

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CIÊNCIA DO SOLO**

**DISSERTAÇÃO**

**Ensaio Ecotoxicológico como Auxílio na  
Determinação de Valores Orientadores para Cobre e  
Chumbo**

**Bruna Faria Simões**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS COMO AUXÍLIO NA  
DETERMINAÇÃO DE VALORES ORIENTADORES PARA  
COBRE E CHUMBO**

**BRUNA FARIA SIMÕES**

*Sob a Orientação do Professor*

**Nelson Mazur**

*e Coorientação da Professora*

**Maria Elizabeth Fernandes Correia**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra** em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ  
Fevereiro, 2015

631.4  
S593e  
T

Simões, Bruna Faria, 1989-

Ensaio ecotoxicológico como auxílio na determinação de valores orientadores para cobre e chumbo / Bruna Faria Simões – 2015.

61 f.: il.

Orientador: Nelson Mazur.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo.

Bibliografia: f. 41-49.

1. Solos – Teses. 2. Solos – Contaminação – Teses. 3. Metais pesados – Teses. 4. Solos – Teor de cobre – Teses. 5. Solos – Teor de chumbo – Teses. 6. Toxicologia ambiental – Teses. 7. Ecologia dos solos – Teses. I. Mazur, Nelson, 1955-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA-CIÊNCIA DO SOLO

**BRUNA FARIA SIMÕES**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra** no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 26/02/2015.

---

Nelson Mazur. Dr. UFRRJ  
(Orientador)

---

Julia Carina Niemeyer. Dra. UFSC

---

Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho. Dr. UFRRJ

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, por ter me abençoado e iluminado o meu caminho em cada etapa da minha vida. Sem o Senhor nada seria possível.

Agradeço aos meus pais por toda educação e amor que me deram. A partir deles pude ir construindo minha vida.

Aos meus avós por terem educado aos meus pais e a mim, por todo amor e dedicação e apoio.

Aos meus irmãos, por serem companheiros no meu amadurecimento e por dividir a vida comigo.

A minha família, que é minha base. Por ser tão acolhedora, amorosa e divertida. Com vocês não preciso de mais nada.

Aos meus amigos, que nas horas que precisei sorrir e me divertir estavam lá e nas horas mais difíceis também estavam, com certeza a vida seria menos leve sem vocês.

Aos companheiros do Laboratório de Química e Poluição do Solo, onde trabalhei por 5 anos, além de ser uma ótima equipe de trabalho, também são ótimos amigos.

Aos companheiros de Laboratório de Fauna do Solo-EMBRAPA, pela ajuda na confecção do trabalho e por todas as dúvidas que me tiraram.

Aos meus orientadores, Nelson Mazur e Maria Elizabeth Fernandes Corrêa por me orientar e auxiliar no desenvolvimento deste trabalho.

A banca por ter aceitado o convite de avaliar meu trabalho, por toda contribuição para o engrandecimento do trabalho.

Aos companheiros de curso que foram uma ótima turma, por auxiliar nos estudos para provas, pelas ótimas viagens de campo e momentos descontraídos em sala de aula.

Aos docentes do curso por contribuir na minha formação ensinando o que era necessário.

Aos funcionários do CPGA-CS por toda ajuda e paciência nas situações necessárias.

E ao CNPq pelo financiamento do projeto e a bolsa durante todo o processo.

## **BIOGRAFIA**

Bruna Faria Simões nasceu em Campos dos Goytacazes, interior do Rio de Janeiro, em 13 de julho de 1989. Morou em Niterói até os 6 anos, e depois em Nova Iguaçu, onde passou a maior parte da vida. É filha do doutor em geografia urbana Manoel Ricardo Simões e da psicóloga Kátia Peixoto Faria Simões. Possui dois irmãos mais novos. Estudou em 6 escolas no ensino fundamental, se formou em inglês, praticou dança da infância a até a formação de ensino médio. Concluiu o ensino médio técnico pelo IFRJ-Nilópolis em 2006, sendo técnica em Controle Ambiental. Estagiou na empresa BFU do Brasil nesse período. Os estudos no ensino técnico influenciaram a continuar na área de meio ambiente, onde foi cursar Ciências Biológicas na UFRRJ, ingressando em 2008. Estagiou no laboratório de Química e Poluição do Solo do departamento de solos da UFRRJ sendo bolsista do CNPq de 2010 a 2012. Formou-se em Licenciatura trabalhando com divulgação científica e o bacharel com contaminação do solo. Terminou a graduação em 2012 e ingressou no mestrado no Curso de Pós-Graduação em Agronomia Ciência do Solo em 2013. Já trabalhou na área de educação como professora de Biologia e ciências, divulgação científica, na área de contaminação de solo, disposição de resíduos e legislação ambiental.

## RESUMO

SIMÕES, Bruna Faria. **Ensaio ecotoxicológicos como auxílio na determinação de valores orientadores para cobre e chumbo** 2015. 49f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

A contaminação de solos por metais pesados requer que haja medidas compensatórias e de prevenção. O CONAMA (2009) estabeleceu valores orientadores que determinam as concentrações de substâncias do solo que não causam alteração nas funções básicas exercida pelo solo. Um dos instrumentos que pode auxiliar na determinação desses valores são os ensaios ecotoxicológicos. Este estudo verificou as concentrações de chumbo e cobre que causam alteração no desenvolvimento da *Eisenia andrei* e no *Folsomia candida* e comparou os resultados obtidos com os valores propostos pelo CONAMA (2009). Foram utilizados três solos de diferentes características físicas e químicas encontrados no Estado do Rio de Janeiro. Os metais Cobre e Chumbo foram adicionados ao solo em diferentes concentrações. Foram feitos ensaios de fuga, letalidade e reprodução para *Eisenia andrei* e reprodução e letalidade para *Folsomia candida*. No ensaio de cobre com *Eisenia andrei* foi encontrado valor de  $CE_{50}$  para Planossolo e Argissolo de 28 e 61  $mg.kg^{-1}$ , respectivamente, para Latossolo não foi possível calcular. Também foi obtido para o mesmo metal uma  $CL_{50}$  para Planossolo, Latossolo e Argissolo de 435, 690 e 691  $mg.kg^{-1}$ , respectivamente. No ensaio com chumbo, utilizando *E. andrei*, uma  $CE_{50}$  para Planossolo e Argissolo de 14 e 54  $mg.kg^{-1}$ , respectivamente, não sendo possível calcular esse valor para Latossolo. Foi calculado uma  $CL_{50}$ , com o mesmo metal, para Planossolo, Latossolo e Argissolo de 437, 1825, 1869  $mg.kg^{-1}$ , respectivamente. Diferentemente o *Folsomia candida* apresentou para o cobre no Planossolo, Latossolo e Argissolo  $CE_{50}$  117, 299, 138,  $mg.kg^{-1}$ , respectivamente. Nos ensaios com chumbo para o *Folsomia candida*, foi encontrado uma  $CE_{50}$  552 e 782  $mg.kg^{-1}$  para Planossolo e Argissolo respectivamente. Não foi possível calcular os resultados para o Latossolo. No Planossolo contaminado com chumbo a *Folsomia candida* teve uma  $CL_{50}$  762  $mg.kg^{-1}$ , nos outros solos não foi possível calcular esse valor. Em cada solo foi obtido um valor de  $CE_{50}$  diferente. A *Eisenia andrei* foi mais sensível aos metais que o *Folsomia candida*. A sensibilidade dos organismos à contaminação foi maior no Planossolo, apresentando valores de  $CE_{50}$  e  $CL_{50}$  mais baixos em todos os ensaios. As concentrações de metais que causam alteração na fauna do solo diferem das concentrações sugeridas pelo CONAMA (2009).

**Palavras-chave:** *Folsomia cãndida*. *Eisenia Andrei*.  $CL_{50}$ . Contaminação do Solo. Ecotoxicologia.

## ABSTRACT

SIMÕES, Bruna Faria. **Assay as ecotoxicological aid in the determination of guiding values for copper and lead**, 2015. 49p. Dissertação ((Master Degree in Agronomy, Soil Science)). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The heavy metal contamination of soils requires compensatory and preventive measures. CONAMA (2009) established soil screen levels (valor's guides) which determine the soil concentrations of substances that causes no change in its function. One of the tools that can help in determining these values are the ecotoxicological tests. This study tested metal concentrations that cause change in *Eisenia andrei* and *Folsomia candida* and compared the results with the values proposed by CONAMA (2009). It was used three soils of different physical and chemical characteristics located on the state of Rio de Janeiro. The copper and lead were added in soils at different concentrations. Were made Avoidance tests, mortality and reproduction to *Eisenia andrei* and reproduction and mortality for *Folsomia candida*. To *Eisenia andrei* was found for Planossolo and Argissolo an EC<sub>50</sub> value 28 and 61 mg.kg<sup>-1</sup>, respectively, Latossolo could not be calculated. For same metal it got for Planossolo, Latossolo and Argissolo LC<sub>50</sub> 435, 690 and 691 mg.kg<sup>-1</sup>, respectively. To lead it was found for Planossolo and Argissolo an EC<sub>50</sub> 14 and 54 mg.kg<sup>-1</sup>, respectively, it was not possible to calculate for Latossolo, and LC<sub>50</sub> for Planossolo, Latossolo and Argissolo of 437, 1825, 1869 mg.kg<sup>-1</sup>, respectively. Unlike the *Folsomia candida* presented an EC<sub>50</sub> for copper in Planossolo, Latossolo and Argissolo of 117, 299, 138, mg.kg<sup>-1</sup>, respectively. In tests with lead for *Folsomia candida*, was found an EC<sub>50</sub> of 552, 782 mg.kg<sup>-1</sup> for Planossolo and Argissolo respectively. Could not calculate the results for the Latossolo. In Planossolo contaminated by lead *Folsomia candida* had a LC<sub>50</sub> 762 mg.kg<sup>-1</sup>, the other soils could not be calculated. Each soil was obtained a different EC<sub>50</sub> value. The *Eisenia Andrei* was more sensitive to the metal than *Folsomia candida*. The Planossolo was the most restrictive soil to contamination, with EC<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub> values lower in all tests. The concentrations of metals that cause changes in soil fauna are different from concentrations suggested by CONAMA (2009).

**Key words:** *Eisenia Andrei*. *Folsomia cândida*. LC<sub>50</sub>. Soil contamination. Ecotoxicology.

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Amostras dos solos coletados. Da esquerda para direita: Planossolo, Argissolo e Latossolo.....	12
<b>Figura 2.</b> Esquema de montagem do teste de fuga. A= controle; B= resíduo. Loureiro et al. (2005).....	15
<b>Figura 3.</b> Montagem do ensaio de fuga. ....	15
<b>Figura 4.</b> Registro da umidade e temperatura da sala de experimentação.....	16
<b>Figura 5.</b> Disposição dos frascos de ensaio na sala de experimentação. ....	16
<b>Figura 6.</b> Frascos prontos para ensaio de reprodução de Collembola.....	17
<b>Figura 7.</b> Quantidade média de Juvenis e porcentagem de letalidade dos adultos de <i>Enchytraeus crypticus</i> durante o ensaio de reprodução e letalidade realizado com três solos naturais. ....	18
<b>Figura 8.</b> Ensaio preliminar de reprodução e letalidade de Enquitreídeo.....	18
<b>Figura 9.</b> Média do percentual de fuga (% response) de <i>E. andrei</i> para as quatro réplicas, após ensaio de fuga nos três solos contaminados com Cobre ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ). Linha pontilhada indica erro. Dados negativos não indicam fuga. * diferença significativa pelo teste de Fisher. ..	19
<b>Figura 10.</b> <i>E. andrei</i> se deslocando para o lado do controle assim que colocada no recipiente contendo cobre no Planossolo. C= controle e D6= dose de $700 \text{ mg.kg}^{-1}$ . ....	21
<b>Figura 11.</b> Taxa de letalidade em porcentagem da <i>E. andrei</i> durante o ensaio de letalidade diante das concentrações de cobre em $\text{mg.kg}^{-1}$ . ....	21
<b>Figura 12.</b> Relação entre número médio de Juvenis de <i>E. andrei</i> durante o ensaio de reprodução com diferentes doses de Cobre em $\text{mg.kg}^{-1}$ . Barra de Erro. * dose onde ocorreu diferença significativa pelo programa estatístico Statistica.....	22
<b>Figura 13.</b> Taxa de letalidade em porcentagem da <i>F. candida</i> durante o ensaio de letalidade diante das concentrações de cobre em $\text{mg.kg}^{-1}$ . ....	25
<b>Figura 14.</b> Relação entre número médio de Juvenis de <i>F. candida</i> no ensaio de reprodução nas diferentes doses de Cobre em $\text{mg.kg}^{-1}$ . Barra de Erro. * dose onde ocorreu diferença significativa pelo programa estatístico Statistic. ....	25
<b>Figura 15.</b> Fungo no solo da dose de $700 \text{ mg.kg}^{-1}$ de Cu no ensaio com <i>Folsomia candida</i> indicando que os organismos não se alimentaram corretamente.....	26
<b>Figura 16.</b> Média do percentual de fuga (% response) com <i>E. andrei</i> para as quatro réplicas, após ensaio de fuga nos três solos contaminados com Chumbo ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ). Linha pontilhada indica erro. Dados negativos não indicam fuga. * Diferença significativa pelo teste de Fisher. ....	29
<b>Figura 17.</b> Taxa de letalidade em porcentagem da <i>E. andrei</i> diante das concentrações de chumbo em $\text{mg.kg}^{-1}$ . ....	31
<b>Figura 18.</b> Relação entre número médio de Juvenis de <i>E. andrei</i> nas diferentes doses de Chumbo em $\text{mg.kg}^{-1}$ . Barra de Erro. * Dose onde ocorreu diferença significativa pelo programa estatístico Statistica. ....	31
<b>Figura 19.</b> Taxa de letalidade em porcentagem da <i>F. candida</i> diante das concentrações de chumbo em $\text{mg.kg}^{-1}$ . ....	34

- Figura 20.** Relação entre número médio de Juvenis de *F. candida* nas diferentes doses de Chumbo em  $\text{mg.kg}^{-1}$  nos três solos. Barra de Erro. \* Diferença estatística significativa pelo programa Statistica. .... 35
- Figura 21.** Fungo nas maiores doses de Chumbo, indicando que os *F. candida* não se alimentaram. .... 35

## LISTAS DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Teores pseudototais de metais pesados ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ).....	13
<b>Tabela 2.</b> Análise química do solo.....	13
<b>Tabela 3.</b> Atributos físicos dos solos .....	13
<b>Tabela 4.</b> Concentrações de cobre e chumbo no solo após adição da solução em $\text{mg.kg}^{-1}$ de solo.....	14
<b>Tabela 5.</b> Valores de CENO (Concentração de Efeito não Observado), CEO (Concentração de Efeito Observado), $\text{CE}_{50}$ (Concentração Efetiva Média), $\text{CL}_{50}$ (Concentração Letal Média), para o cobre em $\text{mg.kg}^{-1}$ nos três solos obtidas através dos ensaios de reprodução e letalidade realizados com <i>E. andrei</i> .....	23
<b>Tabela 6.</b> Valores de CENO (Concentração de Efeito não Observado), CEO (Concentração de Efeito Observado), $\text{CE}_{50}$ (Concentração Efetiva Média), $\text{CL}_{10}$ (Concentração Letal Média), para o cobre em $\text{mg.kg}^{-1}$ nos três solos obtidas através dos ensaios de reprodução realizados com <i>Folsomia cándida</i> . .....	27
<b>Tabela 7.</b> Valores de CENO (Concentração de Efeito não Observado), CEO (Concentração de Efeito Observado), $\text{CE}_{50}$ (Concentração Efetiva Média), $\text{CL}_{50}$ (Concentração Letal Média), para o chumbo em $\text{mg.kg}^{-1}$ nos três solos obtidas através dos ensaios realizados com <i>E. Andrei</i> . .....	32
<b>Tabela 8.</b> Valores de CENO (Concentração de Efeito não Observado), CEO (Concentração de Efeito Observado), $\text{CE}_{50}$ (Concentração Efetiva Média), $\text{CL}_{50}$ e $\text{CL}_{10}$ (Concentração Letal Média), para o chumbo em $\text{mg.kg}^{-1}$ nos três solos obtidas através dos ensaios de reprodução realizados com <i>Folsomia cándida</i> . .....	36
<b>Tabela 9.</b> Valores de CENO (Concentração de Efeito não Observado), $\text{CE}_{50}$ (Concentração Efetiva Média), $\text{CL}_{50}$ e $\text{CL}_{10}$ (Concentração Letal Média) para cobre e chumbo em $\text{mg.kg}^{-1}$ nos três solos obtidas através dos ensaios de reprodução e letalidade realizados com <i>Folsomia candida</i> e <i>Eisenia andrei</i> . .....	37

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Metais Pesados .....	2
2.3. Cobre .....	3
2.4. Chumbo .....	3
2.5. Breve Histórico sobre a Determinação dos Valores Orientadores .....	4
2.6. Valores Orientadores .....	5
2.7. Avaliação Ecotoxicológica .....	6
2.7.1. Teste de fuga ( <i>Avoidance test</i> ).....	7
2.7.2. Teste de letalidade .....	8
2.7.3. Teste de reprodução.....	8
2.8. Indicadores Biológicos .....	8
2.8.1. Colêmbola.....	9
2.8.2. Enquitreídeos.....	9
2.8.3. Minhocas .....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Delineamento Experimental .....	12
3.2. Amostragem do Solo .....	12
3.3. Análise do Solo.....	12
3.4. Contaminação do Solo em Laboratório .....	14
3.5. Instalação e Condução dos Ensaios Biológicos.....	14
3.6. Ensaio de Fuga ( <i>Avoidance test</i> ) .....	15
3.7. Ensaio de Toxicidade Crônica e Aguda .....	15
3.7.1. <i>Eisenia andrei</i> .....	15
3.7.2. <i>Folsomia cãndida</i> .....	16
3.7.3. <i>Enchytraeus crypticus</i> .....	17
3.8. Análise Estatística.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1. Ensaio Preliminar .....	18
4.1.1. <i>Eisenia andrei</i> : ensaio de fuga.....	19
4.1.2. <i>Eisenia andrei</i> : ensaio de letalidade e reprodução .....	21
4.1.3. <i>Folsomia cãndida</i> : ensaio de letalidade e reprodução.....	24
4.2. Chumbo .....	28
4.2.1. <i>Eisenia andrei</i> : ensaio de fuga.....	28
4.2.2. <i>Eisenia andrei</i> : ensaio de letalidade e reprodução .....	30
4.2.3. <i>Folsomia cãndida</i> : ensaio de letalidade e reprodução.....	33
4.3. Discussão Geral .....	37
5. CONCLUSÕES .....	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41

## 1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos solos é um problema que atinge a sociedade, podendo causar danos à fauna e a flora, além de oferecer riscos à saúde humana. A fauna do solo é afetada diretamente quando há contaminação do mesmo, podendo até ser extinta de acordo com o grau de septicemia. Diante de possíveis danos à fauna do solo é necessário que se estabeleçam medidas de prevenção à contaminação do solo e também medidas compensatórias.

Os metais pesados se dispostos inadequadamente podem ser um dos fatores de contaminação do solo. A maioria dos metais pesados são considerados tóxicos aos seres vivos, mesmo que em baixas concentrações, dentre estes metais podem-se destacar o cobre e o chumbo.

No relatório de áreas contaminadas realizado pela CETESB (2011), a contaminação por metais pesados ocupou a quarta posição do *ranking* entre as áreas contaminadas de São Paulo, sendo uma das principais fontes de contaminação do solo. Em geral, a contaminação está associada aos produtos e resíduos provenientes das explorações de minas, indústrias, pesticidas, fungicidas, fertilizantes, lodo de esgoto, combustíveis e outros.

A legislação brasileira estabelece valores orientadores de substâncias químicas, determinados pela Resolução CONAMA 420 (2009). Tais valores determinam os limites de concentrações de substâncias no solo, que não causam alterações em suas funções. Os valores foram definidos a partir de análises químicas, de fitotoxicidade e cálculos matemáticos. Neste caso, não foram utilizados ensaios com espécies representantes da fauna do solo para seu estabelecimento, porém consta na legislação que testes ecotoxicológicos podem ser utilizados como instrumento de avaliação.

Os testes ecotoxicológicos avaliam as interações das substâncias químicas com os ambientes e os organismos, sendo observados os danos que podem alterar seu ciclo de vida. Esses testes podem ser comportamentais, como de fuga, ou relacionados ao ciclo de vida, como de letalidade e reprodução. Podendo ser utilizados como instrumentos para determinação de valores orientadores, pois determinam as concentrações de substâncias que podem causar danos à fauna do solo. Para isto, é necessário que organismos bioindicadores de diferentes níveis tróficos sejam utilizados. Deve-se considerar o nicho ecológico e seu funcionamento na comunidade do solo.

É utilizado como padrão, nestes testes, o solo artificial, proposto pela OECD e outros órgãos, para testar as substâncias no solo, porém, o mesmo não reflete as condições reais, havendo outros fatores no solo natural, que podem influenciar na disponibilidade das substâncias, principalmente quando se trata de metais pesados, portanto, é necessário que se faça avaliação de substâncias em diferentes tipos de solos naturais, pois seu comportamento pode variar diante do substrato em que será exposto.

O objetivo deste trabalho foi verificar qual a concentração de Cobre e Chumbo pode comprometer o ciclo de vida da *Eisenia andrei* (Oligochaeta) e *Folsomia candida* (Collembola) em três solos com diferentes características físicas e químicas, localizados no Estado do Rio de Janeiro. Também buscou-se comparar nos testes biológicos se os mesmos estão de acordo com os valores orientadores, determinados na legislação, a partir, de análises químicas e modelos matemáticos. Além de reforçar a importância dos testes ecotoxicológicos na construção das legislações ambientais.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Metais Pesados

A presença de metais pesados no solo pode ser de origem natural ou de origem antrópica. Os processos naturais que contribuem para a presença de metais pesados no solo são a priori, resultantes do padrão de intemperismo em combinação com a composição do material de origem das rochas, enquanto as fontes antropogênicas estão associadas principalmente a mineração, aplicação de defensivos agrícolas e fertilizantes, lodos de esgotos urbanos e/ ou industriais, queima de combustíveis fósseis, águas residuárias, resíduos industriais de beneficiamento químico (KABATA; PENDIAS, 2001). Alguns solos podem ter naturalmente maior teor de determinado metal pesado que outros. Em geral, os solos derivados de basalto, granito e siltito, tendem a ter nesta mesma ordem, uma sequência decrescente de conteúdo dos metais pesados, com variações conforme a localização geográfica. O basalto e o siltito têm a mesma tendência às variações do conteúdo de óxidos de ferro do solo (SPOSITO, 2008).

Os metais pesados podem estar presentes no solo em diversas formas: solúveis; trocáveis; precipitados; adsorvidos especificamente; retido em material orgânico; oclusos nos óxidos (SPOSITO, 2008). Os metais da fase solúvel encontram-se na forma de íons livres ou associados a moléculas orgânicas solúveis. As espécies trocáveis encontram-se ligadas aos coloides do solo por forças eletrostáticas. Também podem ainda formar precipitados com carbonatos, sulfetos, fosfatos e hidróxidos. Os íons adsorvidos especificamente encontram-se ligados aos coloides minerais e orgânicos por meio de ligações covalentes e iônicas, que são muito difíceis de serem desfeitas. Os metais oclusos em óxidos de Fe, Al e Mn fazem parte da estrutura cristalina dos minerais (AMARAL SOBRINHO et al. 2009). Na avaliação da disposição dos metais pesados no solo é de fundamental importância o entendimento do comportamento e interações desses elementos no solo com seus constituintes, sua mobilização e sua estabilidade frente a mudanças físico-químicas como: variações de pH; oxidação/redução, adsorção e ação microbiana (SHEPPARD; THIBAUT, 1992).

As características do solo que mais influenciam na especiação do metal são: as fases de adsorção (argila, matéria orgânica, e oxihidróxidos), quantidade de sítios de sorção disponíveis, que está relacionado com a capacidade de troca de cátions (CTC), e pH (JASSEN, 1997; LOCK, 2000). Esses fatores influenciam na disponibilidade dos metais no solo, variando de acordo com o tipo de solo. A disponibilidade de metais no solo influencia na absorção de metais pelos organismos.

Segundo relatório da CETESB (2011) sobre áreas contaminadas do estado de São Paulo, a contaminação de solos por metais pesados aparece em quarto lugar entre as principais razões de contaminação de áreas da cidade, perdendo apenas pela contaminação de derivados de petróleo, contabilizando 543 áreas no Estado. Dentre os diversos poluentes que um solo pode armazenar, os metais pesados se destacam pelo fato de serem bastante estáveis na natureza, portanto passíveis de serem acumulados no solo e em sistemas biológicos ao longo do tempo (AMARAL SOBRINHO et al., 2009).

Alguns metais pesados são considerados essenciais ao metabolismo, outros não desempenham qualquer função do organismo, porém mesmo os essenciais, acima de certa concentração, podem ser considerados tóxicos ao organismo (MATTIAZZO-PREZOTO, 1994). Neste trabalho serão abordados os metais cobre (que é essencial a muitos organismos) e chumbo (que não desempenha função conhecida no organismo).

### 2.3. Cobre

O Cobre é abundante na natureza na forma de sulfetos, arsenitos, cloretos e carbonatos (CETESB, 2012b). As principais fontes antropogênicas do cobre são: mineração, fundição, queima de carvão como fonte de energia e incineração de resíduos. As emissões por uso como agente antiaderente em pinturas, excreção de animais e lançamento de esgotos são menos relevantes (WHO, 2004). Também ocorre por aplicação de fertilizantes e defensivos agrícolas (CHAVES et al., 2009; MARTINS, 2005).

No solo o cobre é adsorvido fortemente aos materiais de argila, em uma forma dependente do pH, a adsorção é aumentada pela presença de materiais orgânicos em partículas. Íons de cobre dissolvidos no solo são removidos da solução por adsorção nas superfícies das argilas e sólidos orgânicos, ou por precipitação (BARCELOUX, 1999; LANDNER; LINDESTROM, 1999). As concentrações de cobre na água potável geralmente aumentam especialmente em sistemas de água com um pH ácido ou alto teores de carbonatos (EPA EUA, 1995). O cobre pode ser absorvido por organismo se estiver livre na solução do solo.

O cobre é essencial aos organismos em doses pequenas. Nos humanos o cobre é necessário para o bom funcionamento de muitos sistemas de enzimas importantes. Os Estados Unidos da América e o Canadá estabeleceram recentemente uma ingestão diária recomendada para adultos de  $900 \mu\text{g dia}^{-1}$  de cobre (WHO, 2004). Porém, em geral, as ingestões dietéticas de cobre para adultos variam de 1 a  $3 \text{ mg dia}^{-1}$  (IOM, 2001).

Apesar de ser essencial ao ser humano, ingestões crônicas ou agudas, acima do valor recomendado podem causar problemas de saúde. A ingestão de sais de cobre pode causar vômito, letargia, anemia hemolítica aguda, dano renal e hepático e, em alguns casos, morte. As crianças são mais sensíveis aos efeitos da exposição ao cobre. A exposição prolongada a concentrações elevadas do metal em alimentos ou água pode causar dano ao fígado de crianças. Trabalhadores expostos a fumos e poeiras de cobre podem apresentar irritação no nariz, boca e olhos, cefaleia, náusea, vertigem e diarreia (CETESB, 2012b; WHO, 2004).

O cobre é excretado do corpo pela bile, fezes, suor, cabelo, menstruação e urina (LUZA; SPEISKY, 1996; COX, 1999). Nos seres humanos normais, menos de 3% da ingestão diária de cobre é excretado na urina (LUZA; SPEISKY, 1996).

### 2.4. Chumbo

O chumbo é pouco abundante na crosta terrestre, ocorre em vários minerais, sendo o principal a galena (PbS), também se apresenta na forma de carbonato e sulfato de chumbo (CETESB, 2012a).

O chumbo metálico é empregado em indústrias químicas e de construção, como ingrediente em soldas, lâminas de proteção contra raios X, material de revestimento na indústria automotiva, revestimento de cabos e está presente em várias ligas. Os óxidos de chumbo são usados em placas de baterias elétricas e acumuladores, vitrificados, esmaltes, componentes para borracha. Os sais de chumbo formam a base de tintas e pigmentos. Cerca de 40% do chumbo é usado como metal, 25% em ligas e 35% em compostos químicos. O chumbo na forma orgânica, principalmente o *Tetra-ethyl-chumbo*, que foi utilizado na gasolina, é extremamente perigoso, sendo mais perigoso do que a forma inorgânica (CETESB, 2012a). No caso de contaminação aguda de chumbo, podem ocorrer as seguintes reações: apatia; agitação; irritabilidade; falta de capacidade de concentração; dores de cabeça; tremores musculares; cólicas abdominais; dano renal; alucinações; perda de memória; encefalopatia. Essas reações ocorrem em níveis de chumbo no sangue de  $100\text{-}120 \mu\text{gdl}^{-1}$  em adultos e  $80\text{-}100 \mu\text{g dl}^{-1}$  em crianças. Em muitos casos, crianças que sobrevivem a uma

intoxicação aguda por chumbo passam a ter déficit na sua função de desenvolvimento neurológico (WHO, 2011).

As concentrações de metais aceitáveis para ingestão diária foram definidas após pesquisas e testes. Os resultados influenciaram na determinação de valores orientadores que será visto a seguir.

## 2.5. Breve Histórico sobre a Determinação dos Valores Orientadores

A primeira legislação feita de acordo com a preocupação da qualidade do solo foi a Lista Holandesa ou Lista ABC, que determina o valor de substâncias no solo na Holanda, em 1983. Este país foi o primeiro a formalizar um programa nacional para avaliação de contaminação e estabelecimento de níveis de intervenção, considerando para o solo sua multifuncionalidade, ou seja, considerando as funções de agricultura, ecologia, transporte, suprimento de água potável e outras.

Em 1994 o Ministério da Habitação, Planejamento e Meio Ambiente da Holanda - VROM publicou, Lei de Proteção de Solo, uma proposta de novos valores de orientação, derivados com base em alguns conhecimentos (VROM,1994). Estes novos valores foram denominados STI (“*Streefwaarde*”-referência, “*Toetsingswaarde*”-alerta e “*Interventiewaarde*”-intervenção), estabelecendo três níveis de qualidade para os solos e as águas subterrâneas.

Para precisão desses valores, foi utilizado o modelo *C-Soil*. A aplicação desse modelo matemático onde foi avaliado o risco, desenvolveu-se pelo Instituto Nacional de Saúde Humana e Meio Ambiente da Holanda (RIVM), pode-se prever, a partir de uma concentração inicial existente no solo, as concentrações do contaminante nos outros compartimentos do solo (solução do solo e ar do solo). A metodologia holandesa adota o critério da multifuncionalidade do solo, onde, além do risco à saúde humana, considera-se também o risco ambiental. A derivação de valores de intervenção é baseada em toxicologia humana e em critérios ecotoxicológicos, geralmente obtidos através de testes com minhocas, peixes e outros organismos. A base da derivação dos valores ecotoxicológicos é o  $CL_{50}$ . Por fim, para estabelecer valores há uma integração dos valores determinados com base em testes toxicológicos e ecotoxicológicos, adotando-se geralmente, o menor valor entre os dois (CETESB, 2001).

Nos Estados Unidos da América, a agência de proteção Ambiental dos Estados Unidos, EPA (*Environmental Protection Agency*), lançou em 1993 a “*Soil Screen Levels*” (*SSL*’s), onde apresentou, para 30 substâncias, os valores genéricos para solos, derivados a partir de modelos padronizados de exposição humana. Em 1994 a EPA apresentou o “*Soil Screening Framework*”, um procedimento de avaliação da contaminação dos solos, podendo-se calcular o risco de contaminação dos solos. O cálculo do *SSL* de um contaminante no solo baseia-se no risco máximo aceitável. A EPA (1996) apresentou um relatório final, com uma lista de valores genéricos revisada e ampliada para 110 substâncias.

Com o objetivo de promover a gestão e regulação adequada, em 1994, a União Europeia estabeleceu uma lista de resíduos (EUROPEAN COMMUNITY, 1993) expondo resíduos perigosos (EUROPEAN COMMUNITY, 1994). A implementação destas listas foi obrigatória para os Estados-Membros europeus em janeiro de 2002 (NATAL-DA-LUZ, 2011a). Os valores de intervenção são, em geral, derivados com base nos riscos à saúde humana, no critério de uso e ocupação do solo. Em alguns países como, Alemanha, Holanda e Inglaterra, são considerados também os riscos ecotoxicológicos. No Canadá e na Inglaterra, o nível de remediação é definido diretamente por uma avaliação de risco caso a caso (CETESB, 2001).

No Brasil a determinação de valores de orientadores para substâncias no solo iniciou-se em 1997 com o primeiro relatório da CETESB com o objetivo de estabelecer os valores de Prevenção e Investigação. Para determinação dos valores, a CETESB baseou-se nos valores estabelecidos pela Lista Holandesa, com dados relacionados à toxicologia humana, não foram considerados testes ecotoxicológicos, assim como foi feito nos Estados Unidos da América. Para estabelecer esses valores a CETESB fez o levantamento dos valores naturais de metais em alguns solos do estado de São Paulo, evidenciando a partir da avaliação de risco *C-Soil* (RIVM) e ensaios fitotóxicos. Em 2005, foi lançada a Lista de Valores Orientadores da CETESB (CETESB, 2005). Em 2009, o CONAMA, supremo órgão ambiental brasileiro, incorporou os valores apresentados pela CETESB na resolução 420, e determinou que cada estado estabelecesse seus valores de referência de qualidade. Os métodos ecotoxicológicos não foram utilizados, na precisão dos valores de prevenção no Brasil, porém, consta na proposta final do relatório, a incorporação de teste ecotoxicológicos para futuras análises.

## 2.6. Valores Orientadores

Perante a necessidade de implementação de normas técnicas no Brasil, em 2009 o CONAMA instituiu a resolução 420/2009 que “ dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. ”. Nesta resolução foram estabelecidos os valores orientadores para substâncias no solo. O Art. 22 da resolução 420 estabelece alguns objetivos do gerenciamento de áreas contaminadas como, eliminar o perigo ou reduzir o risco à saúde humana; eliminar ou minimizar os riscos ao meio ambiente, possibilitar o uso declarado ou futuro da área, observando o planejamento de uso e ocupação do solo, entre outros. Para cumprimento dos objetivos, determinou-se as seguintes definições:

Valores Orientadores: são concentrações de substâncias químicas que fornecem orientação sobre a qualidade e as alterações do solo e da água subterrânea;

Valor de Referência de Qualidade-VRQ: é a concentração de determinada substância que define a qualidade natural do solo, sendo determinado com base em interpretação estatística de análises físico-químicas de amostras de diversos tipos de solos;

Valor de Prevenção-VP: é a concentração de valor limite de determinada substância no solo, tal que ele seja capaz de sustentar as suas funções principais de acordo com o art. 3o.

Valor de Investigação-VI: é a concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea, acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana, considerando um cenário de exposição padronizado

Em conformidade com o Valor de Referência de Qualidade o CONAMA indica a necessidade de cada Estado identificar um conjunto de solos representativos de sua diversidade, baseando-se no material de origem (litologia), relevo e clima, estipulando o prazo de quatro anos a partir da data de publicação da resolução como o prazo limite para que os órgãos ambientais de cada Estado estabeleçam seus valores orientadores (CONAMA, 2009). A resolução possui um anexo com o valor referente a cada substância listada.

## 2.7. Avaliação Ecotoxicológica

A avaliação do impacto de substâncias, ou resíduos, sobre a qualidade dos solos pode ser realizada pela aplicação de ensaios padronizados, desenhados especificamente para avaliar variáveis biológicas sensíveis aos contaminantes, os ensaios ecotoxicológicos. O termo Ecotoxicologia, foi descrito por René Truhaut em 1969, como ramo da toxicologia preocupado com os efeitos e destinos das substâncias químicas, naturais ou sintéticas, sobre os organismos de um dado sistema (TRUHAUT, 1977**Erro! Indicador não definido.**).

A ecotoxicologia pesquisa, a curto e longo prazo, caminhos e interações de substâncias tóxicas e misturas químicas no meio ambiente, com ênfase na sua biodisponibilidade, circulação e assimilação nos organismos, bem como respostas biológicas desses organismos, mecanismos de danos (desregulação endócrina, genotoxicidade); destino de substâncias tóxicas na cadeia alimentar, incluindo exposições em seres humanos (ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY, 2012). A ecotoxicologia requer uma compreensão da teoria e princípios ecológicos, bem como uma compreensão de como os produtos químicos podem afetar indivíduos, populações, comunidades e ecossistemas (KENDALL; LACHER, 1994; HOFFMAN et al,1995).

A toxicidade dos resíduos pode ser estimada por meio de análises químicas e abordagens biológicas. No primeiro caso, as análises químicas são realizadas e os resultados são comparados com valores de limiar para as substâncias identificadas, previamente estudadas e valores estabelecidos por ensaios. No segundo caso de toxicidade é medida diretamente por meio de testes biológicos (NATAL-DA-LUZ, 2011a). A última abordagem é geralmente considerada como melhor método para avaliar a toxicidade potencial devido ao caráter integrativo de bioensaios, que inclui não só as possíveis interações entre produtos químicos, mas também integra o efeito de contaminantes que não são considerados ou detectados por análises químicas (THOMAS et al., 1986). Enquanto as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos, de forma que as análises químicas e os testes de toxicidade se complementam (COSTA et al., 2008). A avaliação da toxicidade de uma substância não deve ser feita apenas pelo método químico, é de suma importância que sejam inclusos testes biológicos. A utilização de ensaio ecotoxicológicos, para avaliação de contaminação dos solos é internacionalmente reconhecida como uma ferramenta complementar à análise química (CROUA; MOIA, 2006). Dessa forma os ensaios podem indicar, uma resposta mais precisa da toxicidade dos contaminantes presentes nas amostras para organismos vivos, que apenas a análise química de cada composto não pode avaliar (RIZZO, 2004).

A implementação de testes ecotoxicológicos para os valores de qualidade do solo, foi iniciada pela Lista Holandesa na Europa. A ampla aplicação de testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade residual, fortaleceu-se após a publicação da Diretiva Europeia 91/689/EEC (EUROPEAN COMMUNITY, 1991), que incluiu a propriedade “Ecotoxicológica” como um dos 14 critérios avaliados na caracterização de resíduos dispostos no meio ambiente. No Brasil, na avaliação inicial para determinação dos valores orientadores essa técnica não foi incluída na determinação dos níveis de contaminação. A ABNT possui normas estabelecidas para organismos aquáticos. Para os testes com organismos do solo as normas são recentes, porém não foram estabelecidos todos os testes que constam em outras legislações internacionais e que são amplamente utilizados no meio acadêmico.

Em geral, nos ensaios de toxicidade utiliza-se um solo artificial como substrato para adição das substâncias tóxicas, a fim de eliminar possíveis interferências externas. Esse solo artificial propõe uma padronização do teste e tem por objetivo avaliar a toxicidade intrínseca da substância sob avaliação. No entanto, o solo artificial não apresenta as reais condições do

comportamento de substâncias nos diferentes solos naturais. É importante fazer a adaptação dos métodos para a complementação da avaliação de áreas contaminadas a respeito da substituição do substrato artificial pelas amostras de solo trazidas de áreas naturais, avaliando possíveis interferentes nos resultados, bem como a escolha dos organismos-teste para amostras com determinadas características (SISINNO et al., 2006; VAN GESTEL; WEEKS, 2004).

A partir da revisão realizada por Nahami (2007) atenta-se sobre os principais estudos a respeito da ecotoxicologia e metais, no qual observa-se que a maioria dos estudos foram realizados com solo artificial. O requisito principal em estudos de acumulação é a necessidade de mais experimentos utilizando solos reais contaminados, tendo em vista que, estes possuem uma variedade de propriedades. Estes estudos permitem avaliação da acumulação e toxicidade de substâncias nos organismos e a interação com as propriedades do solo, ajudando a desenvolver uma compreensão dos efeitos sinérgicos, chegando a dados mais úteis para as avaliações de risco (NAHAMI, 2007). A biodisponibilidade dos metais em solos e sua toxicidade para os organismos do solo são afetadas por vários fatores, tais como: o teor de matéria orgânica; argila; óxidos de ferro; e o pH (LOCK, 2000) cujo solo artificial não apresenta em grande complexidade.

Os testes ecotoxicológicos baseiam-se nas análises das concentrações de substâncias que podem causar algum dano aos organismos. Constitui-se a partir do contato do organismo em seu ambiente natural com as substâncias tóxicas e se há alguma alteração no seu ciclo de vida ao entrar em contato com tal substância. Em geral a substância analisada é inserida, no meio, em várias concentrações diferentes, desde uma concentração baixa, aumentando proporcionalmente, até a última bem mais alta que a concentração inicial (ISO, 1998). Com base no teste com um gradiente de concentração, é possível estimar a concentração que causará efeito negativo sobre os organismos. Os resultados dos testes são sempre comparados com o controle e podem ser expressos em:

**CL/LC:** concentração causa efeito letal em X% dos indivíduos

**CENO/ NOEC:** menor concentração onde não é observado efeito significativo em relação ao controle

**CEO/LOEC:** menor concentração onde é observado efeito significativo em relação ao controle.

**CE/EC:** concentração efetiva onde ocorre inibição da taxa de reprodução dos organismos em relação ao controle (ISO, 1998; OECD, 1984).

O número após a sigla ex.: CL<sub>50</sub>, equivale à porcentagem organismos teste que sofreram algum tipo de alteração. No caso do exemplo seria concentração letal (CL) que mata 50% dos indivíduos.

### **2.7.1. Teste de fuga (*Avoidance test*)**

É um ensaio de comportamento que avalia a sensibilidade inicial dos organismos às substâncias. O teste consiste em inserir os organismos em um recipiente, dividido ao meio por uma barreira, em que possua em uma das metades o solo contaminado e em outra o solo controle. É melhor utilizado em caso de contaminação aguda, onde os organismos ao entrar em contato com o contaminante fazem o movimento de fuga (*Avoidance*) para o controle. É um método rápido e simples que visa avaliar o poder tóxico da substância através da observação da fuga do organismo. É bastante usado no ramo da ecotoxicologia porque é ecologicamente relevante, é sensível e tem uma duração menor que os outros testes utilizados com invertebrados. Para o solo ser considerado contaminado deve ter 80% de fuga dos organismos para o controle. Esse teste foi idealizado para separar o efeito do contaminante

dos efeitos atribuídos as características físicas e químicas do solo (NATAL-DA-LUZ et al, 2008; ISO,1998.).

### **2.7.2. Teste de letalidade**

Neste teste verifica-se o poder de letalidade das substâncias. A avaliação busca determinar a toxicidade aguda do contaminante, em qual concentração ocorre a letalidade dos organismos. É o ensaio com resultado mais extremo para a quantificação do grau de letalidade dos organismos, e o recurso utilizado para indicação de toxicidade é a concentração letal LC<sub>50</sub>, ou CL<sub>50</sub>, concentração da substância onde é observada a morte de 50% dos organismos testados (OECD, 1984).

### **2.7.3. Teste de reprodução**

Este teste crônico se refere a respostas ao um estímulo ao longo do tempo, podendo esse efeito durar parte ou todo ciclo de vida dos organismos. Tenciona observar efeitos no ciclo de vida do organismo sem causar sua letalidade. Esse teste depende da CL<sub>50</sub> observada no teste de toxicidade aguda.

As substâncias são colocadas em dose e seu efeito é medido após quatro/ oito semanas. É observado o número de ovos e de juvenis no recipiente. Também é avaliado o número de indivíduos mortos. A quantificação da taxa de reprodução do ensaio chega à concentração mínima onde nenhum efeito é observado o CENO ou NOEC, a máxima onde há efeito observado CEO/LOEC e a taxa de inibição de reprodução CE. Desse modo, é estabelecido um limite que determina qual concentração a substância pode ser utilizada sem causar nenhum efeito tóxico aos organismos (ISO, 1997; OECD, 2004a ), os testes são feitos com indicadores biológicos.

## **2.8. Indicadores Biológicos**

Indicadores biológicos são organismos que devido a sua estreita relação com o ambiente em que vivem apresentam reações comportamentais ou metabólicas mensuráveis, que indicam ou refletem alguma mudança nesse ambiente quando essas perturbações não os levam a morte (ANDREA, 2008). Para uma espécie ser utilizada como organismo o teste deve ter significativa representação ecológica dentro do ambiente que ocupa, ser sensível a uma ampla diversidade de agentes químicos, apresentar estabilidade genética e uniformidade das populações, ser abundante e de fácil cultivo e manipulação em laboratório, importância comercial e por fim, deve ter o conhecimento da sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares bem como, se possível, que a espécie seja nativa para a melhor representatividade dos ecossistemas (BIANCHI, 2013; CARVALHO et al, 2009; COSTA et al., 2008).

Em destaque aos organismos bioindicadores estão os Oligochaeta e os Collembolas. Ambos são amplamente utilizados em ensaios ecotoxicológicos (VAN GESTEL, 1997 ) não apenas por causa da sua sensibilidade às substâncias químicas e facilidade de cultivo no laboratório, mas também porque eles pertencem aos grupos que desempenham um papel essencial no ecossistema do solo. Esses fatos, juntamente com suas habilidades locomotoras fazem desses organismos ótimas espécies para serem utilizadas em ensaios de evasão rápida e são ecologicamente relevantes (NATAL-DA-LUZ, 2008).

A espécie de minhocas *Eisenia Andrei* e a espécie de colêmbolos *Folsomia candida* são consideradas organismos indicadores destes grupos e são amplamente utilizados como organismos teste para a avaliação dos efeitos da contaminação de solos. Atualmente existem

diversos protocolos de testes (ISO) para estes organismos que são considerados instrumentos importantes para a avaliação ecotoxicológica de solos.

O conhecimento mais detalhado das características biológicas de algumas espécies, bem como o fato de já existirem protocolos definidos para sua utilização, torna-se, de certa forma, a razão principal pela qual alguns grupos são amplamente utilizados em ensaios em âmbito mundial (ANDRADE, 2003). Além do estudo do próprio organismo deve-se preocupar com o seu papel na cadeia alimentar, pois alguns deles podem ser acumuladores de metais e transferir esse contaminante para outros organismos que se alimentam destes, provocando uma magnificação trófica. O acúmulo do metal acaba por ser crítico para sobrevivência e adaptação dos predadores de minhocas como, aves ou pequenos mamíferos, (DEMUYNCK et al, 2007) que acabam se alimentando deste e levando esse metal a cadeia trófica, sendo cada vez mais necessário esse tipo de estudo.

No Brasil a maioria dos testes não são utilizadas espécies nativas, já que grande parte dos cientistas utilizam as espécies propostas nos protocolos para validação do teste. Ainda que se utilizem espécies não endêmicas como organismo-teste para uma ampla diversidade de ambientes, alguns dos fatores levados em consideração são de grande conhecimento da espécie de forma a apresentar indivíduos com capacidade de ser sensível, seja em nível bioquímico, fisiológico, morfológico ou comportamental, mensurável, e também de resistir e responder aos fatores ambientais que possam dar um resultado sobre a região estudada (IAP, 1997; BIANCHI, 2010). Muitos cientistas estão iniciando estudos com espécies tropicais.

### **2.8.1. Colêmbola**

Fazem parte da mesofauna do solo, 2-3 mm de comprimento. São artrópodes, da classe Insecta e ordem Collembola (LIMA, 1938). Vivem na superfície do solo, normalmente em solos húmicos e úmidos. Eles contribuem para os processos de decomposição no solo pelo pastoreio de bactérias e fungos e decomposição da matéria orgânica (HOPKIN, 1997; PETERSEN, 2002).

É um organismo utilizado como indicador útil porque tem um ciclo de vida curto. Está presente em alta densidade em ecossistemas terrestres e tem uma distribuição ampla. Além disso, os colêmbolos são importantes como bioindicadores do solo devido a sua sensibilidade ao estresse ambiental, principalmente acidez do solo e composição química (SAUTTER et al., 1994; PONGE et al., 2003). Muitas espécies de Collembola são utilizadas em ensaios ecotoxicológicos, sendo *Folsomia candida* uma das mais utilizadas.

Alguns estudos analisaram a sensibilidade de Collembolas aos metais pesados. Verificando os problemas de contaminação sobre a diversidade de Collembolas, Fiera (2009), fez um levantamento da biodiversidade de Collembolas em solos parques de Bucarest (Romênia) contaminados com Pb, Cd, Cu e Zn. No estudo foi encontrada menor biodiversidade de Collembolas na área mais contaminada.

Antoniolli et al (2013), estudaram o desenvolvimento de Collembolas em Argissolo Vermelho distrófico contaminado com Cd, Cu, Zn, nas concentrações Cádmio (1, 10 e 100 mg kg<sup>-1</sup> de solo); Cobre (50, 500 e 5000 mg kg<sup>-1</sup> de solo); Zinco (100, 1000 e 10.000 mg kg<sup>-1</sup> de solo), verificaram que os metais pesados Cu e Zn, apresentavam ação negativa sobre a população de colêmbolos no solo, alterando sua reprodução em todas concentrações.

### **2.8.2. Enquitreídeos**

Anelídeo, grupo dos Oligochaeta, família Enchytreidaes, faz parte da mesofauna com tamanho até 40 mm. É representativo no solo, sua alimentação consiste 80% de

microrganismos e 20% de matéria orgânica em decomposição no solo (BIANCHI, 2010). São membros importantes da biocenose do solo contribuindo para os processos vitais deste compartimento. Indiretamente eles estão envolvidos na degradação da matéria orgânica, assim como melhorar a estrutura dos poros do solo (DIDDEN, 1993).

Diferentes fatores de estresse antropogênicos tais como a compactação do solo ou alterações no uso da terra, podem reduzir os seus números ou alterar a composição de espécies. Assim usá-los em testes padronizados é importante (ROMBKE, 2003). Em um ensaio Amorim (2005) observou que os enquitreídeos apresentaram alta sensibilidade a modificações nos atributos do solo e foram principalmente afetados por baixo pH, demonstrando a sensibilidade desse grupo.

Os enquitreídeos oferecem muitas vantagens porque muitas vezes o mesmo gênero pode ser utilizado em todos os três níveis de investigação, laboratório, semicampo, campo (RÖMBKE et al. 1994). Os testes de reprodução com *Collembola* e *Minhocas* foram desenvolvidos ao mesmo tempo em 1999 pela ISO, os testes com *Enquitreídeos* foram padronizados depois em 2003. (ISO 2003, OECD 2004).

*Minhocas*

### 2.8.3. Minhocas

São organismos da macrofauna do solo, anelídeos da sub-classe Oligochaeta. No caso da espécie utilizada em testes de ecotoxicologia, a *Eisenia Andrei* é da família *Lumbricidae*.

Em relação aos contaminantes do solo, as minhocas são bastante afetadas, pois nesse ambiente, ingerem uma considerável quantidade de solo e constituem a maior parte da biomassa do solo (quando presentes), sendo que seu tecido de preenchimento (celoma) possui elevado potencial de complexo de metais pesados (LIU et al., 2005). Por sua grande importância no solo, sua ampla distribuição e por todas as razões previamente citadas, as minhocas principalmente, as espécies *Eisenia Fetida* e *Eisenia Andrei* foram escolhidas para serem utilizadas em diversos testes de toxicidade para fins de registro de agrotóxicos junto aos órgãos regulamentadores de diversos países, inclusive do Brasil (ANDRÉA, 2010). As minhocas (Oligochaeta) são bons indicadores tanto de comportamento nos ensaios de fuga, como aqueles de toxicidade aguda e crônica. Esses animais além de se locomoverem ao longo do interior da camada de solo, apresentam epiderme bastante sensível à presença de possíveis contaminantes (BIANCHI, 2013).

Oligochaetas são um grupo muito grande e a variação de nicho ecológico dentre as espécies é enorme. Apesar do protocolo sugerir a utilização de *E. andrei* ou *E. fetida* em seus ensaios, a sensibilidade de outras espécies pode ser diferente. As *E. andrei* e *E. fetida* possuem características muito semelhantes em sua fisiologia e modo de vida, *Eisenia fetida* é uma espécie de ultra epigeica (que vive quase que inteiramente em matéria orgânica). Estas espécies são fáceis de cultivar em laboratórios, no entanto, muitas espécies de minhocas europeias e tropicais se comportam de forma diferente à *E. fetida/andrei*. Diferenças no modo de vida das espécies de minhocas, podem afetar a exposição desses organismos aos contaminantes e, conseqüentemente, a avaliação precisa dos riscos de sítios contaminados. Em estudo com contaminação de chumbo, foi verificado que a *E. andrei* foi mais resistente ao chumbo que *A. caliginosa* e *L. rubellus* (LANGDON, 2005).

Devido à sua importância no solo, as minhocas são indicadores chave para a saúde do ecossistema e muitos estudos têm sido realizados sobre a resposta de minhocas com os metais. Em um levantamento bibliográfico realizado por Nahami (2007), foi verificado que os metais têm causado às minhocas: letalidade (FITZPATRICK et al., 1996, NEUHAUSER et al, 1985; SPURGEON; HOPKINS, 1995, 1996, 2000; SPURGEON et al, 1994.), redução da

fertilidade (CIKUTOVIC et al., 1993 ; SIEKIERSKA; URBANSKA-JASIK, 2002), redução da produção de casulo (MA, 1988; SPURGEON; HOPKINS, 1996; SPURGEON et al., 2000), alteração da viabilidade casulo (SPURGEON; HOPKINS, 1996; VAN GESTEL et al., 1992) e alteração de crescimento em minhocas (KHALIL et al., 1996,. VAN GESTEL et al., 1991).

São realizados vários estudos para estudar a relação de acumulação de metais pesados e Oligochaeta. Alguns estudos que fazem digestão de minhocas para descobrir o quanto de contaminante se acumula no corpo do organismo, ou em qual local é acumulado, estão sendo desenvolvidos. Como os estudos de Zhen-Li et al. (2009) sobre acumulação de cádmio e poros d'água, Wu et al. (2012), pesquisando danos de metais nas enzimas de DNA e Demuynck et al. (2007) que estudaram a interação de metais com a proteína metallothionein. Ainda nessa análise, Sample et al., (1998), verificaram que a bioacumulação de contaminantes por minhocas diminui à medida que as concentrações no solo aumentam (ou seja, mais contaminado, menor acumulação, como se houvesse um limite de tolerância). Mecanismos para esta redução de acumulação podem incluir um aumento na taxa de eliminação com o aumento da concentração do solo, ou um efeito toxicológico em que a taxa metabólica da minhoca é impactada pelas altas concentrações de metais (NAHAMI, 2007).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Delineamento Experimental

Foram realizados ensaios de reprodução e letalidade para Oligochaeta (*Eisenia andrei*) e para colêmbolos (*Folsomia candida*) em 3 solos de características físicas e químicas diferentes. Estes solos foram coletados no estado do Rio de Janeiro e foram contaminados, em laboratório, com cobre e chumbo. Também foram feitos ensaios de Fuga para *Eisenia andrei*. Os metais foram adicionados em sete doses crescentes, sendo uma desta testemunha (solo puro). Foram feitas cinco repetições para cada tratamento em alguns ensaios e 4 em outros, mais repetições de Solo Artificial Tropical (SAT) utilizado como controle do ambiente e desenvolvimento dos organismos.

O experimento foi constituído por 18 ensaios Ecotoxicológicos. Para cada ensaio foram utilizadas 40 unidades experimentais. Foram realizados ensaios de reprodução, letalidade e fuga para *E. andrei* e ensaio de reprodução e letalidade para *F. candida*.

#### 3.2. Amostragem do Solo

Foram coletados três tipos de solo com características físicas e químicas diferentes, em áreas não antropizadas, localizadas em diferentes regiões do Estado do Rio de Janeiro. Os solos foram escolhidos a partir das diferentes texturas, Niemeyer et al (2010) e Natal-da-Luz et al. (2008) verificaram que este foi o parâmetro que mais influenciou nos ensaios. A amostragem foi feita na camada de 0-20 cm do solo de forma manual com auxílio de pá e enxada. Os solos coletados foram o Latossolo Vermelho-Amarelo localizado na cidade de Pinheiral-RJ, um Planossolo Háplico localizado dentro do campus da UFRRJ, Seropédica-RJ e um Argissolo Vermelho-Amarelo coletado no campo experimental da EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica-RJ (Figura 1).



**Figura 1.** Amostras dos solos coletados. Da esquerda para direita: Planossolo, Argissolo e Latossolo.

#### 3.3. Análise do Solo

As amostras de solo foram homogeneizadas, posteriormente foram secas ao ar, destorroadas e passadas em peneira de 2 mm. As amostras utilizadas no experimento foram caracterizadas quanto sua fertilidade, textura e quantidade de metal pesado.

A digestão das amostras foi feita de acordo com o método descrito pela EPA 3051, água régia invertida, digeridas no digestor Mars Xpress. Nesse método é pesado 0,5 g de solo onde é adicionado 9 ml de HNO<sub>3</sub> e 3 ml de HCl nos tubos de digestão. A mistura é levada ao digestor onde permanece por 20 minutos. Após a digestão é adicionado água miliQ até completar 25 ml, posteriormente, a solução é filtrada e depois armazenada para leitura. Os teores pseudototais foram lidos por espectrometria de absorção atômica e os resultados podem ser verificados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Teores pseudototais de metais pesados (mg.kg<sup>-1</sup>).

	<b>Cu</b>	<b>Cd</b>	<b>Pb</b>	<b>Zn</b>
Planossolo Háplico	1,04	0,35	2,40	7,49
Argissolo Vermelho-Amarelo	8	N.D.	26,21	46,57
Latossolo Vermelho-Amarelo	72,56	N.D.	7,20	59,68
*VRQ	35,0	<0,5	17,0	60,0
**Prevenção	60,0	1,3	72,0	300,0
**Investigação (APMáx)	200,0	3,0	180,0	450,0

\* VRQ – Valor de referência de qualidade (CETESB, 2005).

\*\* Prevenção – valor de prevenção (CONAMA,2009).

\*\* Investigação (APMáx – área de proteção máxima - valor de intervenção no cenário agrícola) - (CONAMA, 2009).

O valor de pH, foi determinado segundo o método proposto pela Embrapa (1997) pH em água 1:2,5. A condutividade elétrica (C.E.C.) foi feita com condutímetro. Foram analisados os teores trocáveis de Ca, Mg, Al, Na, K, teor de C, pH, H+Al, sendo calculada a CTC (Capacidade de Troca Catiônica) e V% (Saturação por Bases), conforme procedimento analítico adotado por Embrapa (1997) (Tabela 2). Também foram feitas análises físicas do solo, como a análise granulométrica (Tabela 3).

**Tabela 2.** Análise química do solo.

	<b>Na</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>K</b>	<b>H+Al</b>	<b>Al</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>V</b>	<b>pH</b>	<b>C org</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>C.E.</b>
	—————cmolc/dm <sup>3</sup> —————								<b>-%-</b>	<b>g kg<sup>-1</sup></b>	<b>—mg L<sup>-1</sup>—</b>			
Latossolo	0,009	1,1	2,51	0,03	3,6	0,02	3,65	7,25	50,34	6,08	13,2	6	9	24,73
Planossolo	0,012	0,6	0,55	0,03	1,9	0,04	1,19	3,09	38,51	5,51	3,6	10	13	63,75
Argissolo	0,032	1,8	2,15	0,07	2,9	0,02	4,0	6,9	57,97	5,48	4,2	2,66	29	25,02

C.E. condutividade elétrica em uS;

**Tabela 3.** Atributos físicos dos solos

	<b>Prof<sup>(1)</sup></b>	<b>AG<sup>(2)</sup></b>	<b>AF<sup>(3)</sup></b>	<b>Silte</b>	<b>Argila</b>	<b>AN<sup>(4)</sup></b>	<b>GF<sup>(5)</sup></b>	<b>Sil/Arg<sup>(5)</sup></b>
	<b>cm</b>	<b>g kg<sup>-1</sup></b>				<b>%</b>		
Latossolo	0-20	14	9	15	62	11	82	0,2
Argissolo	0-20	39	18	7	37	24	35	0,19
Planossolo	0-20	76	13	6	5	2	60	0,75

<sup>(1)</sup>Prof= profundidade; <sup>(2)</sup>AG= areia grossa (%); <sup>(3)</sup>AF= areia fina (%); <sup>(4)</sup>AN= argila naturalmente dispersa em água (%); <sup>(5)</sup>GF= grau de flocculação; <sup>(5)</sup>Sil/Arg= relação silte/argila; <sup>(6)</sup>

### 3.4. Contaminação do Solo em Laboratório

Para atingir as concentrações desejadas de metais no solo as amostras foram contaminadas com soluções contendo os respectivos metais. As concentrações escolhidas para cobre e chumbo foram baseadas nos valores orientadores sugeridos pela resolução 420 do CONAMA (2009) e de acordo com a revisão de literatura de outros trabalhos que desenvolveram ensaios semelhantes, além de consultar as legislações estabelecidas de outros países.

Os solos foram contaminados com uma solução de Nitrato de Chumbo e Nitrato de Cobre, separadamente. O solo foi colocado em um saco plástico, onde foi adicionada a solução e misturado até atingir o máximo de homogeneidade, ficando totalmente úmido. O solo ficou incubado durante um mês e meio antes dos ensaios. As concentrações (em mg kg<sup>-1</sup>) finais do metal no solo estão apresentadas na Tabela 4. Com o Cobre, os valores de 60 e 200 mg.kg<sup>-1</sup> correspondem aos valores de prevenção e investigação, respectivamente, proposto CONAMA (2009) e para o Chumbo os valores de 72 mg.kg<sup>-1</sup> e 180 mg.kg<sup>-1</sup> correspondem ao valor de prevenção e investigação determinado pelo CONAMA (2009), respectivamente. Os valores acima destas concentrações foram determinados a partir da literatura. A distribuição das concentrações seguiu o modelo matemático de uma progressão geométrica de 1,5-2 entre uma e outra.

**Tabela 4.** Concentrações de cobre e chumbo no solo após adição da solução em mg.kg<sup>-1</sup> de solo.

Metais	Concentração					
Cobre	30	60	120	200	350	700
Chumbo	72	120	180	360	720	1440

### 3.5. Instalação e Condução dos Ensaio Biológicos

Anteriormente a montagem dos testes biológicos é necessário eliminar a fauna do solo. Para isso foram feitos ciclos de congelamento. A cada ciclo o solo é congelado durante 48 horas, após esse período, em recipiente fechado, o solo é descongelado por 48 horas e volta ao congelamento por mais 48 horas. O ciclo é repetido 3 vezes.

Foi realizado um ensaio preliminar de reprodução com *Enchytraeus crypticus* para avaliação da aptidão dos solos para reprodução dos organismos. Todos os solos foram aptos a reprodução dos organismos. Porém não foi possível realizar os seguintes ensaios com o *Enchytraeus crypticus* por causa de problemas laboratoriais.

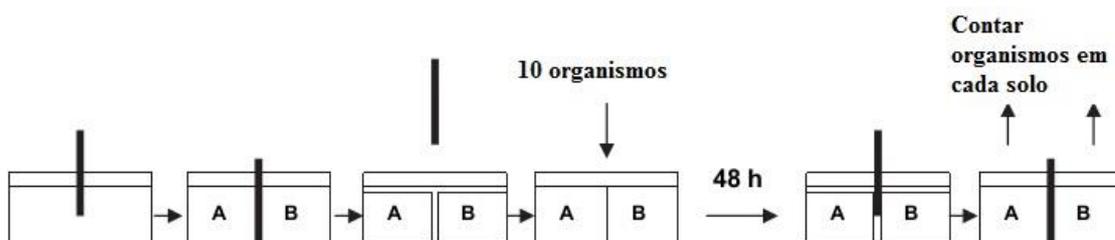
Para todos os ensaios realizados com os representantes da fauna do solo, a temperatura média permaneceu em torno de 20°C ±2°C, em foto-período de 16h:8h (luz: escuro), e em um delineamento experimental inteiramente casual. Os solos foram mantidos com 60% da umidade de campo. A umidade dos recipientes foi controlada durante toda semana na forma de pesagem. Os organismos foram alimentados com aveia, para *E. andrei* e *E. crypticus*, e fermento biológico, para *F. candida*, a cada duas semanas de ensaio.

Como testemunha de todos os ensaios foi utilizado o solo natural sem adição de contaminante, com suas respectivas concentrações naturais de metais. Como controle do ambiente e dos organismos, foi utilizado solo artificial tropical. O solo artificial tropical (SAT) utilizado foi preparado seguindo orientações descritas por Garcia (2004), entretanto esse apresenta a indicação da utilização de solos com 10% de matéria orgânica, enquanto nesse trabalho foram utilizados 5%, ficando o solo descrito nas seguintes proporções: 5% de fibra de côco, 22,5% de caulim e 72,5% de areia. O uso de solo padronizado permite futuras

comparações, seja entre ensaios realizados em diferentes laboratórios, seja com diferentes espécies (SMIT; VAN GESTEL, 1998).

### 3.6. Ensaio de Fuga (*Avoidance test*)

Para este ensaio foi utilizada a espécie *Eisenia andrei*. O ensaio de fuga foi baseado na norma ISO 17512-1 (2006). Para o ensaio de fuga foram inseridas lado a lado, no mesmo recipiente, com capacidade para 500 g de solo, uma amostra contaminada e uma amostra isenta de contaminante (controle), separadas por uma divisória (Figuras 2 e 3). Os organismos foram colocados no meio das duas amostras de solo e a divisória foi retirada. Após 48 horas observou-se para qual lado os organismos migraram. Neste teste, quando mais de 80% dos organismos migrarem para o controle, a amostra é considerada contaminada. Foi feito *dual-test* com os solos naturais a fim de avaliar o comportamento da *E. andrei* sem interferência do contaminante.



**Figura 2.** Esquema de montagem do teste de fuga. A= controle; B= resíduo. Loureiro et al. (2005).



**Figura 3.** Montagem do ensaio de fuga.

### 3.7. Ensaio de Toxicidade Crônica e Aguda

#### 3.7.1. *Eisenia andrei*

Foram feitos os dois ensaios simultaneamente. O ensaio de reprodução foi baseado na OECD 222 (2004a) e ISO 11268-2 (1997) e o ensaio de letalidade foi baseado na norma OECD 207 (1984), com o tempo de permanência modificado de 15 para 28 dias. O ensaio foi feito em sala com temperatura e umidade controlada (Figura 4). Foram pesados 500 g de solo úmido em cada recipiente com seus tratamentos definidos. Foram adicionados 10 indivíduos

em cada pote, com idade sincronizada com mais de 2 meses de vida e clitelados (Figura 5). O peso das minhocas variou entre 0,2 e 0,6 g. Os organismos foram alimentados com papa de aveia, feita com água destilada, no primeiro dia e no décimo quarto dia. Os organismos adultos permaneceram no recipiente durante 28 dias. No 28º dia os indivíduos adultos foram retirados do recipiente e nesse momento foi avaliada a letalidade dos indivíduos através da contagem dos adultos sobreviventes. Ao mesmo tempo fez-se a pesagem das minhocas para avaliar a perda/ ganho de peso. O solo permaneceu no recipiente por mais 28 dias para o desenvolvimento dos ovos e dos juvenis. Após esses 28 dias foram contabilizados quantos juvenis conseguiram sobreviver ao ensaio. O tempo total do ensaio foi de 56 dias. Ao final do ensaio foram verificados o pH e umidade dos recipientes.



**Figura 4.** Registro da umidade e temperatura da sala de experimentação.



**Figura 5.** Disposição dos frascos de ensaio na sala de experimentação.

### **3.7.2. *Folsomia cãndida***

O ensaio foi baseado na metodologia descrita na norma ISO 11267 (1998) . Foram pesados 30 g de solo em cada recipiente (Figura 6). Em cada unidade experimental, foram adicionados 10 indivíduos de *F. candida* com 10 a 12 dias de idade, obtidos a partir da colônia de laboratório. Os organismos foram adicionados por sucção. Extrato de levedura

granulado foi adicionado no início e aos quatorze dias do ensaio como fonte alimentar. Após 28 dias de duração do experimento as unidades do experimento foram desmontadas para posterior contagem. Para contagem dos juvenis presentes em cada amostra, as amostras foram fotografadas e observadas através do programa *Image Tool 3.0*. Ao final do ensaio foram verificados o pH e umidade dos recipientes.



**Figura 6.** Fracos prontos para ensaio de reprodução de Collembola.

### 3.7.3. *Enchytraeus crypticus*

O desenvolvimento dos testes de reprodução de enquitreídeos, *Enchytraeus crypticus*, seguiu as orientações e os procedimentos descritos na norma (OECD 220, 2004b e ISO 16387, 2003). Foram adicionados 10 indivíduos adultos, com clitelo desenvolvido, em recipientes com o equivalente a 30 g de solo úmido por repetição, num total de 5 repetições por solo utilizado, os organismos permaneceram no recipiente por um período de 28 dias, a alimentação ocorreu a cada duas semanas, com pequenas quantidades de farinha de aveia, ao final foram adicionadas 5 mL de álcool 70% , mais 5 gotas de rosa de bengala em cada frasco para corar os enquitreídeos em 24 horas. Para contabilidade o solo foi lavado e peneirado em peneira de 100 mm. Os organismos, agora corados e visíveis a olho nu, foram colocados em placa de petri e observado na lupa para contagem dos juvenis.

### 3.8. Análise Estatística

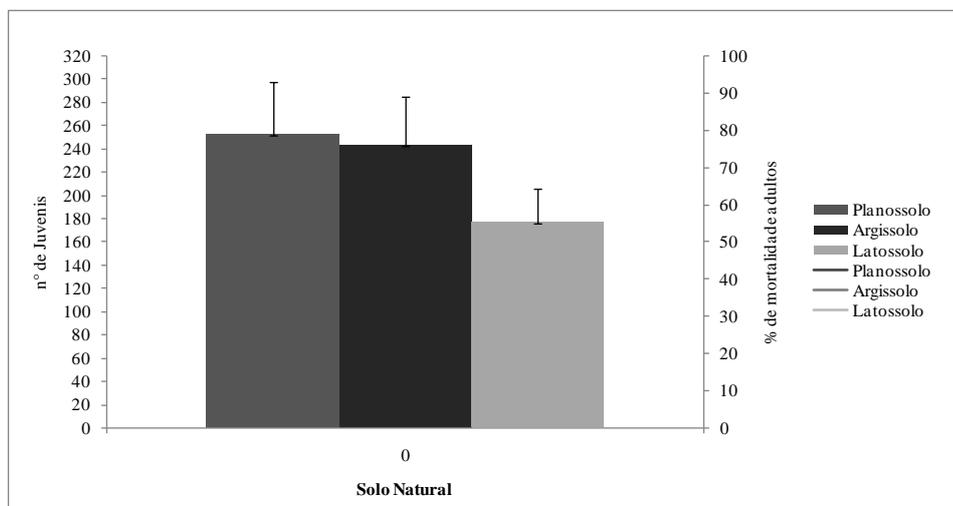
Os ensaios seguiram os critérios impostos pelas normas utilizadas. Para validar o ensaio de fuga foi utilizado o teste estatístico de Fisher pelo site <http://www.langsrud.com/fisher.htm> ( $p < 0,05$ ). Foi utilizado para porcentagem de fuga a formula:  $nr = ((c-t) / n) * 100$ . Para o ensaio de letalidade e estabelecer a concentração letal (CL) foi utilizado o programa *Priprobit*, a 95% de confiança. O ensaio de reprodução conta com vários testes para sua validação. Foi utilizado o programa *Statistica 7.0* para aplicação dos testes de normalidade, homogeneidade, para CENO e CE. O teste de homogeneidade foi feito por ANOVA, teste de Cochran e Barlett ( $p < 0,05$ ). Para o teste de normalidade foi utilizado histograma. Para encontrar a menor concentração que causou efeito, CENO, foi utilizado ANOVA, teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). A curva de regressão para encontrar a concentração efetiva, CE, foi feita através do programa *Statistica 7.0* na equação não linear. Os resultados estatísticos serão vistos a seguir.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Ensaio Preliminar

Para avaliar a capacidade de reprodução dos organismos nos diferentes solos, foi feito um ensaio preliminar com *Enchytraeus crypticus* no solo natural. O ensaio escolhido foi o de reprodução para Enquitreídeos (OECD-220, 2004b). Todos os solos, inclusive o Latossolo, tiveram desenvolvimento normal dos organismos (Figura 7), não sendo contabilizando nenhuma letalidade dos adultos. O pH e condutividade elétrica permaneceram inalterados. O ensaio obteve uma taxa reprodutiva dentro dos padrões exigidos pela norma, indicando que todos os solos são aptos ao desenvolvimento dos organismos. Os solos foram considerados aptos a serem feitos ensaios Ecotoxicológicos.

Após esse ensaio, não foi possível continuar com os ensaios de reprodução de *Enchytraeus crypticus*, para avaliação das doses de metais, devido a problemas laboratoriais.



**Figura 7.** Quantidade média de Juvenis e porcentagem de letalidade dos adultos de *Enchytraeus crypticus* durante o ensaio de reprodução e letalidade realizado com três solos naturais.

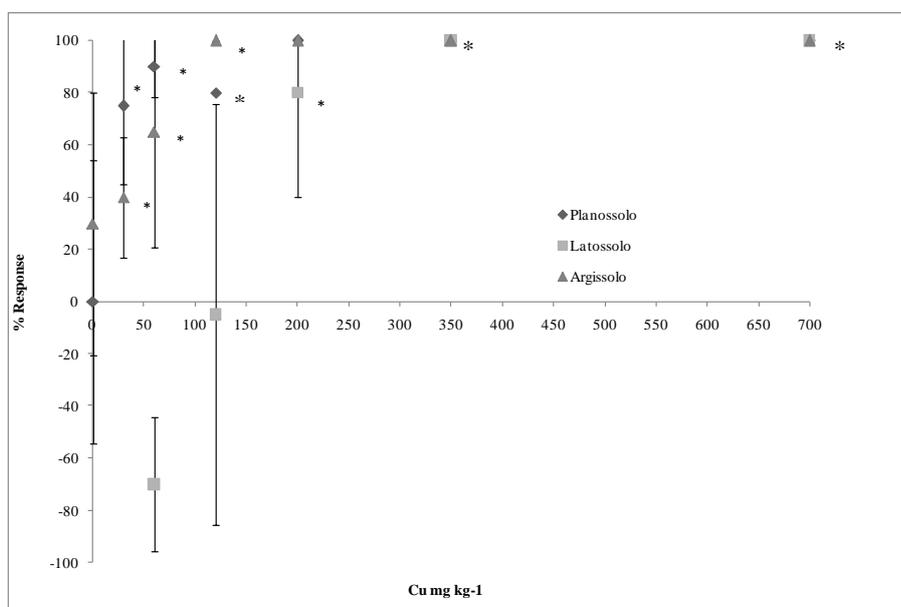


**Figura 8.** Ensaio preliminar de reprodução e letalidade de Enchytraeus crypticus.

#### 4.1.1. *Eisenia andrei*: ensaio de fuga

Os resultados do comportamento da *E. andrei* durante o ensaio de fuga com cobre estão na (Figura 8). Para o solo ser considerado contaminado, os organismos devem ter pelo menos 80% de fuga para o lado do controle. Não houve modificação no pH e condutividade elétrica durante o ensaio. Todos os ensaios de cobre não possuem as primeiras doses de cobre para o Latossolo, pois o mesmo possui concentração de cobre desejada.

A *Eisenia andrei* foi sensível ao cobre na primeira dose de 30 mg.kg<sup>-1</sup> no Planossolo apresentando diferença significativa onde revelou-se a fuga do lado do resíduo para o controle. No Argissolo a *E. andrei* se mostrou sensível partir da dose de 30 mg.kg<sup>-1</sup>, também mostrando diferença significativa. No ensaio com Latossolo a diferença significativa somente ocorreu na dose de 200 mg.kg<sup>-1</sup>. Nos três solos, das duas últimas doses de cobre os organismos apresentaram 100% de fuga ao lado do resíduo para controle, indicando contaminação. Os resultados na testemunha e no controle estão dentro da norma.



**Figura 8.** Média do percentual de fuga (% response) de *E. andrei* para as quatro réplicas, após ensaio de fuga nos três solos contaminados com Cobre (mg.kg<sup>-1</sup>). Linha pontilhada indica erro. Dados negativos não indicam fuga. \* diferença significativa pelo teste de Fisher.

No Planossolo a sensibilidade a contaminação ocorrida na dose inicial de 30 mg.kg<sup>-1</sup> A fuga acima de 80%, para o solo ser considerado contaminado, ocorreu na dose de 60 mg.kg<sup>-1</sup> e a partir de 120 mg.kg<sup>-1</sup> essa fuga para o lado do controle foi de 100%. Além disso, assim que as minhocas eram adicionadas à unidade experimental, era possível observar uma agitação nas minhocas no solo. Imediatamente ao serem inseridas no solo migravam para o lado do controle ou para a tampa (Figura 9). Em uma das repetições da última dose de cobre no Planossolo, 700 mg.kg<sup>-1</sup>, houve letalidade em uma das repetições, onde morreram 3 indivíduos em 48 horas. Esse foi o único solo a apresentar letalidade dos organismos no ensaio de fuga.

No entanto o Argissolo os organismos também apresentaram fuga a partir da dose de 30 mg.kg<sup>-1</sup>, sendo significativa. Essa diferença se manteve significativamente nas doses seguintes e a partir da dose de 200 mg.kg<sup>-1</sup> percebe-se que houve fuga de 100% dos organismos para o controle.

No Latossolo a diferença só foi significativa na dose de 200 mg.kg<sup>-1</sup>. A diferença se manteve significativa, chegando a 100% de fuga dos organismos para o controle na dose seguinte. Esse comportamento não foi notado nos ensaios com chumbo, como poderá ser observado posteriormente neste trabalho.

O Latossolo foi observado que as minhocas permaneciam juntas, em cima, umas das outras, nos casos onde houveram fugas altas ou 100% de fuga, elas se mantiveram unidas em um canto do recipiente. O mesmo foi observado por Natal-da-Luz et al. (2008), onde havia um emaranhado de minhocas. Este concluiu que, solos com alto teor de argila são conhecidos por criar condições desfavoráveis para as minhocas. De acordo com Jansch et al. (2005), a formação de emaranhados seria provavelmente uma estratégia das minhocas para reduzir a sua área de contato com o solo, aumentando assim suas chances de sobrevivência à longo prazo.

Loureiro et al. (2005) utilizando solo LUFA 2.2 contaminado com sulfato de cobre encontraram fuga significativa dos organismos para o controle na concentração de 320 mg.kg<sup>-1</sup> de cobre, muito acima do que foi encontrado neste estudo. Outros autores como Langdon et al (2001) e Burrows e Edwards (2002) também encontraram valores maiores que 100 mg.kg<sup>-1</sup> para fuga perante a contaminação com cobre. Lukkari et al (2005) acharam valor de fuga dos organismos na concentração de cobre 79 mg.kg<sup>-1</sup> utilizando a espécie *Aporrectodea tuberculata* em solos artificiais e solo natural. Como os autores citados utilizaram solos diferentes dos testados neste estudo, e também diferentes espécies de Oligochaeta, pode-se observar que a concentração de cobre que causa fuga nos organismos pode variar de acordo com o tipo de solo e que algumas espécies são mais sensíveis que outras. Isso indica a importância da utilização de uma maior quantidade de testes ecotoxicológicos, em diferentes solos e espécies, para estabelecer uma concentração média do metal nos solos em legislações. Natal-da-Luz et al (2008) afirmam que alguns avanços em testes ecotoxicológicos requerem o uso, validação e padronização de solos naturais, pois há uma gama de parâmetros do solo a serem discutidos e avaliados diante dos efeitos das propriedades do solo sobre o comportamento de fuga das espécies utilizadas.

No Latossolo foi observado que as minhocas permaneciam juntas, em cima umas das outras, nos casos onde houve fuga alta ou 100% de fuga, elas se mantinham unidas em um canto do recipiente. O mesmo foi observado por Natal-da-Luz et al. (2008), onde havia um emaranhado de minhocas. Este concluiu que solos com alto teor de argila são conhecidos por criar condições desfavoráveis para as minhocas. De acordo com Jansch et al. (2005), a formação de emaranhados seria provavelmente uma estratégia das minhocas para reduzir a sua área de contato com o solo, aumentando assim suas chances de sobrevivência à longo prazo.

Loureiro et al. (2005) utilizando solo LUFA 2.2 contaminado com sulfato de cobre encontraram fuga significativa dos organismos para o controle na concentração de 320 mg.kg<sup>-1</sup> de cobre, muito acima do que foi encontrado neste estudo. Outros autores como Langdon et al (2001) e Burrows e Edwards (2002) também encontraram valores maiores que 100 mg.kg<sup>-1</sup> para fuga perante a contaminação com cobre. Lukkari et al (2005) acharam valor de fuga dos organismos na concentração de cobre 79 mg.kg<sup>-1</sup> utilizando a espécie *Aporrectodea tuberculata* em solos artificiais e solo natural. Como os autores citados utilizaram solos diferentes dos testados neste estudo, e também diferentes espécies de Oligochaeta, pode-se observar que a concentração de cobre que causa fuga nos organismos pode variar de acordo com o tipo de solo e que algumas espécies são mais sensíveis que outras. Isso indica a importância da utilização de uma maior quantidade de testes ecotoxicológicos, em diferentes solos e espécies, para estabelecer uma concentração média do metal nos solos em legislações. Natal-da-luz et al. (2008) afirmam que alguns avanços em testes ecotoxicológicos requerem o uso, validação e padronização de solos naturais, pois há uma gama de parâmetros do solo a

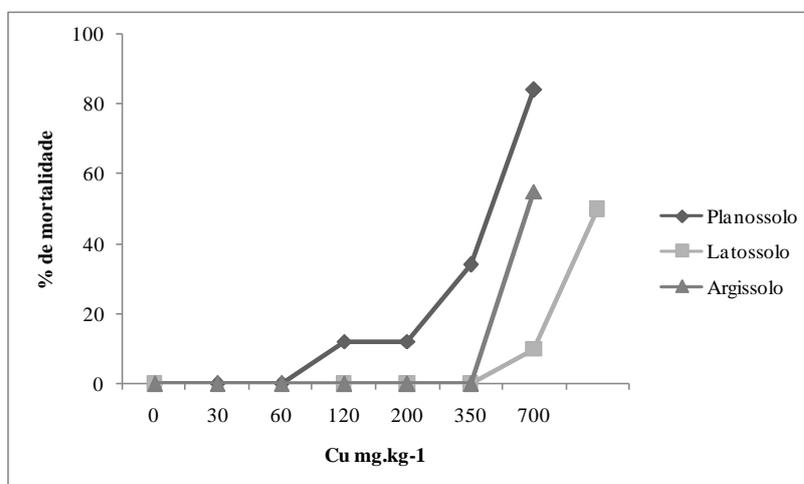
serem discutidos e avaliados diante dos efeitos das propriedades do solo sobre o comportamento de fuga das espécies utilizadas.



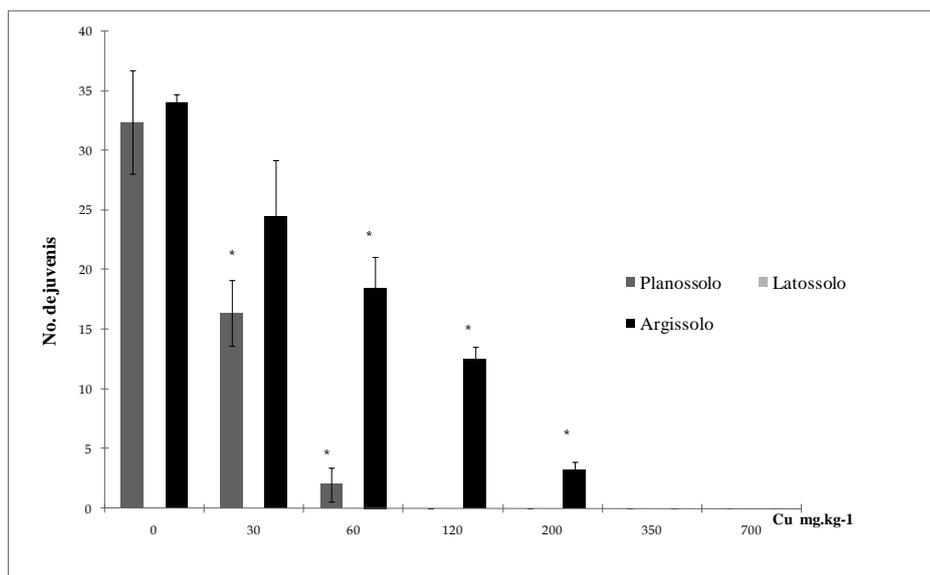
**Figura 9.** *E. andrei* se deslocando para o lado do controle assim que colocada no recipiente contendo cobre no Planossolo. C= controle e D6= dose de 700 mg.kg<sup>-1</sup>.

#### 4.1.2. *Eisenia andrei*: ensaio de letalidade e reprodução

Foram testadas as concentrações de cobre nos três solos para avaliar a letalidade da *Eisenia andrei* e os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 10 e 11. O pH e condutividade elétrica permaneceram inalterados. Para o Planossolo houve redução significativa dos juvenis na primeira dose, 30 mg.kg<sup>-1</sup>, no Argissolo essas reduções dos organismos ocorreram na segunda dose de 60 mg.kg<sup>-1</sup>. No entanto com o Latossolo não houve reprodução da *Eisenia andrei*, nem no solo natural, onde no controle, não foi encontrado nenhum juvenil. Esse resultado foi diferente do ensaio preliminar com *Enchytraeus crypticus* e dos resultados com *Folsomia candida* (que serão vistos a seguir), onde esses organismos conseguiram se reproduzir neste solo. O Latossolo não possui coluna anterior a 60 mg.kg<sup>-1</sup> devido ao seu teor natural de cobre.



**Figura 10.** Taxa de letalidade em porcentagem da *E. andrei* durante o ensaio de letalidade diante das concentrações de cobre em mg.kg<sup>-1</sup>.



**Figura 11.** Relação entre número médio de Juvenis de *E. andrei* durante o ensaio de reprodução com diferentes doses de Cobre em mg.kg<sup>-1</sup>. Barra de Erro. \* dose onde ocorreu diferença significativa pelo programa estatístico Statistica.

Houve uma redução significativa dos juvenis no Planossolo, na primeira dose, diminuindo da média de 32,4 indivíduos no controle a 16, 2 indivíduos na dose de 30 mg.kg<sup>-1</sup>. (Figura 11). Chegou a nenhum juvenil na dose de 120 mg.kg<sup>-1</sup>. Esse resultado gerou, pelo o programa *Statistic*, uma concentração efetiva CE<sub>50</sub> 28, 8 mg.kg<sup>-1</sup>, (Tabela 5) onde inibiria 50% dos juvenis. Diante dos resultados, a estatística apresentou CENO de < 30 e CEO de < 30 mg.kg<sup>-1</sup> para cobre no Planossolo. Porém esses valores não são reais, pois concentrações menores não foram testadas. A concentração efetiva de cobre no Planossolo é CE<sub>50</sub> 28,8 mg.kg<sup>-1</sup>, menor que o CENO. O CENO é encontrado de acordo com as concentrações utilizadas, mas no momento em que se faz a curva de reprodução, pode-se observar que a diminuição da reprodução pode ocorrer em concentrações menores, portanto é essencial que seja calculado com a ajuda de programa estatístico a concentração efetiva, CE.

Os indivíduos que morreram neste solo não demoraram um mês para morrer, a maioria morreu nas primeiras semanas. A letalidade dos organismos ocorreu a partir da dose de 350 mg.kg<sup>-1</sup>, porém não foi atingido 50% dos indivíduos (Figura 10). Somente na última dose de 700 mg.kg<sup>-1</sup> foi observada mais que 50% de letalidade dos organismos no Planossolo contaminado com cobre. Foi definido pelo programa *Priprobit* uma concentração letal CL<sub>50</sub> de 435,25 mg.kg<sup>-1</sup> de cobre (Tabela 5), sendo este o solo mais restritivo ao desenvolvimento de *Eisenia andrei*, em condições de contaminação com cobre. Foi observado que os organismos não ingeriram corretamente o alimento disponibilizado.

Para o Argissolo houve redução significativa de reprodução dos organismos somente na dose de 60 mg.kg<sup>-1</sup>, onde a média de indivíduos no controle era de 34 indivíduos, caindo para 18 na dose de 60 mg.kg<sup>-1</sup>. Esse número chegou a nenhum indivíduo na dose de 350 mg.kg<sup>-1</sup>. O valor de CENO estimado foi de < 30 e o de CEO 30 mg.kg<sup>-1</sup> (Tabela 5). Porém a concentração efetiva que inibe a reprodução de 50% dos indivíduos (CE<sub>50</sub>) estimada pelo programa estatístico foi 61 mg.kg<sup>-1</sup> (Tabela 5). Diante desta concentração cobre é esperada uma redução de 50% dos juvenis de *E. andrei* no Argissolo, diferindo do Planossolo onde essa concentração foi de 28,8 mg.kg<sup>-1</sup>.

Só ocorreu 50% de letalidade dos adultos na última dose, mas na dose anterior foi observado perda de peso dos organismos. Foi estimado pelo programa *Priprobit* a concentração letal de cobre no Argissolo que mataria 50% dos indivíduos adultos de *E.*

*andrei*. A concentração estimada para Argissolo foi CL<sub>50</sub> 690,27 mg.kg<sup>-1</sup>, muito maior que no Planossolo (Tabela 5). Essa diferença é devido à porcentagem de letalidade, onde no Planossolo o número de indivíduos mortos na mesma concentração foi bem maior.

No Latossolo não houve desenvolvimento de juvenis nem mesmo no controle, não apresentando nenhuma coluna na

Figura 11, o que difere do *Folsomia candida*, que será visto a seguir, que conseguiu desenvolver juvenis no solo. O *Enchytraeus crypticus* utilizado no ensaio preliminar também conseguiu se reproduzir normalmente neste solo. Somente a *E. andrei* obteve problema em sua reprodução.

Apesar de não desenvolver juvenis no controle, os adultos tiveram resistência no Latossolo, ocorrendo letalidade somente na última dose de 700 mg.kg<sup>-1</sup> de cobre, tendo número maior de indivíduos vivos do que o Planossolo. Foi alcançado 50% de letalidade dos organismos na última dose. Esse resultado foi estimado pelo programa *Priprobit* uma concentração letal CL<sub>50</sub> 691,96 mg.kg<sup>-1</sup> para *E. andrei* no Latossolo (Tabela 5), sendo próxima do Argissolo. Mesmo não ocorrendo letalidade nas menores doses, foi observada perda de massa dos organismos a partir da dose de 350 mg.kg<sup>-1</sup>. O mesmo fenômeno ocorrido no ensaio de fuga, ocorreu neste ensaio, as minhocas sobreviventes foram encontradas juntas, unidas em um canto do recipiente. Assim como foi discutido anteriormente, a *E. andrei* tem seu comportamento alterado em solos de textura mais fina. Há uma tendência a formar aglomerados para ter menor contato com o solo e maior contato com as minhocas, para garantir sua sobrevivência.

**Tabela 5.** Valores de CENO (Concentração de Efeito não Observado), CEO (Concentração de Efeito Observado), CE<sub>50</sub> (Concentração Efetiva Média), CL<sub>50</sub> (Concentração Letal Média), para o cobre em mg.kg<sup>-1</sup> nos três solos obtidas através dos ensaios de reprodução e letalidade realizados com *E. andrei*.

	CENO	CEO	CE <sub>50</sub>	CL <sub>50</sub>
Planossolo	<30	30	28,8 (26,35-31,24)	435,25
Latossolo	*	*	*	691,96
Argissolo	<30	30	61,01 (42,95-79,07)	690,27

1CENO, CEO e CE<sub>50</sub> obtidos através do programa estatística. 2 CL<sub>50</sub> obtidos através do programa *Priprobit*.. 3 Entre parênteses intervalo de concentração de cobre. \* não houve reprodução.

Outros estudos, também encontraram valores de CE<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub> para cobre. Spurgeon et al. (1994) analisando metais em solo artificial encontrou, ao adicionar soluções de nitrato de cobre uma CE<sub>50</sub> 53 mg.kg<sup>-1</sup> de Cu e uma CL<sub>50</sub> de 555 mg.kg<sup>-1</sup>, além de um CENO de 32 mg.kg<sup>-1</sup>. Valores próximos aos que foram alcançados neste trabalho. Spurgeon et al. (1994) também afirmou que no meio destes metais testados, o cobre foi o mais letal, tóxico e restritivo entre eles, obtendo menores concentrações que causam efeito na fauna. O cobre é um elemento essencial aos organismos, mas em grandes níveis pode ser tóxico, e estes níveis são baixos quando comparados a outros metais. Natal-da-Luz (2011b) encontrou utilizando cloreto de cobre, um CE<sub>50</sub> 25,5 mg.kg<sup>-1</sup>. Para a *E. andrei*, diante da adição de cobre aos solos estudados, os valores apresentados anteriormente corroboram com os dados encontrados neste trabalho.

Comparando os resultados dos ensaios com os valores orientadores proposto pelo CONAMA (2009), observou-se que o Planossolo apresentou um valor que altera o ciclo de vida da *E. andrei*, neste caso o CE<sub>50</sub>, abaixo do proposto pela legislação para o valor de

prevenção, que seria de 60 mg.kg<sup>-1</sup>. A *E. andrei* no Argissolo possui uma CE<sub>50</sub> valor bem próximo, um pouco acima do valor de prevenção e o Latossolo não foi possível calcular a CE<sub>50</sub>. A disponibilidade do cobre variar de acordo com as propriedades do solo, interferindo na sensibilidade da *E. andrei* nos diferentes tipos de solo.

#### 4.1.3. *Folsomia candida*: ensaio de letalidade e reprodução

Para avaliação resultante do cobre, no solo sobre a população de artrópodes, foi feito um ensaio de reprodução com *Folsomia candida* e os efeitos desse contaminante, sobre a reprodução e a letalidade como podem ser visto nas Figuras 12 e 13.. O pH e a condutividade elétrica não foram modificadas durante o ensaio.

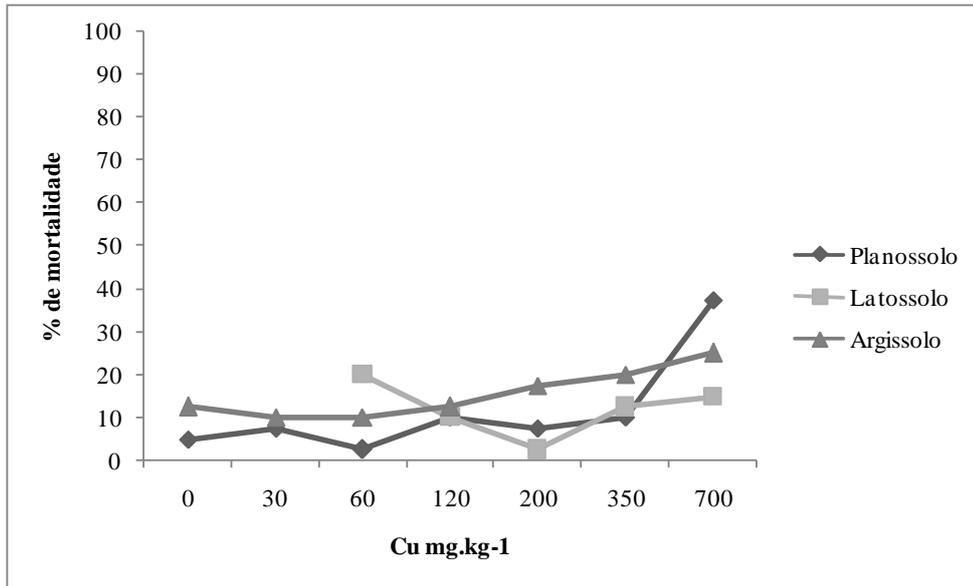
O Planossolo foi o solo no qual o melhor se desenvolveu o *Folsomia candida*, tendo número maior de juvenis chegando a uma média nas quatro repetições de 443 indivíduos no solo natural. O Latossolo foi o solo em que teve a menor taxa reprodutiva dos organismos.

O pH se manteve constante durante o ensaio, variando pouco. A condutividade elétrica também pouco variou durante o ensaio e a umidade também.

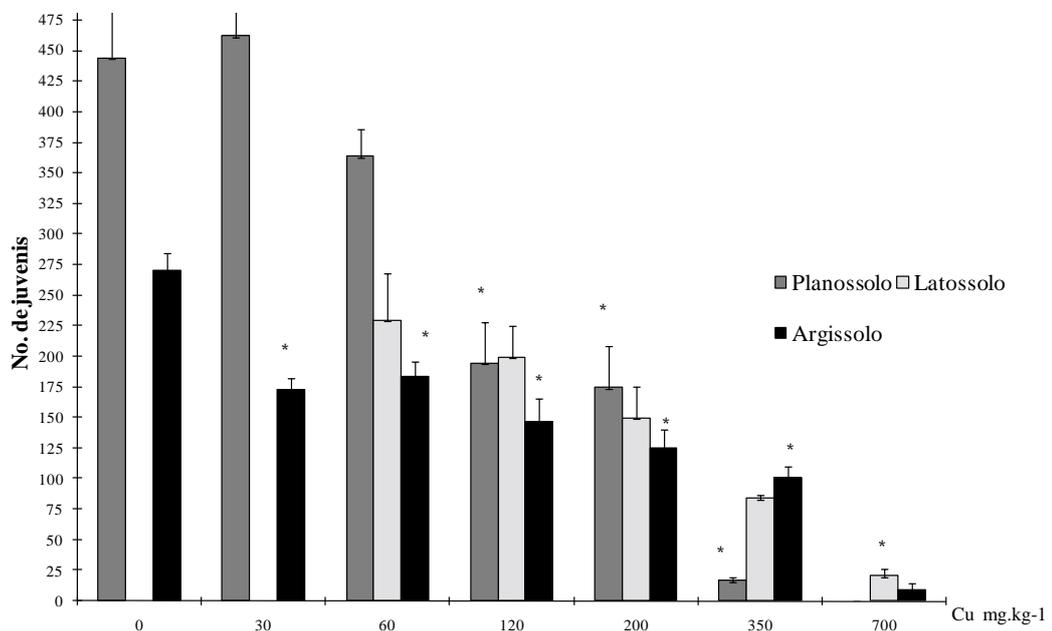
Através do efeito do cobre, sobre a reprodução de juvenis pode-se compreender que o Planossolo teve abundância de juvenis na testemunha, porém o número de indivíduos aumentou na primeira dose de 30 mg.kg<sup>-1</sup> (Figura 13). Esse valor diminuiu na dose seguinte, porém a redução só foi significativa na dose de 120 mg.kg<sup>-1</sup>, chegando a ter a inexistência juvenil na última dose de 700 mg.kg<sup>-1</sup>. O cobre não causou letalidade do mais que 50% dos indivíduos adultos de *Folsomia candida* no Planossolo. Na última dose, atingiu apenas 37%. Entretanto, apesar de não eliminar os indivíduos, foi observado que na última dose os organismos não se alimentaram corretamente, logo, observou-se os restos do alimento no recipiente. Isso favoreceu o desenvolvimento do fungo (Figura 14), nas doses iniciais isso não foi observado, os organismos se alimentaram normalmente. Também foi percebido que os organismos adultos não cresceram, continuaram pequenos, muito menores que os organismos do controle. Essas duas observações demonstraram que apesar de não matar os organismos, ocorreram outras alterações no ciclo de vida, além de inibir a reprodução, o organismo adulto apresentou dificuldade para se desenvolver normalmente.

O Argissolo reproduziu o mesmo na testemunha, sendo menor que no Planossolo, chegando ao máximo de 270 juvenis (Figura 13).. Na primeira dose, 30 mg.kg<sup>-1</sup>, esse solo sofreu uma redução significativa de indivíduos e assim se manteve até a última dose. A letalidade máxima sofrida pelo os adultos desse solo foram de 25% na maior dose (Figura 12). Assim como ocorreu no Planossolo nas últimas doses não morreram mais de 50% dos organismos, mas foi observado alterações. Os organismos não se alimentaram corretamente favorecendo o desenvolvimento de fungo no recipiente, e também não cresceram quando comparados a testemunha.

De modo semelhante à *Eisenia andrei* o Latossolo foi o solo em que o *F. candida* apresentou a taxa de reprodução mais baixa e o apresentou diferença significativa na redução dos juvenis somente nas maiores doses. Houve uma redução significativa dos juvenis na dose de 350 mg.kg<sup>-1</sup> (Figura 13).. Também ocorreu baixa letalidade nos adultos deste solo, o índice máximo foi de 15% de letalidade. Assim como nos solos anteriores, os organismos adultos não cresceram e nem se alimentaram adequadamente. Nursita et al. (2005). Verificou-se que o mesmo fenômeno de ausência de crescimento nos Collembolas para as doses de cobre entre 300 e 1500 mg.kg<sup>-1</sup>.



**Figura 12.** Taxa de letalidade em porcentagem da *F. candida* durante o ensaio de letalidade diante das concentrações de cobre em mg.kg<sup>-1</sup>.



**Figura 13.** Relação entre número médio de Juvenis de *F. candida* no ensaio de reprodução nas diferentes doses de Cobre em mg.kg<sup>-1</sup>. Barra de Erro. \* dose onde ocorreu diferença significativa pelo programa estatístico Statistic.



**Figura 14.** Fungo no solo da dose de  $700 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Cu no ensaio com *Folsomia candida* indicando que os organismos não se alimentaram corretamente.

As concentrações que causam efeito no ciclo de vida dos organismos estão na Tabela 6. O Planossolo apresentou um CENO menor ou igual que  $120 \text{ mg.kg}^{-1}$ , e um CEO de  $120 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Cu. A concentração efetiva de cobre no Planossolo é  $\text{CE}_{50}$   $117 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Comparando os valores estimados, esse valor de  $\text{CE}_{50}$  é maior que o encontrado para o mesmo solo para *Eisenia andrei*, que foi bem mais baixo. Isso demonstra que há diferença na sensibilidade dos organismos, pois foi aplicada a mesma dose, no mesmo solo, e ocorreu mortalidade dos juvenis em doses diferentes.

Para letalidade não foi possível estimar  $\text{CL}_{50}$  do Planossolo, pois não chegou a ocorrer letalidade em 50% dos indivíduos, portando o programa *Priprobit* não rodou os dados. Foi possível encontrar  $\text{CL}_{10}$  onde para o solo esse valor de cobre foi de  $137 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Mas como foi elucidado anteriormente, apesar de não matar os indivíduos algumas alterações foram observadas, como a falta de crescimento e má de alimentação.

No Argissolo foram percebidos, efeitos deletérios na primeira dose, tendo um valor de CENO menor ou igual a  $30 \text{ mg.kg}^{-1}$  e CEO de  $30 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Todavia a redução de 50% na reprodução dos organismos só ocorreu efetivamente depois, tendo o valor de  $\text{CE}_{50}$  de  $138 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Tabela 6). Esse valor detectado foi próximo ao Planossolo para o mesmo organismo, porém este é um pouco maior. Atentando para a

Figura 13 pode-se verificar que os valores estimados não são valores onde a reprodução é total inibida, e sim onde ela é inibida em 50% seu número de indivíduos, diferenciando do CENO e CEO. Contudo esse valor foi menor para o mesmo solo quando foi avaliado a *Eisenia andrei*, em mesmas condições, obtendo  $\text{CE}_{50}$   $61 \text{ mg.kg}^{-1}$ , indicando a diferença de sensibilidade dos organismos.

Em relação à letalidade assim como no Planossolo, não ocorreu morte de 50% dos indivíduos, sendo assim, o programa *Priprobit* não pode estimar a  $\text{CL}_{50}$ . Porém foi possível estimar o  $\text{CL}_{10}$ , onde este valor foi de  $45 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Tabela 6). O mesmo fenômeno que ocorreu com o Planossolo também aconteceu no Argissolo, os organismos não morreram, porém não se desenvolveram adequadamente.

O Latossolo foi o solo que apresentou o maior valor na alteração do ciclo de vida da *Folsomia candida*, apresentou um CENO de menor/igual a  $350 \text{ mg.kg}^{-1}$  e um CEO de  $350 \text{ mg.kg}^{-1}$ . O programa *Statistica* estipulou que a concentração que causa a redução de 50% dos juvenis é menor que a prevista no CENO, estimando um  $\text{CE}_{50}$   $299 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Tabela 6). Não se pode comparar esses valores, com o obtido para o mesmo solo com *Eisenia andrei*, pois não houve reprodução para este organismo neste solo, sendo o *F. candida* mais adaptado.

Não foi possível ser calculada a letalidade neste solo, como, observado na Figura 13, chegou a ser atingido 15% de letalidade dos organismos na maior dose, porém devido à

distribuição dos dados, o programa *Priprobit* não conseguiu calcular as concentrações letais. Os mesmos fenômenos que ocorreram nos outros solos de alimentação incorreta e falta de crescimento, foram observados neste solo, o adulto não se desenvolveu de forma saudável como foi observado no controle.

**Tabela 6.** Valores de CENO (Concentração de Efeito não Observado), CEO (Concentração de Efeito Observado), CE<sub>50</sub> (Concentração Efetiva Média), CL<sub>10</sub> (Concentração Letal Média), para o cobre em mg.kg<sup>-1</sup> nos três solos obtidas através dos ensaios de reprodução realizados com *Folsomia cãndida*.

	CENO	CEO	CE <sub>50</sub>	CL <sub>10</sub>
Planossolo	<120	120	117 (83-151)	137
Latossolo	<350	350	299 (156-441)	*
Argissolo	<30	30	138 (73-203)	45

1. CENO, CEO e CE<sub>50</sub> obtidos através do programa estatística. 2. CL<sub>10</sub> obtidos através do programa *Priprobit*. 3. Entre parênteses intervalo de concentração de cobre. \* Não foi possível calcular a dose.

Comparando os resultados com outros estudos Natal-da-Luz et al (2011b) estudando *Folsomia candida* encontrou um valor de CE<sub>50</sub> 42,4 mg.kg<sup>-1</sup>, esse valor foi abaixo do dos resultados analisados, porém o contaminante utilizado foi cloreto de cobre, e não o nitrato de cobre como neste estudo. A diferença da substância teste deve ser considerada já que há diferença de solubilidade entre as substâncias (BRUSS PERDENSEN et al 2000). Bruss Perdensen et al (2000), utilizando sulfato de cobre encontrou um valor bem mais alto do que o encontrado neste documento, uma CE<sub>50</sub> 657 mg.kg<sup>-1</sup>. Também foi alto o valor encontrado por Nursita et al (2005) que utilizando outra espécie de Collembola, *Proisotoma minuta*, porém utilizando nitrato de cobre como contaminante, encontrou um valor de CE<sub>50</sub> 696 mg.kg<sup>-1</sup>. Sandfer e Hopkin (1997) explorou a *F. candida* e nitrato de cobre, em solo artificial, nas mesmas condições impostas por este trabalho, encontrou em seu ensaio um CE<sub>50</sub> 700 mg.kg<sup>-1</sup>. Nenhum dos estudos acima conseguiu determinar a concentração letal CL<sub>50</sub>. Somente Natal-da-Luz et al (2011b), encontrou valores de CE<sub>50</sub> mais baixos que esse estudo os outros autores encontraram valores muito mais altos. Em alguns destes trabalhos foram utilizados solos artificiais, para determinação das doses tendo comportamento diferente do que foi encontrado, isso reforça que a utilização de solos naturais para avaliação do efeito do cobre nos organismos é essencial para determinar o nível de contaminação.

Os valores altos para CE<sub>50</sub> citados acima são bastante discrepantes, pois todos os trabalhos citados possuíam concentrações teste muito espaçadas, como o exemplo este de Sandfer e Hopkin (1997) onde as concentrações de Cobre estudadas foram 10, 40, 200, 1000, e 3000 mg.kg<sup>-1</sup>. Segundo a ISO 11267 (1998) para que seja feita a regressão do cálculo da concentração efetiva (CE) a contaminação ideal é uma progressão geométrica entre 1,5-2,5 vezes no máximo entre as doses. A distância das concentrações de 200 à 1000 mg.kg<sup>-1</sup>, estaria extrapolando essa regressão, pois 1000 mg.kg<sup>-1</sup> é 5 vezes maior que 200 mg.kg<sup>-1</sup>, isso pode causar algum erro na regressão. Essa grande diferença permite que os programas estatísticos estimem muito além do que um valor mais coerente. Portanto os valores dos trabalhos apresentados podem estar superestimados. Para o presente trabalho as concentrações estudadas foram próximas umas das outras, os valores CE<sub>50</sub> foram estimados quando ocorreu uma redução de 50% da população, de acordo com a Figura 13.

Não foi encontrada CL<sub>50</sub> para estes ensaios e nos ensaios citados acima também não foram possíveis de serem encontrados. Porém, outros fenômenos foram observados, como ausência de crescimento dos adultos e também alterações da alimentação dos organismos nas últimas doses. Nursita et al (2005) observaram movimentos mais lentos até mesmo a imobilidade de algumas Collembola, em concentrações mais elevadas de todos os metais estudados, quando comparados com os controles, em que os animais eram altamente ativos. A levedura adicionada às amostras, com as concentrações de metal mais elevadas de Cu, não foi consumida pelo Collembola e o crescimento de fungos foi observado nos recipientes. Os mesmos fenômenos ocorreram neste trabalho, como pode ser observado na Figura 14.

O crescimento mais lento, pode ter resultado na produção de menos ovos e ter, subsequentemente, reduzido número de juvenis produzidos em amostras contaminadas. A taxa do crescimento reduzido da Collembola, em concentrações altas de metal, pode ser devido ao efeito tóxico dos metais resultando em alterações na saúde do organismo e diminuição do consumo de alimentos (NURSITA et al. 2005). Foi relatado, que em populações naturais da espécie Collembola, *Orchesella cincta*, o aumento da eficiência da excreção consumiu mais energia e causou redução no crescimento dos organismos que estavam em exposição ao solo poluído com Cd (POSTHUMA et al., 1992 apud NURSITA et al 2005). Sendo assim, a exigência de energias elevadas para a excreção do metal pode ser responsável pela redução da taxa de crescimento da *F. candida*, na presença de metais pesados neste estudo. Nos ensaios realizados os organismos mantiveram o seu tamanho juvenil e não cresceu suficientemente, quando comparados com a testemunha. Também, não houve desenvolvimento de juvenis e os organismos não se alimentaram corretamente. Esses fenômenos, são semelhantes aos estudos citados anteriormente, indicando os possíveis efeitos do contaminante sobre a *F. candida*.

Em relação à contaminação, e características dos solos o comportamento foi parecido com o apresentado pela *E. andrei*, porém com uma diferença um pouco menor entre os solos. O Collembola se desenvolveu melhor no Planossolo e este solo demorou a apresentar uma diferença significativa tendo CENO e CEO maior que o Argissolo (Tabela 6), porém quando observado a concentração efetiva que mata 50% dos organismos, CE<sub>50</sub>, o Planossolo, assim como na *E. andrei* teve menor valor para o cobre.

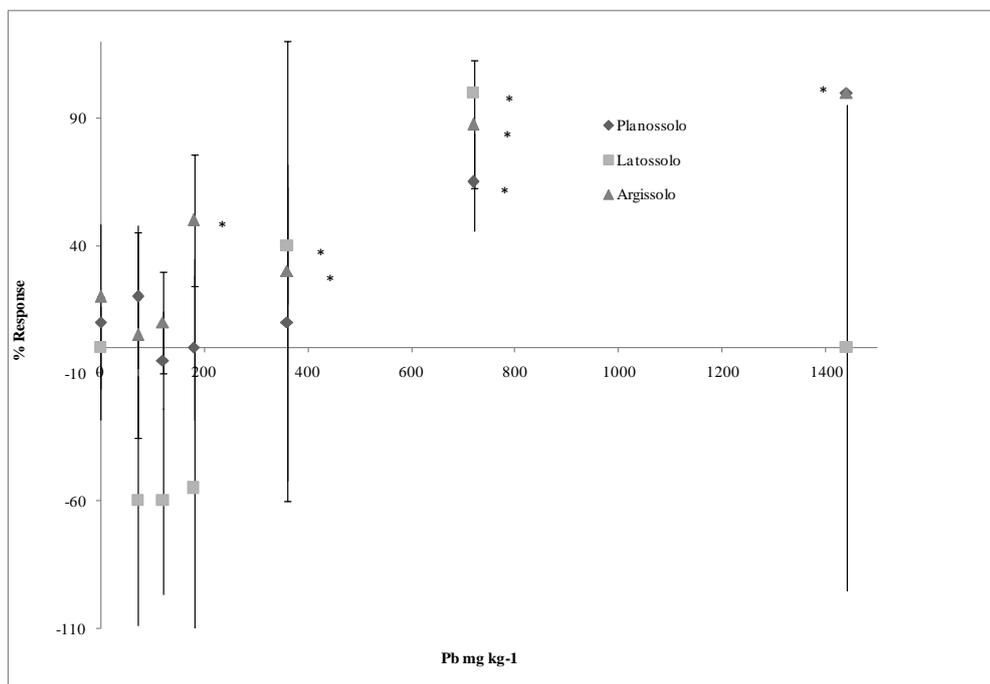
Os resultados de tolerância ao cobre pela *F. candida* assim como para *E. andrei* foram menores que os propostos pelo CONAMA (2009). Os valores encontrados no Argissolo e Planossolo ficaram abaixo, do valor de investigação proposto pelo CONAMA (2009). Somente no Latossolo a concentração encontrada foi maior. Como observado, duas espécies de características diferentes apresentaram baixa tolerância ao cobre e diante dos valores propostos pelo CONAMA (2009), mesmo em solos com características químicas e físicas diferentes. Essas espécies sofreriam alguma alteração no ciclo de vida, se o valor tolerável de cobre proposto pela legislação fosse adicionado ao solo. Também houve disparidade de valores na concentração efetiva CE<sub>50</sub> para os organismos diante da diferença entre os solos. Tais resultados reforçam a necessidade da utilização de teste ecotoxicológicos na construção das legislações ambientais. O Latossolo é capaz de receber uma concentração maior de cobre no solo, sem causar problemas á *F. candida*.

## **4.2. Chumbo**

### **4.2.1. *Eisenia andrei*: ensaio de fuga**

Os resultados da avaliação comportamental da *Eisenia andrei* em relação a contaminação por chumbo no teste de fuga, podem ser analisados na Figura 15. O pH e a condutividade elétrica permaneceram estáveis durante o ensaio.

Diferentemente do cobre onde os organismos demonstraram sensibilidade em doses baixas no chumbo a sensibilidade ocorreu em doses maiores. No Planossolo verificou-se que a diferença de fuga significativa na concentração de 720 mg.kg<sup>-1</sup> de chumbo. O Argissolo se mostrou mais restritivo, tendo a fuga de *Eisenia andrei* do solo contaminado para o controle na dose de 180 mg.kg<sup>-1</sup>. A *E. andrei* apresentou fuga significativa no Latossolo a partir de 360 mg.kg<sup>-1</sup>, porém na última dose, enquanto os outros dois solos apresentaram 100% de fuga para o controle, o Latossolo apresentou resultado equilibrado tendo 50% dos organismos em cada lado.



**Figura 15.** Média do percentual de fuga (% response) com *E. andrei* para as quatro réplicas, após ensaio de fuga nos três solos contaminados com Chumbo (mg.kg<sup>-1</sup>). Linha pontilhada indica erro. Dados negativos não indicam fuga. \* Diferença significativa pelo teste de Fisher.

Os organismos apresentaram no Planossolo diferenças significativas, somente na dose de 720 mg.kg<sup>-1</sup>, que teve 100% de fuga na maior dose 1440 mg.kg<sup>-1</sup>. Nesses solos as doses que causaram efeito no chumbo foram maiores que o cobre.

No caso de fuga dos organismos no ensaio com Argissolo em relação ao chumbo este apresentou diferença significativa na dose de 180 mg.kg<sup>-1</sup>, sendo o solo restritivo a contaminação aguda por chumbo, porém o mesmo só apresentou 80% de fuga, que é o índice que prevê a contaminação do solo na dose de 720 mg.kg<sup>-1</sup>. Apresentou 100% de fuga também somente na última dose sendo assim como o Planossolo. Encontrar valores significativos de fuga para chumbo com 180 mg.kg<sup>-1</sup>, é um resultado interessante para prever contaminação, dado que este valor de prevenção é considerado pelo CONAMA (2009).

O Latossolo apresentou um dos resultados mais surpreendente para o chumbo apesar de obter diferença significativa em valores menores de fuga que o Planossolo, 360 mg.kg<sup>-1</sup>, e apresentar mais de 80% de fuga na dose de 720 mg.kg<sup>-1</sup> (indicando contaminação). No ensaio da última dose, enquanto os outros solos apresentaram 100% de fuga, o Latossolo apresentou 50% dos organismos em cada lado. Esse resultado não era esperado no ensaio, porém, Natal-da-Luz et al (2008) afirmaram em seu trabalho que solos de textura fina podem mascarar resultados de contaminação, alterando o comportamento de evasão dos organismos.

Os ensaios foram feitos nas mesmas condições para todos os solos, diferentemente do cobre, onde observou-se um padrão no chumbo, no qual esse comportamento de fuga foi diferente. Natal-da-Luz (2008) explanou em seus estudos com solo artificial, que pequenas diferenças na quantidade de matéria orgânica no solo de textura fina podem ser menos importantes para influenciar a resposta de fuga de minhocas, do que pequenas quantidades de matéria orgânica em um solo arenoso ou médio. Ele constatou em testes de fuga, comparando diferentes classes de textura com o mesmo teor de matéria orgânica, a fuga em texturas finas era maior que em outros tipos de solo.

Neste trabalho foi encontrado que o Latossolo além de ser o solo com textura mais fina também é o solo com maior teor de matéria orgânica. As características desse solo influenciaram no comportamento diferenciado dos organismos.

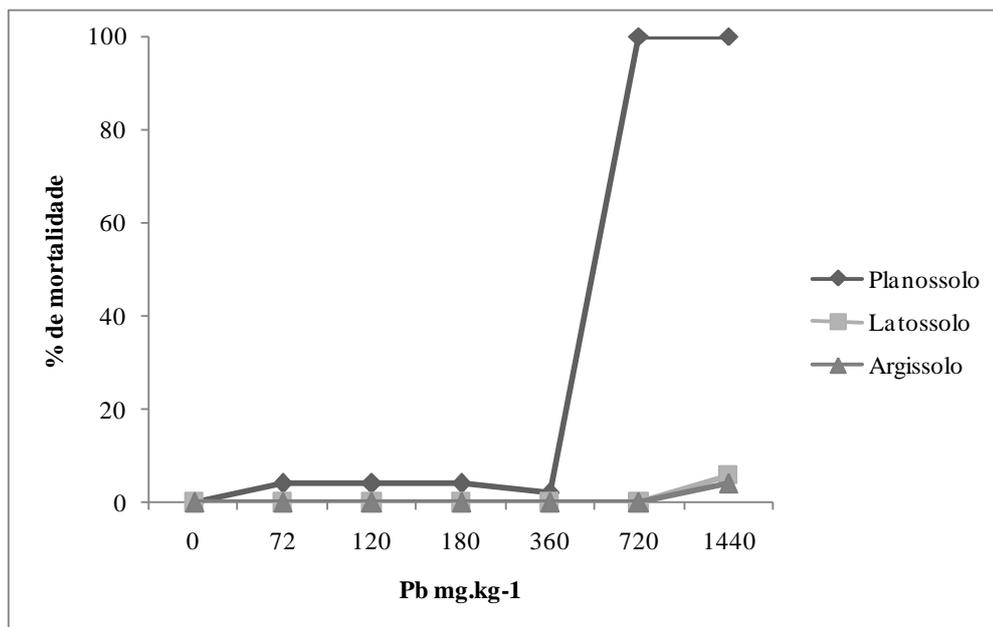
#### **4.2.2. *Eisenia andrei*: ensaio de letalidade e reprodução**

Os resultados referentes ao ensaio de reprodução e letalidade de *Eisenia andrei* nos três solos contaminados com diferentes concentrações de chumbo estão nas Figuras 16 e 17. A reprodução de juvenis pela *E. andrei* apresentou uma redução significativa no Planossolo na primeira dose de chumbo de  $72 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Para Argissolo também apresentou redução significativa na primeira dose. Para o Latossolo, assim como no cobre, não apresentou taxa natalidade, não sendo encontrado nenhum indivíduo em nenhuma das concentrações, mesmo no controle. O pH possui umidade e condutividade elétrica se mantiveram estáveis durante todo o processo.

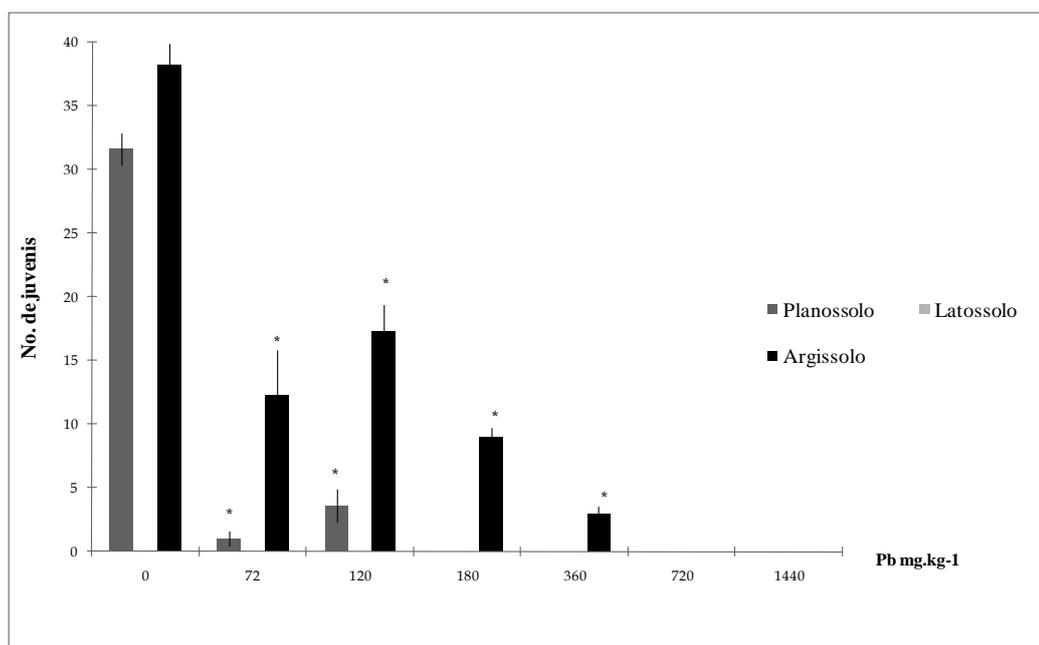
No Planossolo o controle da média de juvenis foi de 31,2 indivíduos, caindo para uma média de somente 1 juvenil e aumentando um pouco na dose seguinte, porém, chegando a zero na dose de  $180 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Figura 17). O Planossolo foi o único solo em que a *E. andrei* apresentou letalidade ao chumbo, chegando a 100% na dose de  $720 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Os organismos foram mais sensíveis ao chumbo no Planossolo.

Para o Argissolo a *E. andrei*, também foram apresentadas diferenças significativa na diminuição da reprodução na primeira dose de  $72 \text{ mg.kg}^{-1}$ , onde a testemunha apresentou uma média de 38 juvenis, e na dose seguinte esse número caiu para 12 juvenis (Figura 17). As doses seguintes continuaram com comportamento semelhante, diferindo estatisticamente do controle. A reprodução foi totalmente inibida somente na dose de  $720 \text{ mg.kg}^{-1}$ . O Argissolo não apresentou 50% de letalidade chegando ao máximo de 5% de letalidade na última dose. No entanto foi verificado que na última dose a *E. andrei* não se alimentou corretamente. Quando a comida foi repostada, depois de 15 dias de ensaio, foi verificado que ainda havia aveia no recipiente, indicando que a *E. andrei* não se alimentou. Também foi atentado a perda de massa de até quase 50% do peso original.

O Latossolo não teve presença de juvenis sendo inapto a reprodução de *E. andrei*. Assim como ocorreu no ensaio com cobre não houve reprodução nem mesmo no controle. A letalidade foi baixa nesse solo sendo menor que 10%. Todavia foi verificado, alterações no peso dos organismos e também foi verificado que eles não se alimentaram corretamente na última dose, assim como no Argissolo.



**Figura 16.** Taxa de letalidade em porcentagem da *E. andrei* diante das concentrações de chumbo em  $\text{mg.kg}^{-1}$ .



**Figura 17.** Relação entre número médio de Juvenis de *E. andrei* nas diferentes doses de Chumbo em  $\text{mg.kg}^{-1}$ . Barra de Erro. \* Dose onde ocorreu diferença significativa pelo programa estatístico Statistica.

Os resultados sobre a reprodução e letalidade da *E. andrei* em relação ao chumbo geraram valores limitantes ao seu desenvolvimento. No Planossolo a inibição da reprodução na primeira dose, apresentou um valor de CENO menor ou igual a  $72 \text{ mg.kg}^{-1}$  e um CEO  $72 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Como a reprodução foi praticamente zero, na primeira dose o programa estatístico gerou uma concentração efetiva de  $\text{CE}_{50}$   $13,98 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Tabela 7) sendo este o valor mais baixo de todos os ensaios realizados.

Em relação à letalidade a *E. andrei* foi pouco resistente ao chumbo no Planossolo na dose de 720 mg.kg<sup>-1</sup>, houve 100% de letalidade dos indivíduos permanecendo assim na última dose. Diante desse resultado o programa *Priprobit* estimou uma CL<sub>50</sub> de 437,93 mg.kg<sup>-1</sup> de chumbo (Tabela 7).

No Argissolo a *E. andrei* apresentou diferença significativa sobre a reprodução na primeira dose. Esse resultado gerou valor de CEO de 72 mg.kg<sup>-1</sup>, um CENO menor igual a 72 mg.kg<sup>-1</sup>. Como a reprodução foi baixa o programa *Statistica* estimou uma CE<sub>50</sub> de 53,92 mg.kg<sup>-1</sup>, onde seria diminuído o a 50% a população de juvenis (Tabela 7). Esse valor assim como no Planossolo está abaixo do valor estudado, portanto concentrações menores que a primeira dose já causam efeito na população de *E. andrei*. Esse valor também está abaixo do proposto pelo CONAMA (2009) para o valor da prevenção. O Argissolo não foi atingido a letalidade com as doses testadas, somente de 6% da população. Porém o programa *Priprobit* estimou uma dose de CL<sub>50</sub> 1869 mg.kg<sup>-1</sup> um pouco maior que a dose utilizada nos ensaios, que foi de 1440 mg.kg<sup>-1</sup>, mas esse valor seria uma estimativa, dado que este valor não foi testado efetivamente. Provavelmente valores maiores próximos a 1869 mg.kg<sup>-1</sup> atingiriam a letalidade de 50% da população.

Como não houve reprodução no Latossolo não foi possível estimar o CENO e CEO, CE<sub>50</sub>. Não foi possível estimar o valor de chumbo que causasse alteração nos indivíduos para esse solo. Deve então testar outro solo com características semelhantes para estudar o chumbo. Essa espécie de oligochaeta em testes laboratoriais, não conseguiu se reproduzir neste solo. Porém outras espécies podem vir a se desenvolver, deve-se fazer uma amostra da fauna local deste solo para verificar quais espécies são naturais da região.

Não houve letalidade dos adultos no Latossolo diante das concentrações de chumbo experimentadas. Houve apenas letalidade de 6% das minhocas, porém o programa *Priprobit* estimou a dose que causaria letalidade de 50% da população CL<sub>50</sub> 1825,42 mg.kg<sup>-1</sup>, (Tabela 7) sendo um pouco acima da dose estudada de 1440 mg.kg<sup>-1</sup>.

**Tabela 7.** Valores de CENO (Concentração de Efeito não Observado), CEO (Concentração de Efeito Observado), CE<sub>50</sub> (Concentração Efetiva Média), CL<sub>50</sub> (Concentração Letal Média), para o chumbo em mg.kg<sup>-1</sup> nos três solos obtidas através dos ensaios realizados com *E. Andrei*.

	CENO	CEO	CE <sub>50</sub>	CL <sub>50</sub>
Planossolo	<72	72	13,98 (5,03-22,93)	437,93
Latossolo	*	*	*	1825,42
Argissolo	<72	72	53,92 (24,26-83,58)	1869

1. CENO, CEO e CE50 obtidos através do programa statistica. 2. CL50 obtidos através do programa Priprobit. 3. Entre parênteses intervalo de concentração de cobre. \* não foi possível calcular os valores na estatística.

Para *E. andrei* no Planossolo e no Argissolo os valores encontrados, que alteram a reprodução da espécie está abaixo do valor de prevenção proposto pelo CONAMA (2009) que é de 72 mg.kg<sup>-1</sup> evidenciando mais uma vez a importância dos ensaios ecotoxicológicos.

Outros autores acharam valores diferentes para a tolerância ao chumbo no solo. Spurgeon et al (1994) utilizando solo artificial, encontrou chumbo sendo um dos metais menos tóxico entre os estudados encontrando uma CE<sub>50</sub> 1940 mg.kg<sup>-1</sup> e CL<sub>50</sub> 3760 mg.kg<sup>-1</sup>. Também utilizando o mesmo contaminante em um solo artificial, Langdon et al (2005) encontraram valores altos também como CE<sub>50</sub> 2841 mg.kg<sup>-1</sup> e CL<sub>50</sub> 5824 mg.kg<sup>-1</sup>. Bradham et al (2006) utilizou em diferentes solos naturais para verificar contaminação em *E. andrei*, não

estabeleceu CE<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub>, porém relatou letalidade de 50% dos organismos em alguns solos acima do valor de 2000 mg.kg<sup>-1</sup>, em alguns deles até 100% de letalidade. Esses valores são elevados, comparando com os valores encontrados neste trabalho. A letalidade ocorreu somente nas últimas doses dos solos estudados, porém a reprodução foi inibida logo nas primeiras doses, dando resultados de CE<sub>50</sub> baixos. Deve-se observar que o trabalho de Spurgeon et al (1994) e Langdon et al (2005) utilizaram solos artificiais, portanto podem apresentar resultados diferente quando comparados em solos naturais que possuem vários outros fatores que podem influenciar na retenção do metal. Elucidando o experimento de Bradham et al (2006) citado anteriormente, os solos naturais também obtiveram valores mais baixos que os artificiais, assim como no presente trabalho. Isso afirma a necessidade dos contaminantes serem cada vez mais testados em solos naturais, com diferentes texturas para que possa verificar o comportamento da *E. andrei* diante da contaminação em solo natural.

A forma de absorção de metais pela *E. andrei* não foi estudada neste trabalho, porém é de suma importância que seja comentado visto que assim como a reprodução foi inibida, a letalidade não foi atingida em todos os solos e o ensaio de fuga teve resultados diferente ao de reprodução, as vias de absorção são um importante fator na geração desses valores.

Como uma espécie ultra epigeica da *E. andrei* alimenta-se quase que inteiramente na superfície do solo em matéria orgânica (LANGDON et al, 2005), portanto quase não ingere o contaminante, tem maior contato na superfície de sua pele. Spurgeon e Hopkin (1995) sugerem que a captação do metal feita pela *E. andrei* seja de forma dérmica Langdon et al (2005) observaram que as concentrações de chumbo encontradas no tecido das minhocas e no solo eram iguais devido a disponibilidade do Pb no solo, uma vez que foi adicionado na forma de solução. Porém espécies como *L. rubellus* e *A. cartilaginosa* além de viverem dentro do solo também fazem parte de sua alimentação, tiveram valores de CE<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub> menores que o da *E. andrei*. Isso ocorre pois além do contato dérmico, também o utilizam o solo durante a alimentação (LANGDON et al, 2005). As diferenças das vias de absorção dos Oligochaetas interferem na sensibilidade da espécie. Mesmo sendo do mesmo grupo taxonômico espécies com absorção diferente podem obter concentrações de CL<sub>50</sub> e CE<sub>50</sub> diferentes. É recomendado considerar as vias de absorção, na hora de comparar as concentrações obtidas nas diferentes espécies. A absorção pelos Oligochaetas pode ocorrer de formas diferentes, porém independente da forma, quanto mais o metal estiver livre na solução do solo, mais passível as minhocas estarão de serem contaminadas.

#### **4.2.3. *Folsomia candida*: ensaio de letalidade e reprodução**

Foi observada a influência do chumbo no ciclo de vida da *Folsomia candida*, e estes valores podem ser vistos nas Figuras 18 e 19. O Planossolo foi o solo que melhor se desenvolveu o *F. candida* tendo maior número de juvenis entre os três na testemunha, 377 indivíduos e o Latossolo foi o solo menos favorável.

Não houve alteração no pH, condutividade elétrica e umidade durante o ensaio.

O Planossolo só apresentou diferença significativa quanto à diminuição da reprodução de juvenis a partir da dose de 720 mg.kg<sup>-1</sup> de chumbo (Figura 19). Anteriormente a essa dose, a reprodução ocorreu normalmente, aceitando concentrações altas chumbo neste solo. Ao comparar com os resultados de *Eisenia andrei*, onde esse valor foi muito mais baixo na primeira dose. Pode-se perceber que neste solo houve um pequeno aumento de juvenis na primeira dose de chumbo, sendo maior que a testemunha, depois esse valor cai. Esse solo teve 100% de letalidade na última dose, quando comparados com os outros solos foi o único solo ter letalidade de adultos na dose de 1440 mg.kg<sup>-1</sup>.

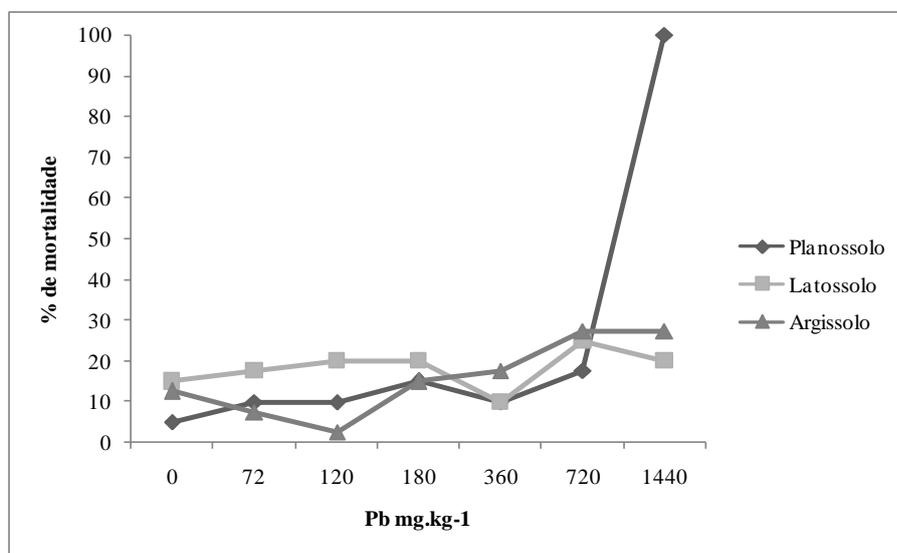
Para o Argissolo é possível observar um comportamento diferente na reprodução, na primeira dose há uma grande queda no número de juvenis, dando diferença significativa na

reprodução, seguido de um aumento de juvenis, chegando próximo ao valor da testemunha, permanecendo estável até cair de novo na dose de 720 mg.kg<sup>-1</sup> e assim se manter (Figura 19). O organismo apresentou uma sensibilidade na primeira dose, aumentou seu número de indivíduos nas próximas doses tendo uma redução em doses mais altas.

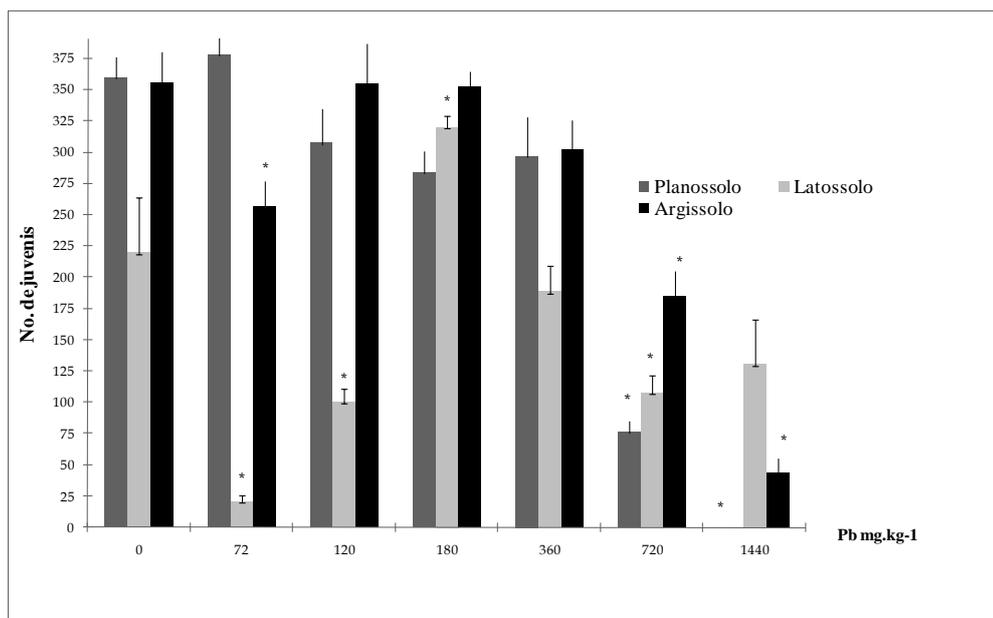
Não houve letalidade de pelo menos 50% dos indivíduos. O valor de letalidade mais alto encontrado neste solo foi de 27% nas últimas doses (Figura 18). Porém assim como ocorreu nos ensaios anteriores, foi observado que os indivíduos de *F. candida* não se alimentaram, o que favoreceu o desenvolvimento de fungos (Figura 20) e também os organismos não cresceram o suficiente na última dose, permanecendo no tamanho de juvenil.

De todos os ensaios realizados, com *E. andrei* e *F. candida*, o ensaio de chumbo no Latossolo, avaliando o desenvolvimento da *Folsomia candida*, obteve o resultado mais diferente. Na primeira dose de 72 mg.kg<sup>-1</sup> teve uma queda muito grande do número de juvenis, indo para uma média de somente 21 indivíduos apresentando diferença significativa (Figura 19). Depois esse número de juvenis aumenta bastante chegando a 320 juvenis na dose de 180 mg.kg<sup>-1</sup>, sendo até maior que o controle, e volta diminuir. Porém na última dose esse número aumenta de novo. Diante disso tem-se diferença significativa na redução da reprodução dos organismos, nas doses de 72 mg.kg<sup>-1</sup>, 120 mg.kg<sup>-1</sup>, 180 mg.kg<sup>-1</sup> e 720 mg.kg<sup>-1</sup>, nas outras não há diferença. Esse comportamento de aumento e redução do número de juvenis não foi observado em nenhum ensaio com cobre ou com chumbo, somente neste ensaio, tendo todas as repetições quantidades semelhantes, não se observou possível erro experimental.

A letalidade chegou a 25% na dose de 720 mg.kg<sup>-1</sup>, não matando 50% dos juvenis em nenhuma das doses (Figura 18). Porém o mesmo que ocorreu nos ensaios citados, aconteceu neste solo, o indivíduo não se alimentou e o fungo se proliferou. Também não houve crescimento nos adultos, preservando-se no tamanho de juvenis. Nursita et al (2005) observaram uma redução significativa no tamanho dos adultos para as duas últimas concentrações de Pb (1500 e 3000 mg.kg<sup>-1</sup>), assim como ocorreu neste ensaio, os organismos não se alimentaram corretamente, favorecendo a proliferação de fungos. De acordo com o que foi discutido anteriormente, a má alimentação e ausência de crescimento dos adultos são consequências da contaminação do metal, onde o organismo investe sua energia metabólica em eliminar o metal absorvido, prejudicando outros desenvolvimentos.



**Figura 18.** Taxa de letalidade em porcentagem da *F. candida* diante das concentrações de chumbo em mg.kg<sup>-1</sup>.



**Figura 19.** Relação entre número médio de Juvenis de *F. candida* nas diferentes doses de Chumbo em mg.kg<sup>-1</sup> nos três solos. Barra de Erro. \* Diferença estatística significativa pelo programa Statistica.



**Figura 20.** Fungo nas maiores doses de Chumbo, indicando que os *F. candida* não se alimentaram.

Os dados obtidos geraram valores limitantes ao desenvolvimento dos organismos. Para o Planossolo foi alcançado um valor de CENO menor que 720 mg.kg<sup>-1</sup> e um CEO de 720 mg.kg<sup>-1</sup> (Tabela 8). Como não foi testada a concentração entre esses valores e 360 mg.kg<sup>-1</sup> o programa *Statistica* gerou um valor de CE<sub>50</sub> de 552 mg.kg<sup>-1</sup>, em que se inibe a reprodução de 50% dos organismos. Este valor foi alto em comparação com os resultados obtidos no mesmo solo para *E. andrei*, onde esse valor foi CE<sub>50</sub> 13 mg.kg<sup>-1</sup>. Isso demonstra que a contaminação por chumbo pode ser prejudicial aos organismos em diferentes concentrações dependendo do seu nicho ecológico. Todos os organismos adultos morreram na última dose, esse resultado gerou um valor de CL<sub>50</sub> de 762 mg.kg<sup>-1</sup>, mais alto do que para *E. andrei* de 437,93 mg.kg<sup>-1</sup>.

No Argissolo ocorreu uma diminuição dos juvenis na primeira dose, provocando diferença significativa, e mesmo aumentando o número de juvenis nas doses seguintes esse

resultado gerou um CENO menor ou igual a 72 mg.kg<sup>-1</sup> e um CEO de 72 mg.kg<sup>-1</sup> (Tabela 8). Porém como o número de juvenis não chegou a 50% de redução, a CE<sub>50</sub> que o programa *Statistica* estipulou foi de 782 mg.kg<sup>-1</sup>, superior que o valor estipulado para *E. andrei* que foi de 53,92 mg.kg<sup>-1</sup> de chumbo. Assim como em todos os ensaios, pode-se observar a diferença entre organismos para as mesmas condições do contaminante. Não foi possível encontrar CL<sub>50</sub>, pois não houve letalidade de 50% dos indivíduos, todavia, o valor de CL<sub>10</sub> foi de 139 mg.kg<sup>-1</sup> (Tabela 8).

O Latossolo apresentou resultados oscilantes sobre o desenvolvimento de juvenis. Como logo na primeira dose houve uma redução grande de juvenis, o valor de CENO foi menor ou igual 72 mg.kg<sup>-1</sup> e o de CEO de 72 mg.kg<sup>-1</sup>, calculado pelo programa *Statistica* (Tabela 8). Porém como os resultados das doses foram bem discrepantes, em um momento aumentando e outro diminuindo, não foi possível encaixar os dados em nenhuma das equações propostas pelo programa *Statistica*. Sendo assim não foi possível calcular CE<sub>50</sub>. Mas como foi observada a diminuição de indivíduos logo na primeira dose, é indicado que a contaminação não exceda esse valor, pois há o alerta que poderá causar alguma alteração no ciclo de vida dos organismos.

No Latossolo não foi atingida a porcentagem de 50% de letalidade em nenhuma das doses estudadas. Apesar de ter atingido até 25% de letalidade na dose de 720 mg.kg<sup>-1</sup> e 20% na dose de 1440 mg.kg<sup>-1</sup> (Figura 18), não foi possível calcular a CL<sub>10</sub> e nem CL<sub>50</sub>. Os dados não se adequaram ao programa *Priprobit* (Tabela 8). Quando o programa lê que em uma concentração menor, como de 720 mg.kg<sup>-1</sup>, ocorreu 25%, tem letalidade maior que a dose seguinte, 1440 mg.kg<sup>-1</sup>, houve 20% de letalidade, não consegue reconhecer os valores e assim não pode calcular a CL<sub>50</sub>.

**Tabela 8.** Valores de CENO (Concentração de Efeito não Observado), CEO (Concentração de Efeito Observado), CE<sub>50</sub> (Concentração Efetiva Média), CL<sub>50</sub> e CL<sub>10</sub>(Concentração Letal Média), para o chumbo em mg.kg<sup>-1</sup> nos três solos obtidas através dos ensaios de reprodução realizados com *Folsomia cãndida*.

	CENO	CEO	CE <sub>50</sub>	CL <sub>10</sub>	CL <sub>50</sub>
Planossolo	<720	<720	552 454-650	152	762
Latossolo	<72	<72	*	*	*
Argissolo	<72	<72	782 626-939	149	*

1CENO, CEO e CE<sub>50</sub> obtidos através do programa *statistica*. 2 CL<sub>50</sub> obtidos através do programa *Priprobit*.. 3 Entre parênteses intervalo de concentração de chumbo. \* não foi determinado valor pelo teste estatístico.

Diferentes dos outros ensaios, o *F. candida* foi bem resistente ao chumbo em todos os solos. Apesar de apresentar diferença significativa na reprodução em relação ao controle em doses baixas, o efeito só foi observado em doses bem acima do que está previsto na legislação do CONAMA (2009). Para o *F. candida*, no caso do chumbo, os valores previstos na legislação, não causariam problemas no seu ciclo de vida, apesar de ter outras alterações, visto o CENO e CEO.

Assim como não foi encontrado valor de CE<sub>50</sub> para o Latossolo neste estudo outros estudos também não encontraram, como Nursita et al (2005) que não conseguiu estimar valor de CE<sub>50</sub>. Os autores Sandfer e Hopkin (1997) encontraram valor altíssimo para CE<sub>50</sub> 2790 mg.kg<sup>-1</sup>. Porém assim como citado anteriormente, Sandfer e Hopkin (1997) utilizaram concentrações bem distantes nos ensaios, 100, 400, 2000, 10000 e 50000 mg.kg<sup>-1</sup> de Nitrate

de Chumbo, o que pode interferir nesta concentração os valores encontrados neste trabalho, ficaram entre 552-782 mg.kg<sup>-1</sup>. A utilização de doses tão distantes pode interferir no valor de CE<sub>50</sub>.

Os organismos estudados são resistentes ao chumbo, tolerando valores muito altos. Nursita et al (2005) relata que Collembola apresentou alta reprodução em solo contaminado com Nitrato de chumbo, mesmo com maior concentração o número expressivo de juvenis, foram observados em todos os solos tratados com Pb, encontrada na amostra de controle. Sandfer e Hopkin (1997) afirmam que o Collembola pode ser mais resistente ao chumbo que outros metais. Estes resultados podem ser explicados pelo Collembola ter um mecanismo de prevenção ou por mecanismos de tolerância de células intersticiais, em que o chumbo é temporariamente ligado com essas células e subsequentemente removido do corpo através da mudança de epitélio (JOOSSE; VERHOEFF, 1983, NURSITA et al, 2005).

### 4.3. Discussão Geral

Avaliando todos os ensaios realizados, têm-se os seguintes resultados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Valores de CENO (Concentração de Efeito não Observado), CE<sub>50</sub> (Concentração Efetiva Média), CL<sub>50</sub> e CL<sub>10</sub>(Concentração Letal Média) para cobre e chumbo em mg.kg<sup>-1</sup> nos três solos obtidas através dos ensaios de reprodução e letalidade realizados com *Folsomia candida* e *Eisenia andrei*.

Cu						
	<i>Eisenia andrei</i>			<i>Folsomia candida</i>		
	CENO	CE <sub>50</sub>	CL <sub>50</sub>	CENO	CE <sub>50</sub>	CL <sub>10</sub>
Planossolo	<30	29	435	<120	117	137
Latossolo	*	*	692	<350	299	*
Argissolo	<30	61	690	<30	119	42
CONAMA	Prevenção	60		Intervenção	200	
Pb						
	<i>Eisenia andrei</i>			<i>Folsomia candida</i>		
	CENO	CE <sub>50</sub>	CL <sub>50</sub>	CENO	CE <sub>50</sub>	CL <sub>50</sub>
Planossolo	<72	14	438	<720	555	762
Latossolo	*	*	1825	<72	*	*
Argissolo	<72	54	1869	<72	782	*
CONAMA	Prevenção	72		Intervenção	180	

Valores estimados por programas estatísticos, Statistica para CE e CENO e Priprobit para CL. \* Não foi possível calcular as concentrações.

Nos ensaios realizados os valores de CENO, CE e CL foram diferentes quando comparados aos organismos e metais. Os ensaios com *E. andrei* Latossolo e Argissolo tiveram CL<sub>50</sub> semelhante, apesar da característica diferente entre os dois. Nos ensaios com *F. candida* Argissolo e Planossolo apresentaram valores mais próximos de CE<sub>50</sub> para cobre. Em todos os ensaios realizados, independente do metal, do CENO, o Planossolo foi o solo que obteve os valores mais baixos de concentração efetiva (CE<sub>50</sub>). Em alguns casos mesmo com CENO mais alto, como no ensaio de *Folsomia candida* com cobre e chumbo, quando

calculado a concentração efetiva que inibe 50% dos juvenis,  $CE_{50}$ , esse valor foi menor que os solos que apresentaram menor CENO. Logo, a redução de 50% da população, quando ocorreu foi mais acentuada que os outros solos.

Em sua análise sobre a influência das características do solo, sobre a toxicidade de metais para os invertebrados do solo, Van Gestel et al (1995) concluiu que o pH, a capacidade de troca catiônica, argila, e teor de matéria orgânica do solo são parâmetros do solo importantes que afetam a biodisponibilidade dos metais. De acordo com estudos ecotoxicológicos, Lock (2000) diz que a quantidade de matéria orgânica e pH são os fatores que mais influenciam na absorção dos metais pelos organismos. Bradham et al (2006) verificou em estudos com vários solos naturais de contaminação por chumbo, que para a reprodução a mais importante propriedade do solo é de óxidos de ferro e alumínio amorfos (FEAL). Porque FEAL é rica em sítios de troca catiônica dependentes do pH estas e outras propriedades como capacidade de troca catiônica, têm um efeito causal sobre a adsorção de Pb.

A revisão realizada por Nahami (2007), sobre vários estudos com metais em ecotoxicologia explicita que: o pH; o aumento do teor de matéria orgânica (CORP; MORGAN, 1991; MA et al, 1983); a capacidade de troca catiônica e cátions no solo (BEYER et al, 1987; LOCK; JANSSEN, 2001; MORGAN; MORGAN, 1988); tamanho de partículas de argila (JANSSEN et al, 1997) de Fe e Al oxi-hidróxidos (JANSSEN et al., 1997; PEIJNENBURG et al, 1999) são fatores que reduzem a disponibilidade dos metais no solo. Em todos os casos o aumento nestes parâmetros aumenta a adsorção de íons metálicos para as partículas do solo, reduzindo assim a concentração de metais na solução do solo, aumentando a disputa por sítios de adsorção, ou reduzindo a concentração de íons metálicos livres na solução por complexação, reduzindo assim a disponibilidade de metais para as minhocas.

O presente trabalho atenta que o Planossolo foi o solo mais restritivo a contaminação por ser um solo arenoso. A textura foi o parâmetro que mais influenciou nos resultados dos ensaios ecotoxicológicos. Além do mais, este solo também possui menor teor de matéria orgânica (Tabela 2 e Tabela 3). A textura arenosa e o baixo teor de matéria orgânica do Planossolo favorecem a disponibilidade dos metais em solução por ter menor quantidade de sítios de adsorção disponíveis. Conseqüentemente o metal fica mais disponível em solução favorecendo a absorção pelos organismos do solo. Sposito (2008) diz que solos arenosos têm tendência a deixar os metais mais disponíveis na fase líquida por conter menos sítios de ligação.

Todos os solos se encontram dentro da faixa de pH de disponibilidade de metais (5,5-6,5) proposta por Alloway (1988). Martinez e Motto (2000) encontraram um limiar de disponibilidade de pH 5,2 para chumbo e 5,5 para cobre. Portanto nos ensaios realizados o pH não causou influência na disponibilidade dos metais no solo. Porém o Latossolo possui o pH maior que os outros solos, favorecendo maior retenção dos metais deixando-os menos disponível. O fato do Latossolo também ter maior teor de matéria orgânica e textura muito argilosa, favorece que o metal seja mais adsorvido que nos outros ensaios. Devido ao tempo de incubação, quase todo metal inserido no solo em forma de solução foi adsorvido nos sítios de ligação deste solo, quase não os deixando em solução. Isso explica os resultados de concentração efetiva mais alta neste solo e também a reação dos organismos em outros ensaios.

Em todos os ensaios o *Folsomia candida* apresentou valores de  $CE_{50}$  e  $CL_{50}$  maiores que a *Eisenia andrei*, demonstrando que a *E. andrei* é mais sensível aos metais que o *F. candida*. Percebe-se que os valores para Collembola são bem maiores que para Oligochaeta, sendo até 3 vezes maior. Um dos fatores a considerar para tal diferença de valor é o nicho ecológico de cada grupo. A *E. andrei* vive dentro do solo, se alimenta de matéria orgânica, pode ingerir solo, o *F. candida* vive nos poros do solo, mais superficialmente e se alimenta

principalmente de fungos. Bruss Perdensen et al (2000) afirma que uma vez que o Collembola não está ligado ao solo, outras vias de absorção devem ser estudadas. Como o Collembola utiliza levedura como a única fonte de alimento, a mesma pode ser menos exposta à substância em estudo através do solo do que outros que precisam ou preferem outras fontes de alimentos, outro ponto que deve ser observado é a diferença de epitélio entre os dois organismos, onde o Collembola possui um exoesqueleto e o oligochaeta possui epitélio mais fino. Algumas espécies fizeram respiração cutânea, a troca de substâncias pelo epitélio deve ser considerada. Langdon et al. (2005) e Spurgeon e Hopkin (1995) sugerem que a absorção principal de metais pelas minhocas seja pela pele. Estudos de concentração de metais no tecido dos organismos reforçam essa hipótese. O mesmo ainda não está claro em relação aos Collembolas.

Em relação à diferença entre os metais, o chumbo foi mais restritivo para o desenvolvimento da *E. andrei* e o Cobre foi mais restritivo para o desenvolvimento da *F. candida*. A *E. andrei* também apresentou valores baixos para o cobre sendo semelhante a alguns estudos apresentados, mas para o chumbo as concentrações foram menores que o cobre e muito menores que estudos semelhantes. O *F. candida* foi muito resistente ao chumbo, apresentando valores altos de concentração efetiva e em alguns casos nem pode ser calculado  $CL_{50}$ . A *E. andrei* mostrou-se muito mais sensível aos metais no solo, do que o *F. candida*, reforçando a diferença entre organismos de grupos diferentes e enfatizando o uso de espécies de diferentes níveis tróficos nos ensaios ecotoxicológicos.

Nos ensaios realizados para *E. Andrei*, tanto para chumbo, quanto para cobre, os valores de  $CE_{50}$  no Argissolo e Planossolo ficaram abaixo do valor de prevenção previsto pelo CONAMA (2009). Para *F. candida* o ensaio com cobre a  $CE_{50}$  ficou abaixo do valor de investigação proposto pelo CONAMA (2009), para chumbo as concentrações ficaram acima, porém esse organismo é mais resistente ao chumbo, como foi verificado em estudos de Nursita et al (2005) e Sandfer e Hopkin (1997). O valor de prevenção é um alerta, onde a investigação é a decisão tomada. Nos casos em que os valores de  $CE_{50}$  ficaram abaixo dos valores orientadores se fosse necessário esperar até atingir o valor de intervenção para tomada de decisão, pode-se observar que estas espécies sofreriam danos.

Apesar da concentração efetiva não matar os organismos o fato de não poder se reproduzir, normalmente compromete a perpetuação da espécie, pois quando os adultos forem mortos, não haverá juvenis para substituí-los. A legislação não foi feita com auxílio de ensaios Ecotoxicológicos, portanto, ao ser aplicado esses valores, algumas populações podem ser prejudicadas. A utilização de testes ecotoxicológicos com diferentes organismos na determinação de valores orientadores é essencial para que não haja alteração na fauna do solo diante a presença de metais, além disso, as concentrações entre os solos foram distintas, o que remete a diferente capacidade dos solos de reter metais, modificando sua disponibilidade para os organismos.

Este trabalho reforça a necessidade utilização de ensaios ecotoxicológicos para determinação de valores orientadores e também para avaliação de risco ecológico. Apesar da técnica de ensaios ecotoxicológicos terem sido mundialmente mais difundida, a partir da década de 1980, no Brasil os estudos com solo nos dias atuais ainda estão em processo embrionário, são poucos os artigos encontrados nessa área do país, os protocolos utilizados no âmbito nacional, aceitos pela comunidade acadêmica, são baseados em espécies exóticas, com a maioria de clima frio, podendo interferir nos resultados para nosso solo. O estudo de metais foi bastante explorado no exterior, porém a maioria com solos artificiais. Não há consenso na participação das propriedades do solo, sobre a contaminação dos organismos. É essencial o estabelecimento destes testes com solos naturais, para melhor compreender os efeitos da contaminação de resíduos no solo e as alterações que possam causar na fauna do solo.

## 5. CONCLUSÕES

Entre os organismos estudados, foi compreendido que a *Eisenia Andrei* é mais sensível aos metais que a *Folsomia candida* apresentando resultados mais baixos de CE<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub>.

O Planossolo foi o solo mais restritivo a contaminação entre os três solos, em todos os ensaios este solo apresentou os valores mais baixos de CE<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub> para todos os organismos. De acordo com suas propriedades conclui-se que os solos mais arenosos favorecem maior biodisponibilidade de metais aos organismos do solo.

O Cobre foi o metal mais tóxico, letal e restritivo entre os estudados apresentando CE<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub> mais baixo

Solos com características físicas e químicas diferentes apresentaram valores de CE<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub> distintos.

As concentrações de metais que causam alterações no ciclo de vida dos organismos, diferem das concentrações expostas pelos valores orientadores apresentados pelo CONAMA (2009)

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLOWAY, B.J. The Science of the Total Environment Chapter 4: Metal Availability. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. Printed in The Netherlands, 75, 1988, 41-69p.
- AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; BARRA, C. M.; LÃ, O. R. Química dos metais pesados no solo. In: Química e Mineralogia do Solo, Parte II – Aplicações, 685p. MELO, V. F. E ALLEONI, L. R. F. (eds.), SBCS, Viçosa, 2009.
- AMORIM, M.J.B. ROMBKE, J. SCHEFFCZYK, A. SOARES, A.M.V.M. *Enchytraeus albidus* and *Enchytraeus luxuriosus* using the herbicide Phenmedipham. *Chemosphere* v61 . 2005. 1102–1114p
- ANDRADE, A. M. S. Estudo sobre a biologia de *Macrothrix elegans* Sars (1901) (Crustacea: Anomopoda) e uma avaliação sobre sua sensibilidade ao dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). Instituto de Biologia, Salvador, BA, UFBA, 2003. 49p.
- ANDREIA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.), Número Especial 2: 2010. 95-107p.
- ANDREIA, M.M. Biodindicadores ecotoxicológicos de Agrotóxicos. São Paulo, Instituto Biológico. (Instituto Biológico, Comunicado Técnico, 83) 2008.
- ANTONIOLLI, Z.I., RENDIN, M., SOUZA, E.L., POCOJESKI, E. Metais Pesados, Agrotóxicos e Combustíveis: Efeito na População de Colêmbolos no Solo. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.43, n.6, jun, 2013. 992-998p.
- BARCELOUX, D.G. Copper. *Clinical Toxicology*, 37(2):217 .1999
- BEYER, W.N., CROMARTIE, E.J., A survey of Pb, Cu, Zn, Cd, Cr, As and Se in earthworms and soil from diverse sites. *Environ. Monit. Assess.* 8, 1987. 27-36p.
- BIANCHI, M. O. CORREIA, M.E.F. RESENDE A.S. CAMPELLO E.F.C. Importancia dos estudos ecotoxicológicos com invertebrados do solo. Embrapa Agrobiologia, Série documentos 266. 32p. 2010
- BIANCHI, M. O. Ensaio Ecotoxicológicos como Ferramenta para Avaliação do Impacto Ambiental de Resíduos de Mineração Sobre o Solo. 2013. 141f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ,
- BRADHAM, K.D. DAYTON, E.A. BASTA, N.T. SCHRODER, J. PAYTON, M. Effect of soil properties on lead bioavailability and toxicity to earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 25, No. 3, 2006. 769–775p.
- BRUUS PEDERSEN, M. VAN GESTEL, C.A.M. and ELMEGAARD, N. effects of copper on reproduction of two Collembolan species exposed through soil, food, and water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 19, No. 10, 2000. . 2579–2588p.

BURROWS, L.A., EDWARDS, C.A. The use of integrated soil microcosms to predict effects of pesticides on soil ecosystems. *European Journal of Soil Biology*, 38. 2002. 245-249p.

CARVALHO, A. E. F.; LEONEL, L. F.; MATSUBARA, K. G.; SILVA, E. M. F.; SASAKI, T. H.; MONZANE, P. V. G. Avaliação ecotoxicológica de ecossistemas aquáticos da bacia hidrográfica do rio Itaqueri (Itirapina/Brotas, SP): uma análise espacial. In: VI Congresso de Meio Ambiente da AUGM, São Carlos. Anais de Eventos da Ufscar, v.5. 2009.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, CETESB, FIT (Ficha de Informação Toxicológica), Chumbo e seus compostos. 2012a

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO CETESB, FIT (Ficha de Informação Toxicológica) Cobre e seus compostos. 2012b.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO CETESB, Relatório de estabelecimento de Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo. / Dorothy C. P. Casarini, Claudio Luiz Dias, Alfredo Carlos Cardoso Rocca, Mara Magalhães Gaeta Lemos, Edson Rogério Batello, Juliana Gaiba de Almeida, Andreia Capeleti, Marisa Cury, Ana Cristina Truzzi - -São Paulo, Biblioteca, 2001

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO CETESB, Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo. São Paulo: CETESB; 2005. Disponível em < [http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela\\_valores\\_2005.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf)>. Acesso em 15 de julho de 2012

CHAVES, L. H. G.; BRITO, M. E. B.; CARVALHO, A. P.; DANIEL, R.; RIBEIRO, S.; SANTOS, R. T. Adsorção de cobre em amostras de Plintossolo do Estado do Piauí, com diferentes características. *R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental*, v.13, n.3, 2009. 226–232p.

CIKUTOVIC, M.A., FITZPATRICK, L.C., VENABLES, B.J., GOVEN, A.J. Sperm count in earthworms (*Lumbricus terrestris*) as a biomarker for environmental toxicology: effects of cadmium and chlordane. *Environ. Pollut.* 81, 1993. 123-125p.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE , CONAMA, Resolução CONAMA Nº 420 de dezembro de 2009. Disponível em : <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>. Acessado em 22 de junho de 2012.

CORP, N., MORGAN, A.J., Accumulation of heavy metals from polluted soils by the earthworm, *Lumbricus rubellus*: can laboratory exposure of ‘control’ worms reduce biomonitoring problems? *Environ. Pollut.* 74. 1991. 39-52p.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPÍNDOLA, E. L. G.. A toxicidade em Ambientes Aquáticos: discussão e métodos de Avaliação. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 7, 2008. 1820-1830p.

COX, D.W. Disorders of copper transport. *British Medical Bulletin*, 55(3),1999. 544–555p.

CROUA, Y. MOIA, C. Rapid communication: The relative sensitivity of growth and reproduction in the springtail, *Folsomia candida*, exposed to xenobiotics in the laboratory: An indicator of soil toxicity, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 2006. 115–121p.

DEMUYNCK, S. GRUMIAUX, F. MOTTIER, V. SCHIKORSKI, D. LEMIÈRE, S. LEPRÊTRE, A. Cd/zn exposure interactions on metallothionein response in *Eisenia fetida* (annelida, oligochaeta). *Comparative biochemistry and physiology*, part c 145, 2007. 658–668p.

DIDDEN, W.A.M. Ecology of terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37, 2–29; 1993

ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY, Author Information pack 14 Mar 2012 [www.elsevier.com/locate/ecoenv](http://www.elsevier.com/locate/ecoenv), 2012

EMBRAPA, Centro de Pesquisas de Solos. Manual de métodos de análise de solo. 2. ed. atual. Rio de Janeiro, 212p. (EMBRAPA CNPS. Documentos; 1) 1997.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, EPA, Effect of pH, DIC, orthophosphate and sulfate on drinking water cuprosolvency. Washington, DC, US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development (EPA/600/R-95/085). 1995.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, EPA, Office of solid waste and emergency response, 168p. mais apêndices. (EPA/540/R-95/128, 1996.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, EPA, Technical background document for soil screening guidance. Draft review. Washington DC :EPA, pi. (EPA/540/R-94/106), 1994.

EUROPEAN COMMUNITY, Council Directive 91/689/EEC of 12 December 1991 on hazardous waste. *Official Journal of the European Communities*. L. Legis 1991; 377: 0020 – 0027, 1991.

EUROPEAN COMMUNITY. Commission Decision 94/3/EC of 20 December 1993 establishing a list of wastes pursuant to Article 1a of Council Directive 75/442/EEC on waste. *Official Journal of the European Communities*. L, Legis 1993; 005: 0015 – 33 [07/01/1994]. 1993.

EUROPEAN COMMUNITY. Council Decision 94/904/EC of 22 December 1994 establishing a list of hazardous waste pursuant to Article 1 (4) of Council Directive 91/689/EEC on hazardous waste. *Official Journal of the European Communities*. L, Legis 1994; 356: 0014 – 22 [31/12/1994], 1994.

FIERA, C. Biodiversity of Collembola in urban soils and their use as bioindicators for pollution. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.44, n.8, ago. 2009. 868-873p.

FITZPATRICK, L.C., MURATTI-ORTIZ, J.F., VENABLES, B.J., GOVEN, A.J., Comparative toxicity in earthworms *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* sex-posed to cadmium nitrate using artificial soil and filter paper protocols. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 1996. 63-68p

HOFFMAN DJ, RATTER BA, BURTON GA JR, CAIRNS J JR: Handbook of Ecotoxicology. Boca Raton, FL: Lewis/CRC, 1995

HOPKIN, S.P. Biology of the Springtails (Insecta: Collembola). Oxford University Press, Oxford, United Kingdom. 1997

IAP. Instituto Ambiental do Paraná. Manual de metodos para avaliação da toxicidade. Curitiba, 101p, 1997.

IOM. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. A report of the Panel on Micronutrients, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and of Interpretation and Use of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Washington, DC, National Academy Press. 2001.

ISO. Soil quality - Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour - Part 2: Test with Collembolans (*Folsomia candida*) ISO 17512-2, International Standard Organization, Geneva, 2008.

ISO. Soil quality – avoidance test for testing the quality of soils and the of chemicals – test with earthworms (*Eisenia andrei*). International Standard Organization Guideline No. 17512-1. 2006.

ISO. Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia andrei*). Part 2. Determination of Effects on Reproduction. ISO 11268-2, International Standard Organization, Geneva. 1997.

ISO. Soil quality — effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.). Determination of effects on reproduction and survival. Switzerland: Geneva; ISO 16387, 2003.

ISO. Soil quality – Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. ISO 11267, International Standard Organization, Geneva. 1998.

JANSCH, S. AMORIM, M.J.B. ROMBKE, J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ Rev13, 2005. 63-68p.

JANSSEN, R.P.T., POSTHUMA, L., BAERSELMAN, R., DEN HOLLANDER, H.A., VAN VEEN, R.P.M., PEIJNENBURG, W.J.G.M. Equilibrium partitioning of heavy metals in Dutch field soils. II. Prediction of metal accumulation in earthworms. Environ. Toxicol. Chem. 16, 1997. 2479-2488p.

JOOSSE, E.N.G., VERHOEFF, S.C. Lead tolerance in Collembola. Pedobiologia 25, 1983. 11–18p.

KABATA-PENDIAS, A. PENDIAS, H. Trace elements in soil and plants. 3 Ed. Boca Raton, CRC Press 2001, 413p.

KENDALL RJ, LACHER TE JR (eds): Wildlife Toxicology and Population Modeling. Integrated Studies of Agroecosystems. Chelsea, MI: Lewis, 1994.

- KHALIL, M.A., ABDEL-LATEIF, H.M., BAYOUMI, B.M., VAN STRAALLEN, N.M., Analysis of separate and combined effects of heavy metals on the growth of *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta; Annelida), using the toxic approach. *Appl. Soil Ecol.* 4. 1996. 213-219p.
- LANDNER, L., LINDESTROM L. Copper in society and in the environment. Vasteras, Swedish Environmental Research Group (MFG) (SCDA S-721 88), 1999.
- LANGDON, C.J., HODSON, M.E., ARNOLD, R.E., BLACK, S., Survival, Pb-uptake and behaviour of three species of earthworm in Pb treated soils determined using an OECD-style toxicity test and a soil avoidance test. *Environmental Pollution*, 138, 2005. 368-375p.
- LANGDON, C.J., PEARCE, T.G., MEHARG, A.A., SEMPLE, K.T., Resistance to copper toxicity in populations of the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Dendrodrilus rubidus* from contaminated mine wastes. *Environmental Toxicology Chemistry* 20 (10). 2001. 2336-2341p
- LIMA, A.C. Ordem Collembola, 45-53. *Insetos do Brasil*. Rio de Janeiro, Editora Escola Nacional de Agronomia, 470p. 1938
- LIU, X. CHENGXIAO, H. ZHANG, S. Effects on earthworm activity on fertility and heavy metals bioavailability in sewage sludge. *Environment International*, Amsterdam, v 31, 2005. 874-879p.
- LOCK, K. COLIN R. JANSSEN, and. DECOEN, W. M. Multivariate test designs to assess the influence of zinc and cadmium bioavailability in soils on the toxicity to *enchytraeus albidus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 19, No. 11, 2000. 2666–2671p.
- LOCK, K., JANSSEN, C.R., Cadmium toxicity for terrestrial invertebrates: taking soil parameters affecting the bioavailability into account. *Ecotoxicology* 10. 2001. 315-322p.
- LOUREIRO, S.. SOARES, A.M.V.M. NOGUEIRA, A.J.A. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environmental Pollution*, 138. 2005. 121-131p.
- LUKKARI, T. AATSINKI, M. VAISANEN, A. HAIMI, J. toxicity of copper and zinc assessed with three Different earthworm tests. *Applied soil ecology*, 30. 2005. 133–146P
- LUZA SC, SPEISKY HC. Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63, 1996. 812–820p.
- MA, W., EDELMAN, T., VAN BEERSUM, I., JANS, T. Uptake of cadmium, zinc, lead, copper by earthworms near a zinc-smelting complex: influence of soil pH and organic matter. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* v30, 1983, 424-427p.
- MA, W.C., Toxicity of copper to lumbricid earthworms in sandy agricultural soils amended with Cu-enriched organic waste materials. *Ecol. Bull.* 39, 1988. 53-56p.
- MARTINEZ, C.E. MOTTO, H.L. Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environmental Pollution*, v107. 2000. 153-158p.

MARTINS, S. C. Adsorção e dessorção de Cu em solos com aplicação de lodo de esgoto e calda bordalesa. 2005. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Solos e Nutrição de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

MATTIAZZO-PREZOTTO, M.E. Comportamento de cobre, cádmio, cromo, níquel e zinco adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH. Piracicaba, SP, 1994. 197p. Tese (Livre Docência) -Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1994.

MORGAN, J.E., MORGAN, A.J., Earthworms as biological monitors of cadmium, copper, lead and zinc in metalliferous soils. *Environ. Pollut.* 54. 1988. 123-138p.

NAHMANI, J. HODSON, M.E. BLACK, S.. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environmental Pollution* 145, 2007. 402-424p.

NATAL-DA-LUZ, T. OJEDA, G. PRATAS, J. VAN GESTEL, C.A.M. SOUSA, J.P. Toxicity to *Eisenia andrei* and *Folsomia candida* of a metal mixture applied to soil directly or via an organic matrix. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74. 2011b. 1715–1720p.

NATAL-DA-LUZ, T. ROMBKER, J. SOUSA, J.P. Avoidance tests in site-specific risk assessment—influence of soil properties on the avoidance response of *Collembola* and Earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 27, No. 5, 2008. 1112–1117p.

NATAL-DA-LUZ, T.M.F. Integrated evaluation of the ecotoxicological risk of using sewage sludges in agriculture and in soil restoration. 2011a. Departamento de Ciências da Vida. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.

NEUHAUSER, E.F., LOEHR, R.C., MILLIGAN, D.L., MALECKI, M.R. Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia fetida*. *Biol. Fertil. Soils* 1, 1985. 149-152p.

NIEMEYER J. C., MOREIRA-SANTOS, M., NOGUEIRA M.A., CARVALHO, G.M., RIBEIRO, R., DA SILVA, E.M., SOUSA, J.P. Environmental risk assessment of a metal-contaminated area in the Tropics. Tier I: screening phase. *Journal Soil Sediments*, 2010.

NURSITA, A.I. SINGH, B. LEES. E. the effects of cadmium, copper, lead, and zinc on the growth and reproduction of *Proisotoma minuta tullberg* (*Collembola*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60. 2005. 306–314p.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, OECD - Guia para Testes Químicos – Proposal for a new guideline 220: Enchytraeidae Reproduction Test, Draft document, 2004b.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, OECD-GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Earthworm reproduction test, 222. 2004a

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, OECD-GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Earthworm, Acute Toxicity Tests. 207. 1984

PEIJNENBURG, W.J.G.M., BAERSELMAN, R., DE GROOT, A.C., JAGER, T., POSTHUMA, L., VAN VEEN, R.P.M. Relating environmental availability to bioavailability: soil type dependent metal accumulation in the oligochaeta *Eisenia andrei*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 44, 1999. 294-310p.

PETERSEN, H. General aspects of Collembolan ecology at the turn of the millennium. *Pedobiologia*. v46. 2002. 246-260p.

PONGE J. F.; GILLET, S.; DUBS, F.; FEDOROFF, E.; HAESE, L.; SOUZA, J. P.; LAVELLE, P. Collembolan communities as bioindicators of kind use intensification. *Soil Biol. Biochem.*, v.35, 2003. 813-826p.

POSTHUMA, L., HOGERVORST, R.F., VAN STRAALLEN, N.M., Adaptation to soil pollution by cadmium excretion in natural populations *Orchesella cincta* (L.) (Collembola). *Arch. Contam. Toxicol.* 22. 1992. 146–156p.

RIZZO, A.C.L. SISINNO, C. BULUS, M. SAFADI, R. FONTES, A. MOREIRA, J. Ensaio ecotoxicológicos como um instrumento de complementação da avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares em áreas contaminadas por hidrocarbonetos. CT2004-088-00 – Comunicação Técnica ao III Seminário Nacional de Saúde e Ambiente, , Rio de Janeiro, 2004. 146–156p.

ROMBKE, J. Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. *Pedobiologia* v47, 2003. 607–616p.

RÖMBKE, J., KNACKER, T., FÖRSTER, B., MARCINKOWSKI, A. Comparison of effects of two pesticides on soil organisms in laboratory tests, microcosms and in the field. In: Donker, M., Eijsackers, H., Heimbach, F. (eds) *Eco-toxicology of soil organisms*. Lewis Publ., Chelsea, Michigan. 1994. 229–240p.

SAMPLE, B.E., BEAUCHAMP, J.J., EFROYMSON, R.A., SUTER, G.W., ASHWOOD, T.L. Development and Validation of Bioaccumulation Models for Earth-worms. Environmental Restoration Program. Lockwood Martin, Tennessee. 1998.

SANDIFER R.D. & HOPKIN, S.P. Effects of Temperature on the Relative Toxicities of Cd, Cu, Pb, and Zn to *Folsomia candida* (Collembola). *Ecotoxicology and environmental safety*, v37. 1997. 125–130p.

SAUTTER, K. D. USHIWATA, C. T. KOBIYAMA, M. MACHADO, G. E. SANTOS, H. R. Influência do lodo de esgoto doméstico sobre a mesofauna edáfica. *Rev. Set. Ciênc. Agr.*, v.13, 1994. 199-203p.

SHEPPARD, M. I.; THIBAUT, D. H. Desorption and extraction of selected heavy metal from soils. *Soil Sci. Soc.Am. J.*, v56.1992. 415- 423p.

SIEKIERSKA, E., URBANSKA-JASIK, D. Cadmium effect on the ovarian structure in earthworm *Dendrobaena veneta* (Rosa). *Environ. Pollut.* 120. 2002. 289-297p.

SISINNO, C. L. S. BULUS, M. R. M. RIZZO, C. MOREIRA, J.C. Ensaio de Comportamento com Minhocas (*Eisenia fetida*) para Avaliação de Áreas Contaminadas: Resultados

Preliminares para Contaminação por Hidrocarbonetos. J. Braz. Soc. Ecotoxicol.,v. 1, n. 2, 2006. 1-4p.

SMIT, C.E., VAN GESTEL, C.A.M., Effects of soil type, percolation, and ageing on bioaccumulation and toxicity of zinc for the springtail *Folsomia candida*. Environ. Toxicol. Chem. v17. 1998. 1132–1141p.

SPOSITO, G. The chemistry of soils. New York: Oxford University Press.,234p 1989.

SPOSITO, G. The chemistry of soils. New York: Oxford University Press.234p. 2008.

SPURGEON, D. J. HOPKIN S. P. JONES D. T., Effects of Cadmium, Copper, Lead and Zinc on Growth, Reproduction and Survival of the Earthworm *Eisenia fetida* (savigny): Assessing the Environmental Impact of Point-source Metal Contamination in Terrestrial Ecosystems, Environmental Pollution v84, 1994. 123-130p.

SPURGEON, D.J., HOPKIN, S.P. Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earth-worm *Eisenia fetida*, with particular reference to zinc. Ecotoxicol. Environ. Saf. v35. 1996. 86-95p.

SPURGEON, D.J., HOPKIN, S.P. Extrapolation of the laboratory based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites. Ecotoxicology 4, 1995. 190-205p.

SPURGEON, D.J., HOPKIN, S.P., The development of genetically inherited resistance to zinc in laboratory selected generations of the earthworm *Eisenia fetida*. Environ. Pollut. v109, 2000. 193-201p.

THOMAS JM, SKALSKI JR, CLINE JF, MCSHANE MC, SIMPSON JC, MILLER WE, PETERSON SA, CALLAHAN CA, GREENE JC., Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays. Environmental Toxicology and Chemistry 5, 1986: 487 – 501p.

TRUHAUT R: Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. Ecotox-icol Environ Saf 1. 1977. 151–173p.

VAN GESTEL C.A.M., HENSBERGEN, P.J., Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae) in relation to bioavailability in soil. Environ. Toxicol. Chem. v16, 1997. 1177–1186p.

VAN GESTEL CAM, RADEMAKER MCJ, VAN STRAALLEN NM. Capacity controlling parameters and their impact on metal toxicity. In Salomons W, Stigliani WM, eds, Biogeodynamics of Pollutants in Soils and Sediments. Springer-Verlag, New York, NY, USA. 1995. 171–192p.

VAN GESTEL, C. A. M, DIRWEN-VAN BREEMEN, E. M., BAERSELMAN, R. EMANS, H.J.B., JANSSEN, J.A.M., POSTUMA, R., VAN VLIET, P.J.M. Comparison of Sublethal and Lethal Criteria for Nine Different Chemicals in Standardized Toxicity Tests Using the Earthworm *Eisenia Andrei*. Ecotoxicology and Environmental safety 23, 1992. 206-220p.

VAN GESTEL, C. A. M.; WEEKS, J. M. Recommendations of the 3rd International Workshop on Earthworm Ecotoxicology, Aarhus, Denmark, August 2001. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 57, 2004. 100–105p.

VAN GESTEL, M., VAN DIS, W.A., DIRVEN-VAN BREEMEN, E.M., SPARENBURG, P.M., BAERSELMAN, R., Influence of cadmium copper and pentachlorophe-nol on growth and sexual development of *Eisenia andrei*(Oligochaeta, Annelida). *Biol. Fertil. Soils* 12. 1991. 117-121p.

VROM, Ministry of Housing Intervention values and target values: soil quality standads. The Hague : VROM, 1994, 19p.

WHO (World Health Organization) Copper in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. World Health Organization, 2004.

WHO. (World Health Organization). Lead in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. World Health Organization, WHO/SDE/WSH/03.04/09/Rev/1, 2011.

WU, B., LIU, Z. XU, Y., LI, D., LI, M. Combined toxicity of cadmium and lead on th earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v81, 2012. 122–126p.

ZHEN LI, L. ZHOU, D.M. WANG, P. ALLEN, H.E. SAUVÉ, S. Predicting Cd partitioning in spiked soils and bioaccumulation in the earthworm *Eisenia fetida*. *Applied Soil Ecology*, v42, 2009. 118–123p.