48 horas de ensaio, as amostras foram observadas e os organismos mortos ou imóveis foram contabilizados. A partir desta contabilização, os resultados foram expressos em CE(I)₅₀ e UT. Para se considerar o ensaio válido, a mortalidade no controle deve ser ≤ 10% e os resultados do ensaio de sensibilidade no intervalo de ± 2 DP (desvio-padrão) das médias das CE₅₀ dos ensaios anteriores.

Os ensaios crônicos (microalgas) foram realizados em Erlenmeyers de vidro de 250 mL (com 100 mL de solução), na temperatura de 25 ± 2 °C, iluminação contínua de 4500 lux (± 10%), velocidade de agitação contínua de 130 rpm, em triplicata e a partir de um inóculo de alga de 3 x 10⁵ células/mL de *A. falcatus*, *C. vulgaris* ou *R. subcapitata*. As concentrações utilizadas estavam na faixa entre 30 e 70 mg/L de ETR. Para diluição das amostras e seu controle, foi utilizado o meio de cultivo L.C. Oligo, mesmo meio utilizado no cultivo dos organismos. Ao final das 96 h de ensaio, as biomassas (densidade celular) das amostras foram obtidas através da leitura em Espectrofotômetro (marca LaMotte, modelo Smart Spectro), com absorbância determinada em 675 nm para *C. vulgaris* e *R. subcapitata* e 450 nm para *A. falcatus*. O ensaio foi considerado válido quando a biomassa algácea no controle foi, pelo menos, 100 vezes superior à inicial para 96 h e o coeficiente de variação da biomassa algácea final, entre as réplicas (três) do controle for ≤ 20%.

4. Resultados e Discussão

A CE(I)_{50, 48h}, e seu 95% de Intervalo de Confiança, obtido para o ensaio com o ácido nítrico foram, 2,51 (2,34-2,69) mL/L para *D. similis* e 5,04 (4,93-5,13) mL/L para *C. vulgaris*, sendo estas, concentrações muito superiores aquela utilizadas nos ensaios após a diluição da solução-estoque pelo meio de cultivo apropriado.

Os resultados obtidos dos ETRs, individualmente são apresentados na Tabela 1. Nos ensaios de *D. similis* com samário não foi observada diferença significativa em relação aos meios MS completo e incompleto (Kruskal-Wallis: H = 2,00, p = 0,1573), provavelmente devido a toxicidade deste elemento ser inferior a do lantânio para este organismo, como confirmado mais abaixo. Já nos ensaios com lantânio, foi

possível observar que houve diferença significativa entre os meios MS completo e incompleto (Kruskal-Wallis: $H = 4,50$, $p = 0,0339$), demonstrando que a presença de EDTA e Vitamina B12 pode ter interferido na biodisponibilidade destes elementos. Trabalhos anteriores demonstraram ser estes elementos mais tóxicos, quando apresentados na forma de íons livres (BARRY; MEEHAN, 2000). Diferença significativa também foi observada entre samário e lantânio com meio MS incompleto (Kruskal-Wallis: $H = 3,85$, $p = 0,0495$), confirmando que lantânio foi mais tóxico para *D. similis* do que samário. Esta diferença na toxicidade entre os dois elementos pôde ser observada apenas nos ensaios com meios incompletos, em vista dos efeitos quelantes do EDTA e da vitamina B12.

Quando comparado com as algas estudadas, o microcrustáceo *D. similis* foi mais sensível ao samário do que estas, com CE_{50} em menores concentrações e maiores valores de UT. Este resultado era esperado uma vez que os ETRs são utilizados como fertilizantes em diversas culturas vegetais, principalmente na China (BARRY; MEEHAN, 2000), o que denota um menor efeito aos vegetais destes elementos. Não houve diferença significativa entre as respostas obtidas nos ensaios com as diferentes microalgas (Kruskal-Wallis: $H = 0,0000$, $p = 1,00$). No entanto novos ensaios ainda serão realizados para avaliar o efeito de lantânio individualmente e em misturas com samário para as diferentes espécies de microalgas.

Tabela 1. Resultados em CEI_{50} , 48 ou 96 h e Unidade Tóxica (UT) dos ensaios de ecotoxicidade com soluções sintéticas de lantânio e samário individualmente. NC = não calculado.

Espécies	ETRs	Samário mg/L- UT	95% Intervalo de Confiança	Lantânio mg/L- UT	95% Intervalo de Confiança
<i>Daphnia similis</i> – MS completo		22,36 – 4,47	21,54 – 23,22	22,49 – 4,45	NC
		22,59 – 4,43	21,40 – 23,84	19,05 – 5,25	17,77 – 20,41
		21,49 – 4,65	22,38 – 20,64	22,29 – 4,49	NC
		16,89 – 5,92	16,07 – 18,05	18,97 – 5,27	NC
<i>Daphnia similis</i> – MS sem EDTA e vitamina B12		16,85 – 5,93	15,58 – 18,23	10,79 – 9,27	9,99 – 11,66
		17,32 – 5,77	NC	11,45 – 8,73	10,38 – 12,63
		20,00 – 5,00	NC	11,86 – 8,43	10,85 – 12,95
<i>Raphidoceles subcapitata</i>		40,80 – 2,45	37,48 – 43,12		
		46,10 – 2,17	44,48 – 47,60		
		44,97 – 2,22	44,49 – 45,17		
<i>Chlorella vulgaris</i>		58,22 – 1,72	57,63 – 58,63		
		69,59 – 1,44	NC		
		46,21 – 2,16	45,39 – 46,52		
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>		47,16 – 2,12	47,07 – 47,25		
		54,34 – 1,84	50,41 – 55,18		
		48,51 – 2,06	48,34 – 48,57		

Na Tabela 2 são apresentados os resultados dos ensaios com as misturas, em diferentes proporções e meios MS, de lantânio e samário com *D. similis*. Estes resultados evidenciam que as misturas de ETRs são mais tóxicas do que a exposição individual a estes elementos, para *D. similis*, fato que expressa preocupação no caso de descarte inadequado destes elementos em conjunto.

Além da diferença entre a toxicidade destes elementos individualmente e em mistura, a somatória das médias das UTs dos ETRs individualmente testados (Tabela 1) com meio MS completo (UT = 4,87+4,86= 9,73) é maior que os valores obtidos nos ensaios com as misturas (Tabela 2). Este resultado caracteriza um efeito tóxico antagônico (COSTA *et al.*, 2008), quando a interação diminui o efeito total. Neste caso a diferença entre as proporções não pode ser observada devido à presença de EDTA e Vitamina B12 que provavelmente influenciaram na biodisponibilidade dos elementos estudados.

Nos ensaios com meio MS incompleto a somatória das médias das UTs (UT = 5,57+8,81=14,38) é similar ao resultado obtido na proporção 1:1, caracterizando um efeito tóxico aditivo, quando o efeito final é igual à soma dos efeitos de cada um dos ETRs individualmente.

No caso do ensaio com meio MS incompleto na proporção 1:2 o somatório das médias das UTs individuais é menor que os valores obtidos nos ensaios com a mistura (Tabela 2), caracterizando um efeito tóxico sinérgico (COSTA *et al.*, 2008), quando a interação aumenta o efeito total. Este fato deve-se a proporção de lantânio nesta mistura ser maior que a do samário, tornando a mistura mais tóxica uma vez que, como observado anteriormente, lantânio é estatisticamente mais tóxico que samário.

No ensaio com meio MS incompleto na proporção 2:1, o somatório das médias das UTs individuais é maior que as UTs dos ensaios com as misturas (Tabela 2), caracterizando novamente um efeito antagônico, devido a mistura possuir mais samário que lantânio, tornando a mistura menos tóxica para o organismo em questão.

Tabela 2. Resultados em CEI₅₀, 48 ou 96 h e Unidade Tóxica (UT) dos ensaios de ecotoxicidade com soluções sintéticas de lantânio e samário em misturas. Parêntesis = 95% Intervalo de Confiança; * = 95% Intervalo de Confiança não calculado.

Espécies	Proporção de mistura	Samário+ lantânio - mg/L – UT		
		(1:1)	(1:2)	(2:1)
<i>Daphnia similis</i> - MS completo		12,11* – 8,26	12,11* – 8,26	12,68 – 7,89
		12,25* – 8,16	12,47 – 8,02	(12,10 – 13,28)
		9,09 – 11,00	(12,05 – 12,91)	13,30 – 7,52
			12,1* – 8,16	(12,44 – 14,21)
<i>Daphnia similis</i> – MS Incompleto		6,79* – 14,73	5,16 – 19,38	6,39 – 15,65
		5,35 – 18,69	(3,00 – 8,89)	(5,60 – 7,30)
		(4,49 – 6,36)	6,07 – 16,47	6,24 – 16,03
		10,4* – 9,62	(4,72 – 7,80)	(5,54 – 7,03)
			7,07* – 14,14	12,25* – 8,16

5. Conclusão

O uso de ácido nítrico no preparo das soluções-estoque não interferiu na toxicidade obtida para samário e lantânio, nos organismos testados. As respostas obtidas para a toxicidade aguda e crônica a um ou dois tipos de lantanídeos (lantânio e samário) observados neste estudo foram diferentes para os organismos-teste e para a água de diluição utilizada. O microcrustáceo *D. similis* foi o organismo mais sensível às soluções sintéticas testadas. As concentrações obtidas nas CE₅₀ foram menores e os valores de UTs maiores. Os efeitos quelantes do EDTA e vitamina B12 reduziram a biodisponibilidade dos ETRS estudados, evidenciando que seu uso deve ser evitado em estudos com ETRs. Os efeitos observados nas proporções das misturas testadas foram antagônicos quando observado o meio MS completo e o meio MS incompleto na proporção 2:1, sinérgicos para os ensaios com meio MS incompleto na proporção 1:2 e aditivos no que diz respeito aos ensaios com MS incompleto na proporção 1:1. Para as microalgas *R. subcapitata*, *C. vulgaris* e *A. falcatus* não houve diferença significativa entre as respostas obtidas nos ensaios crônicos realizados. No entanto, novos ensaios ainda serão realizados para avaliar o efeito de lantânio individualmente e em misturas com samário para as diferentes espécies de microalgas e com isso gerar uma melhor compreensão do efeito dos ETRs sobre organismos responsáveis pela base da cadeia alimentar aquática.

6. Agradecimentos

À M.Sc. Sílvia. Egler, pela importante e atenciosa supervisão durante o período da bolsa. À Cristiana dos Santos e Gisele Heidelmann pela assistência prestada durante a elaboração dos ensaios. À Marisa Nascimento e Ana L. C. Moraes pelas soluções fornecidas. À Ellen Giese pelo auxílio em discussões na fase de elaboração do projeto. Ao CETEM - Centro de Tecnologia Mineral pela estrutura fornecida e ao MCTIC – Ministério da Ciência Tecnologia, Inovação e Comunicação em conjunto com o CNPq pela bolsa concedida.

7. Referências Bibliográficas

- ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). **NBR 12713**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda–Método de ensaio com *Daphnia* ssp. (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro:ABNT 2016. 27p.
- ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). **NBR 12648**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro: ABNT 2011. 24 p.
- BARRY, M. J.; MEEHAN, B. J. The acute and chronic toxicity of lanthanum to *Daphnia carinata*. **Chemosphere** v.41, p. 1669-1674, 2000.
- BLAISE, C.; GAGNÉ, F.; FÉRARD, J. F.; EULLAFFROY, P. Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. **Environmental Toxicology**, v. 23, p. 591–598, 2008.
- COSTA, C.R.; OLIVI, P; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

GONZÁLEZ, V.; VIGNATI, D. A.L.; PONS, M. N.; MONTARGES-PELLETIER, E.; BOJIC, C.; GIAMBERINI, L. Lanthanide ecotoxicity: first attempt to measure environmental risk for aquatic organisms. **Environmental Pollution**, v. 199, p. 139-147, 2015.

ROLDÃO, T. M. **Avaliação do Efeito Combinado de Carbofurano e Temperatura para *Ceriodaphnia dubia***. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública – Saneamento Ambiental). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil. 2014, 60 p.