

Avaliação da toxicidade de elementos terras raras para diferentes bioindicadores

Toxicity evaluation of rare earth elements for different bioindicators

Tamine Martins Roldao
Bolsista PCI, Bióloga, M.Sc.

Silvia Gonçalves Egler
Supervisora, Bióloga, M.Sc.

Resumo

O interesse pelos Elementos Terras Raras (ETR) vem crescendo nos últimos anos 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 ETR. O presente estudo visa avaliar o efeito de três ETR, individualmente e em mistura, sobre o brotamento e sobrevivência de organismos terrestres pertencentes a dois níveis tróficos. Foram avaliados os efeitos tóxicos, letais e de crescimento, de três soluções sintéticas dos ETR samário, lantânio e neodímio, sobre bioindicadores terrestres. Representando os produtores na cadeia trófica foi avaliada a espécie de planta *Lactuca sativa* e representando os detritívoros, foram avaliadas as oligoquetas *Eisenia andrei*. Lantânio foi mais tóxico que samário para ambas as espécies e neodímio foi mais tóxico que lantânio para *L. sativa*. Foi observado uma redução da biomassa e um aumento da porcentagem de inibição de germinação (%IG), ambos com o aumento da concentração dos ETR. A %IG também indicou amostras fortemente tóxicas nos ensaios com *L. sativa* e a exposição às amostras de ETR causou efeito inibidor no desenvolvimento de suas raízes. Nos ensaios com misturas de samário com lantânio e com neodímio foram observados efeitos antagônicos, enquanto nos ensaios de neodímio com lantânio os efeitos observados foram sinérgicos e menos tóxicos que as misturas anteriores. Novos ensaios ainda serão realizados para avaliar o efeito individual de lantânio e em misturas com samário e neodímio para as diferentes espécies estudadas.

Palavras chave: elementos 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 these elements use 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 three REE, individually and in mixture, on the growth and survival of terrestrial organisms belonging to two trophic levels. The acute and germination toxic effects of samarium, lanthanum and neodymium, were analyzed over terrestrial bioindicators. The plant *Lactuca sativa* was used to represent the producers of food chain and the earthworm *Eisenia andrei* represented the detritivorous.

Lanthanum was more toxic than samarium to both organisms and the toxicity of neodymium was higher than lanthanum to *L. sativa*. A reduction in the biomass was observed, as well as a growth in the germination inhibition percentage (GI%), both with increasing REE concentration. GI% indicates strongly toxic REE samples in *L. sativa* assays and the exposure to REE had a negative effect in its roots development. The results of samarium and lanthanum mixture as well as neodymium assays were antagonistic, while in the neodymium and lanthanum mixture assay the effect was synergic and less toxic than the mixtures previously cited. New assays will be develop to better understand the effect of REE in terrestrial organisms.

Key words: rare earth elements, toxicity, bioindicators

1. Introdução

Os elementos terras raras (ETR) compreendem os elementos da tabela periódica do grupo IIIB, composto por 17 elementos químicos, sendo 15 destes lantanídeos (do lantânio ao lutécio) além do escândio e ítrio (BARRY; MEEHAN, 2000). Os elementos terras raras ocorrem naturalmente em diversos países, sendo a China o maior detentor e líder mundial na produção de óxidos de ETR, assim como o maior consumidor. O crescente interesse nestes elementos deve-se, principalmente, às propriedades espectroscópicas e magnéticas consideradas ímpares (MARTINS; ISOLANI, 2005), o que permite uma variedade de aplicações, especialmente em altas tecnologias cuja demanda vem sendo cada vez maior.

A poluição por ETR advém da mineração, processamento, descarte inapropriados no ambiente de materiais que contenham estes elementos e uso na agricultura, em fertilizantes. Junto com uma baixa reciclagem, pode acarretar em seu acúmulo ambiental (CARPENTER et al., 2015), levando ao aumento de efeitos tóxicos nas áreas expostas e tornando indispensável o acompanhamento da toxicidade destes elementos através do biomonitoramento e da avaliação ecotoxicológica dos ETR. No entanto, muito pouco se conhece a respeito dos potenciais impactos ambientais e toxicológicos dos ETR (BARRY; MEEHAN, 2000).

É fato conhecido que os ETR tem potencial de acumulação no solo, nos ecossistemas hídricos, em organismos vivos e de ocupar sítios de ligações de cálcio. Os ETR possuem ainda potencial para reagir com outros elementos, influenciar processos biológicos e interagir em diferentes funções celulares. Podem substituir elementos essenciais ao organismo, causando assim efeitos no metabolismo e em reações celulares, possivelmente tóxicos, porém os mecanismos de interação com o meio ambiente e com organismos vivos, ainda não estão totalmente esclarecidos (GONZÁLEZ et al., 2015).

Alguns estudos demonstraram que os ETR causam efeitos *positivos no crescimento de vegetais cultivados, principalmente aqueles que passam por estresse hídrico* (HAO et al., 1997) e por esses motivos, os ETR vêm sendo utilizados na agricultura, como parte da mistura de fertilizantes (entre eles o lantânio) e pecuária, como fonte de alimento, com o intuito de melhorar a produção e as características dos produtos cultivados (BARRY; MEEHAN, 2000). Porém, entre os efeitos da exposição de vegetais a altas concentrações de ETR podemos

citar: a redução do crescimento, influência sobre a função radicular, absorção nutricional, redução da germinação de sementes (parâmetro a ser avaliado no presente estudo) e danos aos cloroplastos (CARPENTER et al., 2015).

Embora hajam poucos casos registrados de contaminação por lantanídeos, a exposição ambiental e humana vem aumentando (PAGANO et al., 2015) e há registros de bioacumulação de ETR em solos, vegetais e em cabelo humano na China (HERRMANN et al., 2016).

A Ecotoxicologia é a parte da toxicologia ambiental voltada para a avaliação dos efeitos causados por contaminantes na biota de ecossistemas, considerando a influência de fatores de origem natural e antrópicos (COSTA et al., 2008). O objetivo final deste tipo de estudo é avaliar o efeito de contaminantes sobre os organismos vivos, possibilitando assim, a avaliação de risco, a criação de valores orientadores para disposição ambiental e uma orientação para a tomada de decisões em prol de preservar o meio ambiente (COSTA et al., 2008). Estes estudos são realizados através da aplicação de bioensaios de toxicidade, em condições controladas. A importância destes ensaios advém da impossibilidade de análises físico-químicas em responder qual substância, ou misturas, está causando o efeito tóxico e a forma que essa amostra age na biota exposta, sendo ambas as ferramentas complementares na avaliação ambiental (COSTA et al., 2008).

2. Objetivo

Avaliar o efeito de lantânio, samário e neodímio, elementos terras raras, individualmente e em mistura nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1, sobre a sobrevivência e crescimento de organismos terrestres bioindicadores de ecotoxicidade.

3. Material e Métodos

Os ensaios de ecotoxicidade foram realizados com soluções de lantânio (III – La³⁺), samário (III – Sm³⁺) e neodímio (III – Nd³⁺) individualmente e em misturas nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1. Os organismos testes utilizados neste estudo foram: *Eisenia andrei*, ensaio agudo, um anelídeo pertencente à macrofauna de solos conhecido como minhoca vermelha da Califórnia, e sementes de *Lactuca sativa*, ensaio de brotamento, uma espécie de alface amplamente consumida, ambos bioindicadores padronizados e utilizados em larga escala por pesquisadores da área.

Os resultados foram expressos em CE(I)50, (concentração efetiva mediana inicial que causou toxicidade em 50% dos organismos testados). No modelo de Unidade Tóxica de misturas a Unidade Tóxica foi calculada por
$$UT_m = \frac{\text{Concentração do Elemento na CE50 da Mistura}}{\text{CE50 Individual do Elemento}}$$
 que avalia as interações entre os ETR e seus efeitos. Quando a soma dos constituintes da mistura é igual a 1 o efeito é aditivo ($UT_m = 1$); se a soma é maior que 1 o efeito é sinérgico ($UT_m > 1$) e se a soma é menor que 1 o efeito é antagônico ($UT_m < 1$) (PANOUILLÈRES et al., 2007). As análises estatísticas foram realizadas nos programas Excel 2010 e *Trimmed Spearman-Kärber*.

O cultivo de *E.andrei* foi realizado em esterco bovino curado, trocado mensalmente, com temperatura de 20 ± 2 °C, e fotoperíodo de 16 h luz e 8 h escuro. Os ensaios agudos com *E. andrei*, seguiram a norma ASTM 1676/2004. As amostras foram preparadas com solo artificial tropical - SAT (ASTM, 2004), impregnadas com soluções dos ETR em estudo, em cinco diferentes concentrações, mais o controle apenas com SAT, em triplicata e distribuídas em recipientes-teste de 600 mL, devidamente identificados e contendo 200 g de amostra/réplica (ASTM, 2004). Dez minhocas adultas pesando entre 300 e 600 mg, e cliteladas (estrutura reprodutora desenvolvida), foram dispostas na superfície da amostra. Após a disposição das minhocas, os béqueres foram fechados com filme plástico perfurado para permitir a ventilação. Em seguida cada réplica foi pesada, possibilitando a reposição de água, por comparação com o peso inicial. Os ensaios tiveram duração de 14 dias, nas mesmas condições de cultivo, mas sem alimentação e os parâmetros avaliados foram: mortalidade e efeitos sub-letais (peso). Ao fim dos ensaios as minhocas sobreviventes foram contadas, lavadas, secas e pesadas. Os ensaios foram considerados válidos, quando a mortalidade no controle foi $\leq 10\%$ dos organismos expostos. A concentração efetiva mediana (CE50), baseada na mortalidade dos organismos, foi calculada através do programa *Trimmed Spearman-Kärber*.

Os ensaios de brotamento com alface da espécie *Lactuca sativa L.* seguiram a norma da ISO 17126 (2005). O meio de cultivo utilizado como controle e nas diluições da amostra foi areia de quartzo. Para a preparação das amostras-testes, pratos de 15 cm de diâmetro, foram cobertos com o meio de crescimento (100 gramas de areia de 0,4 e 0,8 mm), sobre os quais 40 sementes foram depositadas e cobertas com 90 g de meio de cobertura (areia de 0,8 a 1,4 mm). Em seguida, as amostras foram umedecidas até aproximadamente 85% da CMRA, com soluções de cinco concentrações dos ETR em estudo, com pH previamente medidos, os controles receberam apenas água deionizada. Após isso, as réplicas foram dispostas em sacos plásticos repletos de ar ambiente, e colocadas aleatoriamente em câmara de B.O.D., onde permaneceram em temperatura de 20 ± 2 °C e no escuro por 48h. As seguintes 120 h do ensaio foram submetidas a um fotoperíodo foi de 16 h de luz e 8 h de escuro. Diariamente o ar dos sacos foi renovado e a disposição das réplicas mudada aleatoriamente. Os ensaios foram realizados em triplicata. Ao final, as sementes brotadas foram contadas, pesadas e foi calculada a média \pm desvio padrão por diluição. Com os resultados obtidos, a CE50 foi calculada com o programa *Trimmed Spearman-Kärber*. A diferença significativa entre os valores foi avaliada através da sobreposição ou não dos Intervalos de Confiança de 95%. Se os limites de confiança EC50 se sobrepuerem, a comparação foi realizada usando o erro padrão das diferenças médias (USEPA, 1985). Para que o ensaio fosse considerado válido, 80% das sementes do controle deveriam ter germinado.

A porcentagem de inibição de germinação (%IG) foi calculada segundo a equação: $\% IG = \frac{GC-GA}{GC} \times 100$ onde:

GC - número de sementes germinadas no controle e **GA** - número de sementes germinadas na amostra. Valores de %IG menor que 10% indicam não toxicidade, valores entre 10 e 25 % indicativo de toxicidade moderada e acima de 25% indicativo de amostra fortemente tóxica (CHAMORRO et al., 2018). As soluções-teste nas misturas foram realizadas nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 de samário, lantânio e neodímio. Os resultados foram expressos em UT_m .

4. Resultados e Discussão

O pH das amostras medido em água, segundo EMBRAPA (1997) esteve entre 5,5 a 6,5, e a umidade na faixa de 40 a 60% da Capacidade Máxima de Retenção de Água (CMRA) (ISO, 2005). Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade com *E. andrei*, demonstraram que o oligoqueta foi mais sensível a lantânio (CE50 1773,43 mg/kg e I.C.95% 1726,37 – 1821,77) do que a samário (CE50 2003,80 mg/kg e I.C.95% 1985,37 – 2022,41). Um estudo com *Lumbriculus variegatus* apresentou uma CL50 de 18,8 mg/L para lantânio (HERRMANN et al., 2016), demonstrando que espécies terrestres são mais resistentes a toxicidade de ETR.

Os ensaios com *L. sativa* (Tabela 1) demonstraram que lantânio possui toxicidade similar a samário e neodímio e que neodímio é mais tóxico que samário. Com o aumento das concentrações, a biomassa dos brotos diminuiu e a porcentagem de inibição de germinação aumentou (Figura 1). Esse fenômeno ocorre em concentrações inferiores às encontradas na CE50, indicando efeitos subletais significativos para os organismos estudados. Este resultado sugere que exposições a concentrações inferiores, tem potencial para afetar as populações de vegetais. Estas suposições podem ser embasadas pelos dados apresentados na tabela 1(B) onde, na maioria dos casos, concentrações inferiores a 100 mg/kg foram capazes de causar um efeito negativo de 50% na biomassa dos brotos resultantes dos ensaios. Estes resultados divergem de Carpenter, e colaboradores (2015) que não encontraram efeito na porcentagem e tempo de germinação de diferentes vegetais expostos a ETR.

Tabela 1. (A) Resultados de Brotamento em CEI50, sete dias, Intervalo de Confiança (Inferior e Superior) e Unidade Tóxica (UT) dos ensaios de ecotoxicidade com soluções sintéticas de Samário, Lantânio e Neodímio individualmente e em mistura de diferentes proporções. (B) Resultados de biomassa em CE50, sete dias, Intervalo de Confiança (Inferior e Superior) dos ensaios de ecotoxicidade com soluções sintéticas de Samário, Lantânio e Neodímio individualmente e em mistura de diferentes proporções. Letras iguais = diferença não significativa.

Elemento / Mistura	(A) Brotamento			Unidade Tóxica	Efeito
	CE ₅₀ (mg/kg)	I. C. I. (95%)	I. C. S. (95%)		
Samário	917,35 ^a	848,63	991,63		
Lantânio	832,65 ^{ab}	747,33	927,70		
Neodímio	753,02 ^b	678,24	836,05		
Sm + La (1:1)	585,30 ^c	551,99	620,62	0,67	Antagônico
Sm + La (1:2)	680,39 ^d	622,99	743,08	0,79	Antagônico
Sm + La (2:1)	766,18 ^{de}	683,73	858,56	0,86	Antagônico
Sm + Nd (1:1)	637,30 ^{cdfg}	585,16	694,08	0,77	Antagônico
Sm + Nd (1:2)	757,99 ^{deg}	692,51	829,65	0,95	Antagônico
Sm + Nd (2:1)	663,94 ^{defg}	599,10	735,80	0,78	Antagônico
Nd + La (1:1)	849,77 ^{egh}	766,28	942,35	1,07	Sinérgico
Nd + La (1:2)	838,66 ^{eghi}	770,41	912,96	1,04	Sinérgico
Nd + La (2:1)	904,73 ^{ehi}	795,87	1028,49	1,16	Sinérgico

Em termos qualitativos, foi observada uma diferença no tamanho e formato das raízes dos brotos germinados a partir da primeira concentração teste, tendo o controle (Figura 2A) raízes mais longas, enquanto nas concentrações teste (Figura 2B), as raízes eram muito reduzidas, corroborando com outro estudo que citou a redução do crescimento, influência na função radicular e absorção nutricional, redução da germinação de sementes e danos aos cloroplastos (CARPENTER et al., 2015) em vegetais expostos a altas concentrações de ETR.

Nas misturas Sm + La na proporção 1:1 é diferente e mais tóxica das duas outras, que são similares entre si, e similar a mistura Sm + Nd 1:1. Nas misturas Sm + Nd e Nd + La as três proporções são similares entre si. As interações foram antagônicas nas diferentes proporções das misturas Sm + La e Sm + Nd. Apenas nas três proporções da mistura Nd + La a interação foi sinérgica. O fato de o efeito sinérgico ter ocorrido apenas nas misturas de neodímio com lantânio, sugere que samário teria influência sobre o antagonismo das misturas no qual ocorre. Os resultados de unidades tóxicas destas misturas discordam de Tai e colaboradores (2010), que sugerem efeito aditivo em misturas de lantanídeos em mesma proporção.

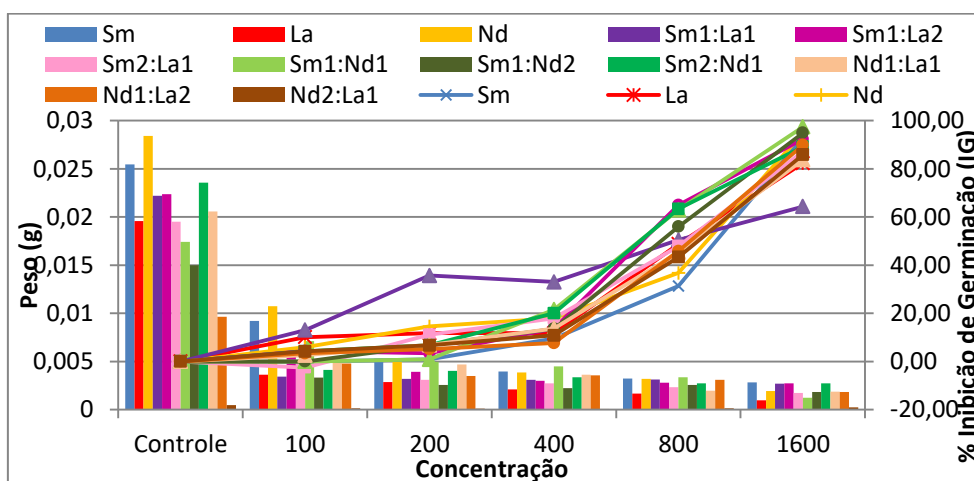


Figura 1. Biomassa das sementes brotadas nos ensaios com *L. sativa* em solo artificial tropical (SAT) e % de Inibição de Germinação. Sm – samário, La – lantânio, Nd – Neodímio.

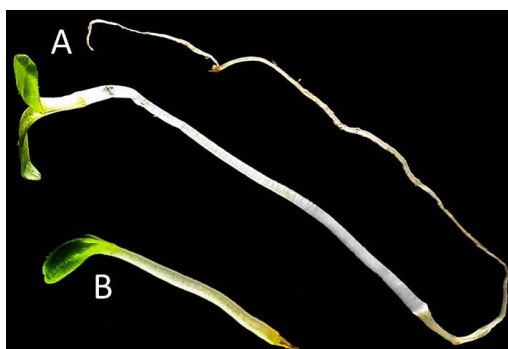


Figura 2. (A) broto após sete dias de ensaio proveniente de amostra controle. (B) broto após sete dias de ensaio proveniente de amostra teste na menor concentração utilizada no ensaio.

5. Conclusão

L. sativa apresentou os menores valores de CE50 comparado a *E. andrei*. Samário foi o elemento menos tóxico para ambas as espécies estudadas. A biomassa dos brotos germinados nos ensaios diminuiu com o aumento das concentrações dos ETR. A %IG indica amostras fortemente tóxicas acima de 400 mg/kg. Os efeitos observados nos ensaios de mistura com *L. sativa* foram antagônicos para todas as misturas de samário com lantânio e de samário com neodímio e sinérgico nas misturas de neodímio com lantânio. Samário parece agir sobre as amostras levando a um efeito tóxico antagônico, onde está presente. Para uma melhor compreensão do efeito dos lantanídeos sobre o brotamento de *L. sativa* e a sobrevivência de *E. andrei*, novos ensaios ainda serão realizados para avaliar o efeito de samário, lantânio e neodímio, individualmente e em mistura e, com isso, gerar uma melhor compreensão do efeito dos ETR sobre organismos responsáveis pela base da cadeia alimentar terrestre.

6. Agradecimento

À M.Sc. S. Egler, pela supervisão durante o período da bolsa e pelos conhecimentos transmitidos a mim. À A.F.G.O. Clementino, G.O. Santos e G. Heidelmann pela assistência prestada durante a elaboração dos ensaios. À M. Nascimento e A.L.C. Moraes pelas soluções sintéticas fornecidas. À E. Giese pelo auxílio em discussões na fase de elaboração do projeto. Ao CETEM pela estrutura fornecida. Ao MCTIC em conjunto com o CNPq pela bolsa concedida.

7. Referências Bibliográficas

ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus***. ASTM 1676-04, 2004.

BARRY, M.J.; MEEHAN, B.J. The acute and chronic toxicity of lanthanum to *Daphnia carinata*. **Chemosphere** v.41, p. 1669-1674, 2000.

CARPENTER, D.; BOUTIN, C.; ALLISON, J.E.; PARSONS, J.L.; ELLIS, D.M. Uptake and Effects of Six Rare Earth Elements (REEs) on Selected Native and Crop Species Growing in Contaminated Soils. **Plos One**. v.10, n. 6, p. 1-21. 2015.

CHAMORRO, S.; BARATA, C.; PIÑA, B.; CASADO, M.; SCHWARZ, A.; SÁEZ, K.; VIDAL, G. *Toxicological analysis of acid mine drainage by water quality and land use bioassays*. **Mine Water Environ**, v. 37, p. 88-97. 2018.

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.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – **Manual de métodos de análise de solo**. 2ª. Edição. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, MAPA. 1997. 212 p.

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.

HAO, S.; XIAORONG, W.; LIANSHENG, W.; LEMEI, D.; ZHONG, L.; YIJUN, C. Bioconcentration of rare earth elements lanthanum, gadolinium and yttrium in Algae (*Chlorella vulgarize* Beijerinck): influence of chemical species. **Chemosphere**, v. 34, n. 8, p. 1753-1760, 1997.

HERRMANN, H.; NOLDE, J.; BERGER, S.; HEISE, S. Aquatic ecotoxicity of lanthanum – A review and an attempt to derive water and sediment quality criteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 124, p. 213-238. 2016.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Soil quality— determination of the effects of pollutants on soil flora—Screening test for emergence of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L.)**. ISO 17126, 2005, 13p.

MARTINS, T. S.; ISOLANI, P. C. *Terras Raras: Aplicações Industriais e Biológicas*. **Química Nova**. v. 28, n.1, p.111-117. 2005.

PAGANO, G.; ALIBERTI, F.; GUIDA, M.; ORAL, R.; SICILIANO, A.; TRIFUOGGI, M.; TOMMASI, F. *Rare earth elements in human and animal health: State of art and research priorities*. **Environmental Research**. v. 142, p. 215 -226. 2015.

PANOUILLERES, M.; BOILLOT, C.; PERRODIN, Y. Study of combined effects of a peracetic acid-based disinfectant and surfactants contained in hospital effluents on *Daphnia similis*, *Ecotoxicology*, v. 16, p. 327-340. 2007.

USEPA – United States Environmental Protection Agency – **Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms**. EPA-600/4-85/013. 1985, 275 p.