



**Raphael Barreto de Oliveira**

**Estudo de bioacumulação de Cd, Pb e mistura  
de ambos pela *Eisenia andrei* e de homeostase  
metálica**

**Trabalho de conclusão de curso**

Trabalho apresentado como requisito para a  
obtenção do título de Bacharel pelo Programa de  
Graduação em Química do Departamento de  
Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Dillenburg Saint’Pierre

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rachel Hauser Davis

Rio de Janeiro  
Dezembro 2019



**Raphael Barreto de Oliveira**

**Estudo de bioacumulação de Cd, Pb e mistura  
de ambos pela *Eisenia andrei* e de homeostase  
metálica**

Trabalho apresentado como requisito para a  
obtenção do título de Bacharel pelo Programa de  
Graduação em Química do Departamento de  
Química

**Prf<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tatiana Dillenburg Saint’Pierre**

Orientadora

PUC-Rio

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rachel Ann Hauser-Davis**

Co-Orientadora

IOC - FIOCRUZ

## **Agradecimentos**

À minha família, por todo suporte e incentivo para que eu continuasse a faculdade.

À minha namorada, pela compreensão e força nos momentos definitivos.

Aos amigos que conheci durante meu período de formação.

Ao técnico e amigo Rafael Chávez, porque sem ele esse trabalho não seria possível.

À professora Rachel Hauser-Davis, por toda paciência e compreensão durante o tempo.

À professora Tatiana Dillenburg Saint’Pierre, por ter aceito e me direcionado para o projeto.

## Resumo

Oliveira, Raphael Barreto; Hauser-Davis, Rachel Ann; Saint’Pierre, Tatiana Dillenbourg. **Estudo de bioacumulação de Cd, Pb e mistura de ambos pela *Eisenia andrei* e de homeostase metálica.** Rio de Janeiro, 2019. 40p. Trabalho de Conclusão de Curso - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A contaminação do solo por metais tem é um importante problema mundial nas últimas décadas. Utilizando bioindicadores terrestres, como minhocas do gênero *Eisenia*, é possível determinar níveis de contaminação do solo. A camada de pele da minhoca é fina, o que torna possível a troca de elementos via cutânea. Estudou-se então as absorções de cádmio e chumbo por minhocas *Eisenia andrei* foram avaliadas após exposições a estes dois elementos. Dois experimentos foram realizados. No primeiro, grupos de minhocas foram expostas aos dois metais em um teste de contato com papel de filtro contaminado com Cd, Pb e ambos os metais, além de um grupo controle, por 72 horas. Foram adicionados 1mL de uma solução padrão 1000 mg L<sup>-1</sup> em um papel de filtro com 60cm<sup>2</sup> e 1 mL de água ultrapura. No segundo experimento, grupos de minhocas foram expostas por 30 dias a solo contaminado com Cd, Pb (1 mg kg<sup>-1</sup>, 10 mg kg<sup>-1</sup>), cada elemento ou com ambos os metais (a 1 mg kg<sup>-1</sup> e 10 mg kg<sup>-1</sup>), além de um grupo controle. Após o término dos experimentos, as minhocas foram preparadas para análises de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) através de digestão ácida com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio seguido de aquecimento e diluições apropriadas. Cada grupo de estudo foi dividido em 4 amostras (n=4) e cada amostra foi medida em 5 replicatas para a determinação da concentração. A normalidade dos dados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk. Como os dados apresentaram distribuição não-normal, os testes de Mann-Whitney e correlação de Spearman foram aplicados para análise dos dados. Os fatores de bioconcentração foram calculados para cada experimento. Diversas diferenças significativas nas concentrações de metais essenciais e correlações entre estes elementos e o Pb e o Cd foram observadas. Isto indica que a exposição a Pb e Cd leva à de-homeostase metálica de elementos essenciais, provavelmente levando a diversos efeitos bioquímicos deletérios, como reportado na literatura na forma de alterações de desenvolvimento e reprodutivas. Os animais apresentaram bioacumulação de Cd, mas não de Pb, sendo a bioacumulação do Cd menor na presença de contaminação por Pb.

**Palavras-chave:** Contaminação, metais, ICP-MS, minhocas, solo.

## Abstract

Oliveira, Raphael Barreto; Hauser-Davis, Rachel Ann; Saint’Pierre, Tatiana Dillenbourg. **Bioacumulação de Cd, Pb e mistura de ambos pela *Eisenia andrei***

**e de homeostase metálica.** Rio de Janeiro, 2019. 40p. Monograph – Chemistry Department, Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro.

Metal soil contamination has become a major worldwide problem in recent decades. Using terrestrial bioindicators, such as *Eisenia* earthworms, it is possible to determine soil contamination levels. Because the earthworm skin layers are thin it is possible the elemental exchange via the skin. Thus, cadmium and lead uptake by *Eisenia andrei* worms were evaluated after exposure to concentrations of these two elements. Two experiments were performed. In the first, earthworm groups were exposed to both metals in a contact test with filter paper contaminated with Cd, Pb, both metals, plus a control group, for 72 hours. Only 1 mL of a standard solution  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  was added to the filter paper of  $60 \text{ cm}^2$ . In the second experiment, earthworm groups were exposed for 30 days to soil contaminated with Cd, Pb ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ), each and both metals (at  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  and  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ), in addition to a control group. After completion of the experiments, earthworms were prepared for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) analyses by acid digestion with nitric acid and hydrogen peroxide followed by heating and appropriate dilutions. Each sample is read five times in ICP-MS before showing a value and each group was divided in four samples ( $n=4$ ). Data normality was assessed using the Shapiro-Wilk normality test. As the data presented non-normal distribution, Mann-Whitney test and Spearman correlation tests were applied for data analysis. Bioconcentration factors were calculated for each experiment. Several significant differences in essential metal concentrations and correlations between these elements and Pb and Cd were observed. This indicates that exposure to Pb and Cd leads to metallic dehomeostasis of essential elements, probably leading to several deleterious biochemical effects, as reported in the literature in the form of developmental and reproductive changes. The animals presented Cd bioaccumulation, but not Pb, and Cd bioaccumulation was lower in the presence of Pb contamination

**Keywords:** Contamination, metals, ICP-MS, earthworms, soil.

## Sumário

1. Introdução	2
---------------	---

1.1.	Metais como contaminantes ambientais	2
1.2.	Bioindicadores	3
1.4	Bioacumulação	7
2.	Objetivos	8
2.1.	Objetivo geral	8
2.2.	Objetivos específicos	9
3.	Metodologia	9
3.1.	Testes agudos e crônicos com minhocas <i>Eisenia andrei</i>	9
3.2.	Reagentes e materiais	10
3.2.1	Equipamentos e padrões	11
3.3.	Preparo das amostras	11
3.4	Determinação de metais por Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente acoplado (ICP-MS)	11
3.5	Análises estatísticas	13
4.	Resultados e discussão	14
4.1.	Qualidade analítica das determinações dos metais	14
4.2.	Metais nas minhocas experimentalmente expostas a Cd e Pb	15
4.3.	Diferenças entre a bioacumulação de Cd e Pb nas minhocas expostas	15
4.3.1.	Exposição a cádmio	15
4.3.2.	Exposição a chumbo	17
4.4.	Desequilíbrio de homeostase de elementos essenciais nas minhocas expostas.	19
4.4.1	Sódio	19
4.4.2.	Magnésio	20
4.4.3.	Manganês	20
4.4.4.	Ferro	21
4.4.5.	Zinco	22
4.4.6.	Selênio	22
4.4.7.	Potássio	23
4.4.8.	Cobre	23
4.4.9.	Vanádio	24
4.4.10.	Discussão	24
4.5.	Cálculo do fator de bioconcentração de Cd e Pb em minhocas <i>E. andrei</i> expostas	24
4.5.1.	Cádmio	25
4.5.2.	Chumbo	26
4.6.	Correlações entre elementos essenciais e Pb e Cd	28

Um outro teste realizado foi o teste de Spearman para verificar interferências entre elementos dentro de um mesmo grupo. A Tabela 5 mostra as correlações que apresentaram diferenças significativas nos testes ( $p < 0,05$ ) entre elementos essenciais e Cd ou Pb.	28
5. Conclusões	29
Referências	30

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Parâmetros do ICP-MS Nexlon 300X	12
Tabela 2. Isótopos analisados com seus respectivos Limite de Detecção e Limite de Quantificação	14
Tabela 3. Valores certificados e determinados do Material de Referência Certificado bovino (CRM 1577b).	14
Tabela 4. Fator de Bioacumulação Cd e Pb solo	26
Tabela 5. Correlações entre metais essenciais e contaminantes encontradas no teste de exposição ao solo	28



## Lista de Figuras

Figura 1. Concentrações de cádmio detectadas nas minhocas expostas a este metal no experimento de papel de filtro.	16
Figura 2. Concentrações de cádmio detectadas nas minhocas expostas a este metal no experimento de exposição em solo. Letras iguais indicam diferenças estatisticamente significativas entre si.	17
Figura 3. Concentrações de chumbo detectadas nas minhocas expostas a este metal no experimento de papel de filtro. Letras iguais indicam diferenças estatisticamente significativas entre si.	18
Figura 4. Concentrações de chumbo detectadas nas minhocas expostas a este metal no experimento de exposição em solo. Letras iguais indicam diferenças estatisticamente significativas entre si.	18
Figura 5. Comparação da média das concentrações de sódio no experimento do papel de filtro (A) e solo (B). Letras iguais indicam diferenças significativas entre si.	20
Figura 6. Comparação da média das concentrações de magnésio no experimento do papel de filtro (A) e solo (B). Letras iguais indicam diferenças significativas entre si.	20
Figura 7. Comparação da média das concentrações de manganês no experimento do papel de filtro (A) e solo (B). Letras iguais indicam diferenças significativas entre si.	21
Figura 8. Comparação da média das concentrações de ferro no experimento do papel de filtro (A) e solo (B). Letras iguais indicam diferenças significativas entre si.	21
Figura 9. Comparação da média das concentrações de zinco no experimento do papel de filtro (A) e solo (B). Letras iguais indicam diferenças significativas entre si.	22
Figura 10. Comparação da média das concentrações de selênio no experimento do papel de filtro (A) e solo (B).	22
Figura 11. Comparação da média das concentrações de potássio no experimento do papel de filtro (A) e solo (B). Letras iguais indicam diferenças significativas entre si.	23
Figura 12. Comparação da média das concentrações de cobre no experimento do papel de filtro (A) e solo (B).	23
Figura 13. Comparação da média das concentrações de vanádio no experimento do papel de filtro (A) e solo (B). Letras iguais indicam diferenças significativas entre si.	24

## **1. Introdução**

O meio ambiente vem sendo degradado pela humanidade após a revolução industrial até os dias atuais de maneira exponencial. As ações humanas geraram, dentre outros efeitos, destruição de florestas para aumento de terras cultivadas, aumento da concentração dos gases de efeito estufa pelo uso de combustíveis fósseis e acidentes químicos em escala global. Por isso, a partir da segunda metade do século XX, diversos encontros internacionais foram realizados para debater ações que minimizem os danos ambientais causados pela humanidade (DUARTE, 1994).

Para dimensionar os problemas ambientais em escala global, alguns exemplos serão apresentados a seguir. No Japão, a empresa Chisson utilizava mercúrio na produção de cloreto de vinila no início da década de 1940. Sem um descarte adequado, a empresa jogava o mercúrio no rio que desaguava na Baía de Minamata. Calcula-se que quase 900 pessoas morreram pela contaminação por mercúrio, devido ao consumo de peixes contaminados (O Globo, 2019). Nos Estados Unidos, um desastre aconteceu no final da década de 1980, a empresa de petróleo Exxon derramou acidentalmente todo o óleo contido em uma embarcação. Com isso, 35 mil toneladas de petróleo bruto se espalharam por 1800 km de praias (O Globo, 2019). No Brasil, dois acidentes recentes causaram grande impacto ambiental e comoção pública: as quedas de barragens em Mariana em novembro de 2015 e em Brumadinho em janeiro de 2019. Esses dois desastres deixaram solo e rios contaminados com uma lama rica em metais perigosos para a saúde humana (G1, 2019).

Com os exemplos supracitados, verifica-se então a necessidade do desenvolvimento de ferramentas para tomar conhecimento prévio e realizar tomadas de decisão acerca de possíveis contaminações ambientais por metais.

### **1.1. Metais como contaminantes ambientais**

Embora os metais possam ser encontrados naturalmente no solo, dependendo do material de origem e dos processos relacionados ao solo, em geral, a contaminação por estes elementos pode ser também resultado de atividades antropogênicas, como da disposição direta de rejeitos industriais nos solos ou lançamento na atmosfera (STEFANUTTI; MURAOKA; MALAVOLTA, 1994). A própria agricultura, mesmo sendo indispensável ao ser humano, também pode ser uma fonte de contaminação destes elementos, através do uso de fertilizantes contendo diversos metais, como

cádmio, cromo, chumbo e zinco, e pesticidas contendo cobre, chumbo, manganês e zinco (SANTOS SILVA et al., 1999).

O Cd em particular, tem sido apresentado como um agente contaminante capaz de modificar a fisiologia e o comportamento em diversos animais, o que gera consequências deletérias para o ecossistema de um modo geral. Além disso, este elemento pode também bioacumular nos organismos e competir com metais essenciais, como Se e Ca em processos metabólicos (FROSSARD et al., 2019). É usado na produção de baterias, tintas e plásticos e aparece normalmente associado a Zn, Cu e Pb. Pode entrar no organismo por inalação (normalmente em ambientes industriais) ou através do consumo de alimentos contaminados (ROCHA, 2008).

O Pb não apresenta função em atividades metabólicas do organismo e até mesmo pequenas quantidades desse elemento podem causar efeitos negativos, como anemia, problemas nos ossos, alterações renais e reprodutivas, desordens no sistema nervoso, danos hematológicos e câncer. (KHARKAN; SAYADI; REZAEI, 2019). Pode chegar ao meio ambiente pela degradação ou despejo direto de substâncias criadas por humanos: plásticos, tintas, pigmentos industriais e metalúrgicos. Esse elemento é extremamente prejudicial ao cérebro e ao sistema nervoso, além de atacar rins, sistema digestivo e reprodutor (ROCHA, 2008).

Neste contexto, surge a necessidade de avaliar os efeitos de substâncias químicas sobre os ecossistemas. Isto é realizado através de testes de ecotoxicidade, que avaliam a toxicidade e a biodisponibilidade de contaminantes em diversos organismos. Juntando informações obtidas de diferentes testes, pode-se investigar se determinados organismos são adequados indicadores de contaminação ambiental, agindo como espécies-sentinela ou bioindicadores (VAMPRÉ; FUCCILLO; DE ANDRÉA, 2010), como descrito a seguir.

## **1.2. Bioindicadores**

Bioindicadores são organismos usados na ecotoxicologia para o estudo dos efeitos de contaminantes em determinados ambientes (BROWN; DOMÍNGUEZ, 2017). Os estudos com bioindicadores podem utilizar doses letais ou subletais para entender a relação entre o contaminante e a sua influência no organismo. Assim, pode-se calcular a probabilidade de algum contaminante em causar um efeito significativo no meio ambiente com antecedência (VAMPRÉ; FUCCILLO; DE ANDRÉA, 2010), antes dos efeitos serem irreversíveis. Ao realizar estudos

relacionados à contaminação ambiental, é importante levar em conta a biodisponibilidade dos contaminantes, que é a fração de uma substância que pode ser absorvida e exercer determinados efeitos nos organismos expostos (BERTHELOT et al., 2008).

Os testes com bioindicadores podem ser classificados como agudos ou crônicos. Os agudos avaliam a resposta rápida do organismo frente à presença de determinado contaminante e analisam a letalidade causada pela exposição. São em geral mais baratos, porém, mais limitados. Já os testes crônicos podem durar até a totalidade da vida dos indivíduos e dependem dos resultados dos testes agudos (SEGAT, 2012).

Bons bioindicadores devem apresentar a capacidade de bioacumular determinado contaminante em concentrações relativamente altas, porém abaixo do nível letal para o organismo. Normalmente (mesmo não sendo obrigatório) são seres que ocupam o topo da cadeia alimentar e podem ser encontrados em várias regiões ao redor do mundo (FROSSARD et al., 2019).

Diversos ensaios ecotoxicológicos com relação aos efeitos de metais vêm sendo realizados, devido à importância destes contaminantes ao meio ambiente, em diversos organismos pertencentes a diferentes nichos tróficos. Por exemplo, os efeitos de Cd foram avaliados na víbora *Bothrops jararaca* (FROSSARD et al., 2019), onde um grupo de serpentes recebeu quantidades diferentes de alimentos (camundongos) contaminados com Cd ( $900 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Vários órgãos, sangue e fezes das serpentes foram então analisados por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). Os autores concluíram que as fezes são as principais vias para eliminação deste metal. Encontrou-se quantidades 6700 vezes mais altas nas fezes quando comparado com o grupo controle. Em outro estudo, avaliou-se a transferência de Cd, Pb e Zn ao longo da cadeia alimentar (ZIETARA et al., 2018), utilizando duas espécies de roedores e a raposa vermelha na Polônia, originárias de regiões com altas concentrações de metais no solo. Os fígado, rins e músculos das raposas e o fígado, rins e baço dos roedores foram avaliados através da técnica de digestão ácida e análise por espectrometria de absorção atômica (AAS). O estudo concluiu que áreas mais urbanas apresentaram maior concentração de Cd e Pb nos tecidos dos animais e que os mesmos são bioacumulados no rim e no fígado, com relação direta com a concentração no solo.

Além de animais, plantas também podem ser usadas como bioindicadores de contaminação por metais. Por exemplo, no estudo realizado por KHARKAN; SAYADI; REZAEI, 2019, foram usados pinheiros para analisar bioconcentração de Pb, Fe e Mn, na cidade de Birjand, entre o Irã e o Afeganistão. Foram analisadas amostras de solo, cascas e folhas de pinheiros de diferentes regiões de Birjand, através de digestão ácida e análise por espectrometria de absorção atômica. Os autores concluíram que plantas próximas de lava jatos, oficinas e lojas de conveniências apresentaram contaminação por Pb, Fe e Mn.

Na ecotoxicologia terrestre, podem ser usados minhocas, colêmbolos e enquitreídeos (PANIAGO et al., 2016). Colêmbolos são pequenos artrópodes encontrados em todo o mundo, estão entre os invertebrados mais abundantes no solo, podendo ser encontrados em serrapilheiras, árvores, litoral marinho e na água doce (BARETTA et al., 2008). Já enquitreídeos são pequenos oligoquetes da família Encytraeidae, representantes da mesofauna que habitam os primeiros 5 cm de solo (ASSIS, 2016). Neste contexto, BARETTA et al. (2008) realizaram um estudo para observar a relação entre a diversidade de colêmbolos em regiões com araucárias com a qualidade do solo, e concluíram que a quantidade de famílias de colêmbolos pode ser usada como bioindicador de distúrbios, bem como da qualidade do solo, já que a região nativa de araucária apresentou maiores condições para maior desenvolvimento do número de famílias destes organismos, quando comparada com regiões que sofreram ações antrópicas. Um estudo similar foi realizado por ASSIS (2016), que avaliou a relação entre a diversidade de enquitreídeos e o sistema de uso do solo. Quatro sistemas foram estudados (uma floresta nativa, uma olerícola orgânica com cultivo de batatas, uma olerícola convencional com cultivo de abobrinha e, por último, uma lavoura convencional com cultivo de milho), sendo analisadas 2 regiões de cada sistema. Os autores concluíram que o uso do sistema de cultura interfere na quantidade e na composição dos gêneros de enquitreídeos, que preferem sistemas de uso do solo que não utilizam fertilizantes e agrotóxicos, estando presentes em maior abundância e diversidade nestas áreas.

### **1.3. Minhocas como organismos bioindicadores**

Minhocas são de especial interesse em ecossistemas terrestres, pois, de acordo com Papini e Andréa (2004), “por meio de seus deslocamentos, revolvem o solo, misturando os horizontes e, pelos seus hábitos alimentares, influenciam as

transformações da matéria orgânica em decomposição e a circulação de nutrientes”. Estes organismos são fáceis de visualizar e coletar na terra e indicam as condições do ambiente em que vivem (MERCEDES DE ANDRÉA, 2010). Além disso, estão diretamente expostos à poluição dissolvida no solo que acaba sendo absorvida pela pele ou pela alimentação (VAMPRÉ; FUCCILLO; DE ANDRÉA, 2010). Metais podem provocar diversas alterações em minhocas, como por exemplo estresse oxidativo, redução do crescimento, diminuição da velocidade de desenvolvimento sexual, redução na produção de casulos, mortalidade dos indivíduos e alterações na diversidade de espécies em locais contaminados (ŽALTAUSKAITĖ; SODIENĖ, 2010).

Minhocas têm sido usadas com sucesso como bioindicadores de contaminação ambiental por diversos poluentes, como compostos orgânicos e metais. Por exemplo, o estudo de Vampré, Ficcillo & de Andréa (2010) apontou que a minhoca *Eisenia andrei* pode ser usada como bioindicador com relação à exposição por hexaclorobenzeno (HCB), um composto orgânico formado por um anel aromático e um cloro ligado a cada carbono do ciclo. Este contaminante é difícil de ser quebrado devido à estabilidade fornecida pela ligação entre carbono e cloro, facilitando sua bioacumulação. As minhocas foram postas em recipientes contendo amostras de terra e papel de filtro contaminado com HCB  $12 \mu\text{g L}^{-1}$  por 14 dias e apresentaram um fator de bioacumulação (FAB) de aproximadamente 6,5, indicando que a quantidade do contaminante é 6,5 vezes maior nos organismos do que no solo. (VAMPRÉ; FUCCILLO; DE ANDRÉA, 2010). Já Li et al. (2010) observaram que outra espécie de minhoca, *E. fetida*, é capaz de bioacumular Zn, Cu, Pb e Cd presente em estrume de porco. O mesmo estudo aponta que as minhocas evoluíram com uma capacidade de aguentar altas concentrações de metais em seu organismo, utilizando-os para metabolismos fisiológicos, dependendo da biodisponibilidade do metal, sendo muito utilizadas em processos de vermicompostagem (PANDAY et al., 2019).

KAUR e HUNDAL (2016) investigaram a influência de Pb, Ni e Cr no desenvolvimento, crescimento e sobrevivência da *Eisenia fetida*. Após 28 dias, com observações de 7 em 7 dias, variações de massa, casulos colocados, filhotes presentes e filhotes por casulo foram avaliados. Após 28 dias, todos os indivíduos sobreviveram, mas as amostras apontaram uma diminuição significativa de massa em relação ao controle. Quantidades maiores de casulos e indivíduos jovens foram observados no grupo controle em comparação com os solos contaminados. Já

ŽALTAUSKAITĖ e SODIENĖ (2010) analisaram a toxicidade de Cd e Pb para *Eisenia fetida*. Não houve quantidade significativa de mortes de minhocas em solos contaminados com Cd ( $p < 0,05$  comparado com o controle), afirmando então os autores que *E. fetida* é menos sensível que outras espécies de minhoca com relação a este elemento. A produção de casulos foi mais afetada após exposição a Pb e os autores indicam que a maior sensibilidade da espécie em relação ao Pb é devida à alta biodisponibilidade deste elemento.

#### 1.4 Bioacumulação

O fator de bioconcentração (FBC) indica o grau de afinidade de um poluente a organismos vivos (RAND et al., 1995), considerando-se apenas a absorção da substância pelo organismo através de superfícies respiratórias e dérmicas (ARNOT; GOBAS, 2006).

Um fator importante para que haja bioconcentração no organismo é a solubilidade dos compostos formados pelo metal, o que gera a sua biodisponibilidade para absorção (LI et al., 2010). Para ser absorvido pelas membranas biológicas, é preciso que o metal esteja na forma iônica livre, o que ocorre mais facilmente em meio aquoso (ARNOT; GOBAS, 2006). Em solo, as formas mais comuns solúveis com Pb são  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{PbCl}_2$ ,  $\text{PbO}$  e cada um possui diferente toxicidade, podendo ser mais ou menos absorvido pelo organismo (ZHANG; VAN GESTEL, 2019)

É deveras importante conhecer a solubilidade de substâncias para prever em qual meio determinada substância será mais absorvida. Com esse intuito, calcula-se o grau de hidrofobicidade ( $K_{OW}$ ) dividindo-se a concentração saturada de qualquer substância em n-octanol pela concentração saturada da mesma substância em água. Pela ordem de grandeza desse coeficiente, pode ser utilizada a função log para se estimar a partição de diferentes substâncias em fase orgânica. Critérios como presença ou ausência de grupos polares na molécula ou peso molecular influenciam no  $K_{OW}$  (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Os fatores de bioconcentração (FBC) e bioacumulação (FAC) são fatores que relacionam a concentração absorvida pelo organismo e a concentração do meio. Quanto maior for o  $K_{OW}$ , mais a substância será absorvida pelo organismo pela afinidade com a matéria orgânica e, conseqüentemente, terá maiores valores de FBC e FAC. A diferença entre esses dois fatores é que a bioconcentração não leva

em conta a alimentação como absorção, já na bioacumulação, essa fonte de ingestão de substância é levada em conta (ARNOT; GOBAS, 2006).

Pelos contaminantes avaliados serem estáveis e permanecerem por mais tempo no solo (PIECHALAK et al., 2002; DAI et al., 2004), é possível considerar duas possibilidades para seu destino, após aplicado ao solo no presente estudo, absorção pelos organismos avaliados, ou sua permanência no solo. Sabendo o quanto foi aplicado ao solo e o quanto foi absorvido pelas minhocas, pode-se calcular o quanto sobrou no solo e assim calcular o FBC de modo que:

$$FBC = [M]_{\text{absorvida}} / ([M]_T - [M]_{\text{absorvida}}) \quad \text{Equação 4}$$

Onde  $[M]_{\text{absorvida}}$  é a concentração encontrada na minhoca subtraindo o valor médio do metal pela média encontrada no grupo controle e  $[M]_T$  é a concentração adicionada ao solo, no caso  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  ou  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ .

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**



Avaliar a absorção de metais em ambientes contaminados com Cd e Pb pelo organismo *Eisenia andrei*.

## **2.2. Objetivos específicos**

- Determinar metais nos organismos expostos pelo método de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).
- Avaliar possíveis alterações na homeostase de elementos essenciais, após exposição dos organismos a Pb e Cd.
- Calcular os fatores de bioacumulação de Pb e Cd nos organismos expostos.

## **3. Metodologia**

### **3.1. Testes agudos e crônicos com minhocas *Eisenia andrei***

Tanto os testes agudos e crônicos a seguir foram realizados no Centro de Estudos do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH), pertencente à Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Para o teste agudo, utilizou-se um papel de filtro de 60 cm<sup>2</sup> em um bécher de 50 mL. Esse papel recebeu a adição de 1 mL de água tipo 1 e 1 mL de solução padrão contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> dos contaminantes. Foram criados 4 grupos, um com o contaminante Cd na concentração apresentada, um com Pb, um com a mistura dos dois contaminantes e, por último, o grupo controle que só recebeu água do tipo 1. As minhocas ficaram em contato direto com esse papel de filtro por 72 horas. Cada grupo forneceu 4 amostras (n = 4) totalizando 16 amostras no ICP-MS para esse teste.

Para o teste crônico, utilizou-se o solo classificado como Agrissolo vermelho amarelo segundo o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (Embrapa, 2013). O solo contém 605,5 g kg<sup>-1</sup> de areia, 106,7 g kg<sup>-1</sup> de silte, 287,7 g kg<sup>-1</sup> de argila, pH de 5,7 em água e 8,3 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica. Preparou-se então 7 grupos nesse teste. Cada grupo é formado por 200 g do solo citado adicionado de concentrações distintas dos contaminantes, 1 mg kg<sup>-1</sup> e 10 mg kg<sup>-1</sup> de Cd, Pb, mistura de ambos nas concentrações apontadas e o grupo controle que não sofreu adição. A duração desse teste foi de 30 dias e cada grupo forneceu 6 a 7 amostras (n = 6) totalizando 44 amostras no ICP-MS para esse teste.

As minhocas utilizadas no presente estudo foram obtidas no CESTEH. Esses organismos da espécie *Eisenia andrei* foram cultivadas em laboratório a aproximadamente 20 °C em esterco bovino.

### 3.2. Reagentes e materiais

- Ácido nítrico bidestilado 65 % (Vetec, Brasil)
- Água oxigenada suprapur 30 % (Merck, Alemanha)
- Tubos falcon de polipropileno de 15 mL e 50 mL (Sarstedt, Brasil)
- Água ultra-pura (Mili-Q, Milipore, EUA)
- Balança analítica de quatro casas decimais (OHAUS, EUA)
- Espátula de aço inoxidável
- Placa de aquecimento (Fisatom, Brasil)

### 3.2.1 Equipamentos e padrões

- Espectrômetro de ICP-MS NexIon 300X (Perkin Elmer, USA)
- Solução padrão de ródio 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Merck, Alemanha)
- Padrões de calibração monoelementares e multielementares (VHG e Perkin Elmer, USA; Merck, Alemanha), descritos a seguir:
  - Na 2000  $\text{mg L}^{-1}$  (Merck, Alemanha)
  - Multi-Element Calibration Standard 3 (No Hg) 1000  $\text{mg L}^{-1}$  (Perkin Elmer, EUA) (Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co Cu, Cs, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Ti, U, V, Zn)
  - Multi-element Calibration Standard 2 10  $\text{mg L}^{-1}$  (Perkin Elmer, EUA) (Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, La, Lu, Sc, Sm, Tb, Th, Tm, Y, Yb)
  - Multi-Element ICPMS Calibration Std. 5 10  $\text{mg L}^{-1}$  (Perkin Elmer, EUA) (B, Ge, Mo, Nb, P, Re, S, Si, Ta, Ti, W, Zr)
  - Padrão de Fe 10000  $\text{mg L}^{-1}$  (Merck, Alemanha)
  - Padrão de Ca 1000  $\text{mg L}^{-1}$  (Merck, Alemanha)
  - Padrão de Sn 1000  $\text{mg L}^{-1}$  (VHG, EUA)
  - Padrão de Hg 1000  $\text{mg L}^{-1}$  (Perkin Elmer, EUA)
  - Padrão de Ba 1000  $\text{mg L}^{-1}$  (Merck, Alemanha)
  - Padrão de Ti 1000  $\text{mg L}^{-1}$  (Merck, Alemanha)

### 3.3. Preparo das amostras

As minhocas de cada tubo foram primeiro homogeneizadas manualmente com uma tesoura de aço inoxidável. Em seguida, pesou-se em torno 0,25 g de massa úmida de cada amostra. Essas massas pesadas foram colocadas em tubos de polipropileno estéreis com capacidade para 15 mL, que foram então levadas ao LABSPECTRO (Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, PUC-Rio) para análise.

### 3.4 Determinação de metais por Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente acoplado (ICP-MS)

O procedimento empregado seguiu metodologia usada em análises de materiais biológicos no Labspectro. Adicionou-se 1,00 mL de ácido nítrico 65 % aos tubos para decompor o material biológico e, em seguida, as amostras ficaram

em repouso por um período de 24 horas. As misturas foram aquecidas por quatro horas a 100 °C na chapa de aquecimento em tubos fechados, liberando-se rapidamente a pressão quando necessário. Após as quatro horas, adicionou-se 0,20 mL de água oxigenada às amostras, para auxiliar na oxidação da gordura residual e material biológico, e levou-se para chapa de aquecimento a 100 °C por mais 15 min. Por último, as amostras foram diluídas na proporção de 1:9 com água ultra-pura e levadas para leitura no ICP-MS. Brancos foram preparados da mesma forma, contendo apenas ácido nítrico 65 %.

Para verificar a exatidão do método comparou-se o valor determinado por ICP-MS e o valor certificado do padrão utilizado. Por não existir um padrão específico para minhocas, foi utilizado o material de referência de fígado bovino (CRM 1577a).

O ICP-MS (NexIon 300X, PerkinElmer, USA) foi utilizado no modo padrão, sem uso de reação para correção de interferências. Utilizou-se uma solução 40 µg L<sup>-1</sup> de <sup>103</sup>Rh adicionada como padrão interno para minimizar as influências peculiares de cada amostra (densidade, viscosidade) no transporte e nebulização das mesmas. Adicionou-se solução com concentração de 1 µg L<sup>-1</sup> de Ce, In, Mg, Be, U, Pb e Ba para otimizar os parâmetros do equipamento, monitorando as intensidades de sinal e a taxa de formação de íons bivalentes e íon óxidos. Os parâmetros otimizados do equipamento estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros do ICP-MS Nexlon 300X

Potência de radiofrequência	1100 W
Varreduras por leitura	3
Leituras por replicatas	1
Replicatas	4
Vazão do gás auxiliar	1.02 L min <sup>-1</sup>
Vazão do gás plasma	15 L min <sup>-1</sup>
Vazão do gás carreador	1 L min <sup>-1</sup>

Para o cálculo dos limites de detecção (LD), ou seja, a menor concentração possível que o equipamento consegue detectar e limites de quantificação (LQ), que depende do fator de diluição da amostra, foram usadas as seguintes fórmulas (INMETRO, 2016):

$$LD = 3*s/\text{inclinação da reta} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = (10*s/\text{inclinação da reta})*fd \quad \text{Equação 2}$$

Onde fd é o fator de diluição para as amostras; s é o desvio padrão da medida da razão sinal do analito pelo sinal do padrão interno de 10 soluções do branco preparadas de maneira independente.

Os isótopos analisados foram  $^{114}\text{Cd}$ ,  $^{65}\text{Cu}$ ,  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{39}\text{K}$ ,  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{208}\text{Pb}$ ,  $^{82}\text{Se}$ ,  $^{51}\text{V}$  e  $^{66}\text{Zn}$ .

### 3.5 Análises estatísticas

Os dados foram primeiramente testados para verificação de sua distribuição, através do teste de Shapiro-Wilke. Como os dados observados apresentaram distribuição não-Gaussiana, os testes escolhidos para serem aplicados foram não-paramétricos. Para verificar diferenças entre as médias dos grupos foi aplicado o teste de Mann-Whitney. Para verificar possíveis correlações entre os grupos, foi aplicado o teste de Spearman. Significâncias foram consideradas quando  $p < 0,05$ . Foi realizado o teste Q para verificação de *outliers*, a 95% de confiança. De acordo com este teste, ao dividir a diferença entre dois termos seguidos pela diferença entre os termos extremos encontra-se um número que não pode ser maior que um valor tabelado. (CHRISTIAN; SKOOG; WEST, 1988). Acima deste número, o valor duvidoso pode ser rejeitado. Todos os testes com exceção dos testes de verificação de *outliers*, foram realizados no software GraphPad Prism, v.5.0. Os *outliers* foram calculados manualmente com uma calculadora científica HP 30S através da fórmula abaixo (SKOOG et al., 2008).

$$Q = (|X_D - X_p|) / f \quad \text{Equação 3}$$

Onde  $X_D$  é o valor duvidoso,  $X_p$  é o valor mais próximo do valor duvidoso em ordem crescente e f é a faixa de valores, ou seja, o maior valor do conjunto subtraído do menor valor do conjunto. Compara-se esse valor Q calculado com o valor tabelado. Se  $Q > Q_{\text{tabelado}}$ , então rejeita-se o valor duvidoso. Se for menor, mantém-se o valor duvidoso. Para  $n = 4$  e 95 % de confiança  $Q_{\text{tabelado}} = 0,829$  e para  $n = 6$  com 95% de confiança  $Q_{\text{tabelado}} = 0,625$  (SKOOG et al., 2008).

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Qualidade analítica das determinações dos metais

Os isótopos estudados com seus respectivos LD e LQ estão apresentados abaixo na Tabela 2.

Tabela 2. Isótopos analisados com seus respectivos Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Isótopo	Faixa analítica ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )
$^{114}\text{Cd}$	1-80	0,0003	0,0009
$^{65}\text{Cu}$	1-80	0,0050	0,0167
$^{57}\text{Fe}$	51-1080	0,1575	0,5250
$^{39}\text{K}$	51-1080	0,0997	0,3324
$^{24}\text{Mg}$	51-1080	0,0060	0,0200
$^{55}\text{Mn}$	1-80	0,0005	0,0018
$^{23}\text{Na}$	51-1080	0,0163	0,0543
$^{208}\text{Pb}$	1-80	0,0005	0,0017
$^{82}\text{Se}$	1-80	0,0167	0,0557
$^{51}\text{V}$	1-80	0,0127	0,0425
$^{66}\text{Zn}$	1-80	0,0321	0,1068

Com relação à análise do Material de Referência Certificado de fígado bovino utilizado, os resultados de recuperação, ou seja, comparação dos valores determinados em relação aos certificados, estão apresentados abaixo na Tabela 3, em porcentagem.

Tabela 3. Valores certificados e determinados do Material de Referência Certificado bovino (CRM 1577b).

Elemento	Determinado ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Certificado ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Recuperação (%)
Cd	$0,48 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,03$	96,0
Cu	$124 \pm 6$	$160 \pm 8$	78,5
Fe	$165 \pm 6$	$184 \pm 15$	89,7
Mg	$463 \pm 12$	$601 \pm 28$	77,0
Mn	$8,0 \pm 0,2$	$10,5 \pm 1,7$	76,1
Na	$1869 \pm 59$	$2420 \pm 60$	77,2
Pb	$0,110 \pm 0,004$	$0,129 \pm 0,004$	85,3
V	$0,120 \pm 0,007$	$0,099 \pm 0,008$	121,2
Zn	$99 \pm 6$	$127 \pm 16$	77,9

De acordo com a resolução 899 de 2003 do Ministério da Saúde, a análise é válida (considerando apenas a uniformidade do conteúdo) com recuperação dos valores certificados entre 70 e 130%, o que classifica o presente trabalho como adequado, pois todos os elementos ficaram na faixa estabelecida (ANVISA, 2003).

#### **4.2. Metais nas minhocas experimentalmente expostas a Cd e Pb**

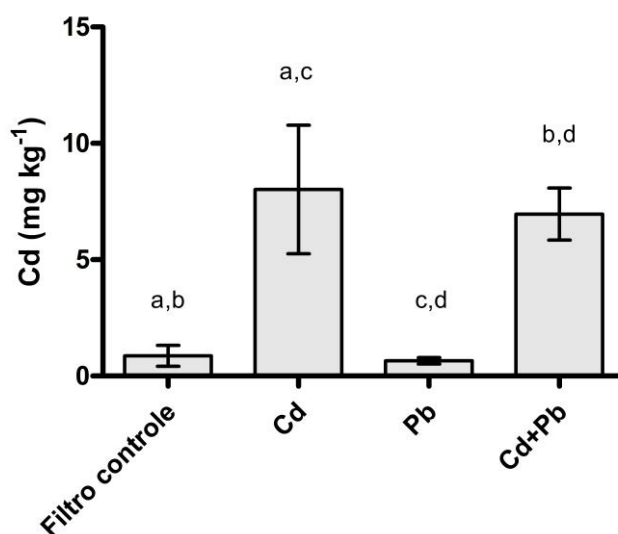
No experimento de exposição ao papel filtro, os grupos Cd 1000 mg kg<sup>-1</sup>, Pb 1000 mg kg<sup>-1</sup> e Cd + Pb com as mesmas concentrações foram comparados com o grupo controle. No experimento de exposição ao solo, os grupos Cd 1 mg, Cd 10 mg, Pb 1 mg, Pb 10 mg, Cd + Pb 1 mg e Cd + Pb 10 mg foram comparados com o grupo controle. Em seguida fez-se uma comparação entre os grupos para o experimento do papel de filtro. Usou-se o teste t não paramétrico (Mann Whitney) para as comparações.

#### **4.3. Diferenças entre a bioacumulação de Cd e Pb nas minhocas expostas**

##### **4.3.1. Exposição a cádmio**

Com relação ao experimento de contato com papel filtro na exposição a Cd (Figura 1), os grupos Cd e Cd + Pb apresentaram diferença significativa quando comparados com o controle. Além disso, houve diferença significativa entre os grupos Cd e Pb e entre os grupos Pb e Cd + Pb.

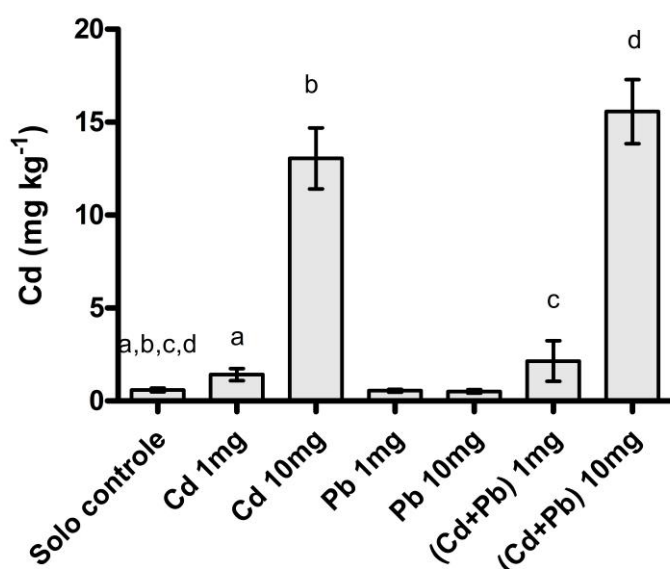
Figura 1. Concentrações de cádmio determinadas nas minhocas expostas a este metal no experimento de papel de filtro.



Com relação ao experimento de exposição em solo (Figura 2), os grupos expostos a Cd 1 mg e 10 mg e à mistura contendo 1 mg ou 10 mg apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo de solo controle. Isto indica que as minhocas absorveram o Cd presente no solo contaminado por este metal de forma significativa.



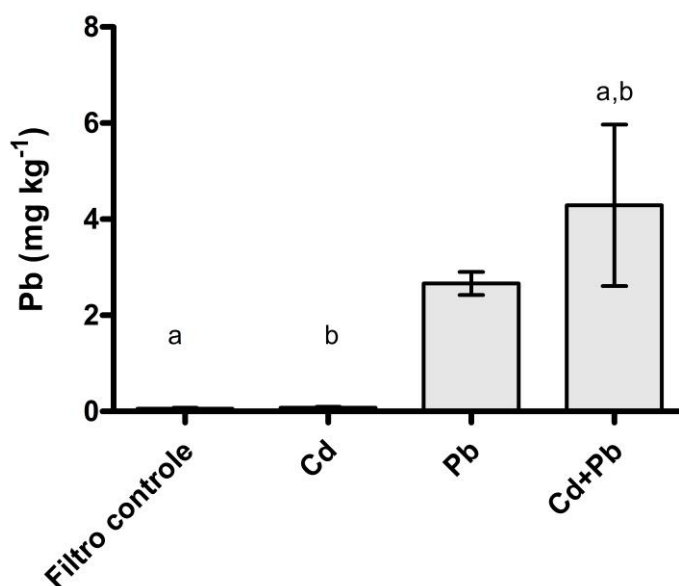
Figura 2. Concentrações de cádmio determinadas nas minhocas expostas a este metal no experimento de exposição em solo. Letras iguais indicam diferenças estatisticamente significativas entre si.



#### 4.3.2. Exposição a chumbo

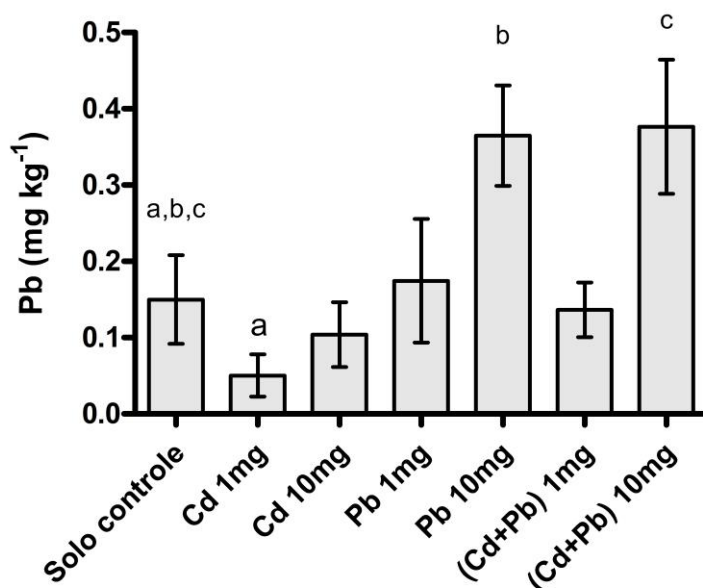
Com relação ao experimento de contato com papel filtro na exposição a Pb (Figura 3), apenas o grupo exposto à mistura de Cd e Pb apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo filtro controle, indicando absorção do Pb pelo organismo. O fato de não apresentar diferença significativa com a exposição somente ao Pb foi esse grupo apresentar um *outlier* e, por isso, apenas 2 graus de liberdade para a realização do teste. Quando comparados entre si, o grupo contaminado com Cd apresentou diferença significativa com o grupo contaminado pela mistura.

Figura 3. Concentrações de chumbo determinadas nas minhocas expostas a este metal no experimento de papel de filtro. Letras iguais indicam diferenças estatisticamente significativas entre si.



Com relação ao experimento de exposição em solo (Figura 4), os grupos Cd 1 mg, Pb 10 mg e a mistura com 10 mg apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo de solo controle.

Figura 4. Concentrações de chumbo determinadas nas minhocas expostas a este metal no experimento de exposição em solo. Letras iguais indicam diferenças estatisticamente significativas entre si.



Foi observada uma queda na absorção do Pb no solo quando havia contaminação de 1 mg kg<sup>-1</sup> de Cd. Sabe-se que existe um efeito antagônico entre Cd e Pb observado por Sobrino-Figueroa et al. (2007). Isso significa que a adição de um contaminante diminui a contaminação do outro. Seu estudo foi com outros organismos, em tempo de exposição diferente (144h) e com outras concentrações. O resultado desse experimento mostrou um efeito antagônico quando houve adição de Pb e Cd sem Cr. Isso pode explicar a diferença apresentada na medida de Pb nos animais em contato com o solo contaminando com Cd e o motivo da mistura contendo 1 mg kg<sup>-1</sup> apresentar diferença significativa com o solo controle.

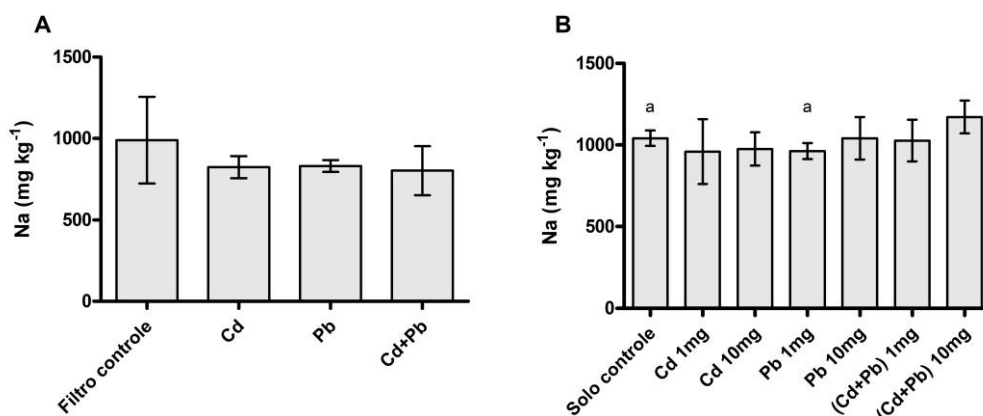
#### **4.4. Desequilíbrio de homeostase de elementos essenciais nas minhocas expostas.**

A presença de elementos tóxicos pode levar ao desequilíbrio de elementos essenciais em organismos expostos. A seguir, estão apresentados os elementos essenciais determinados em cada grupo experimental de minhocas *E. andrei* expostas a Cd e Pb e suas misturas.

##### **4.4.1 Sódio**

Com relação ao elemento Na (Figura 5A), não houve alterações significativas no teste de contato por papel filtro dos diferentes grupos expostos quando comparados com o grupo controle, nem quando comparados entre si. Assim, a presença de Cd e Pb não altera a homeostase deste elemento essencial no ambiente de papel de filtro. Com relação ao experimento em solo (Figura 5B) observou-se uma diferença significativa entre o controle e o solo contaminado com 1 mg kg<sup>-1</sup> de Pb, contradizendo a experiência no papel filtro.

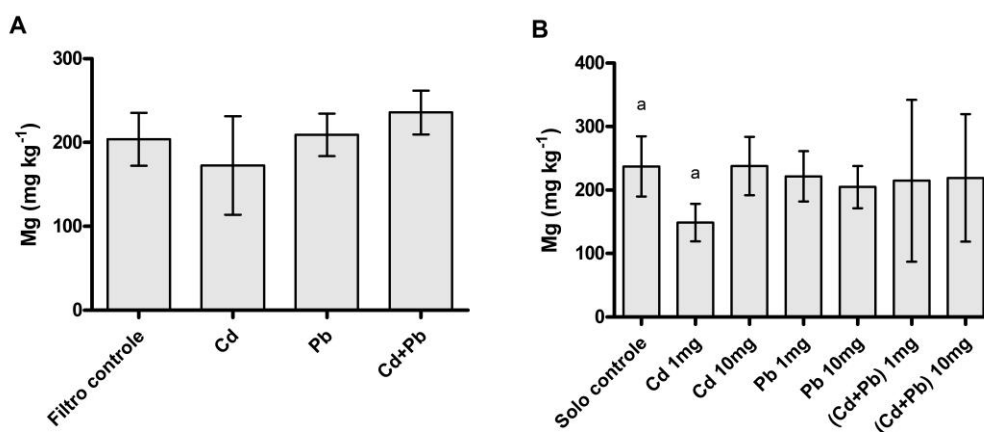
Figura 5. Comparação da média das concentrações de sódio no experimento do papel de filtro (A) e solo (B). Letras iguais indicam diferenças significativas entre si.



#### 4.4.2. Magnésio

Com relação ao elemento Mg (Figura 6A), não houve alterações significativas no teste de contato por papel filtro. Com relação ao experimento em solo (Figura 6B), somente o grupo exposto a Cd 1 mg apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo controle de solo.

Figura 6. Comparação da média das concentrações de magnésio no experimento do papel de filtro (A) e solo (B). Letras iguais indicam diferenças significativas entre si.

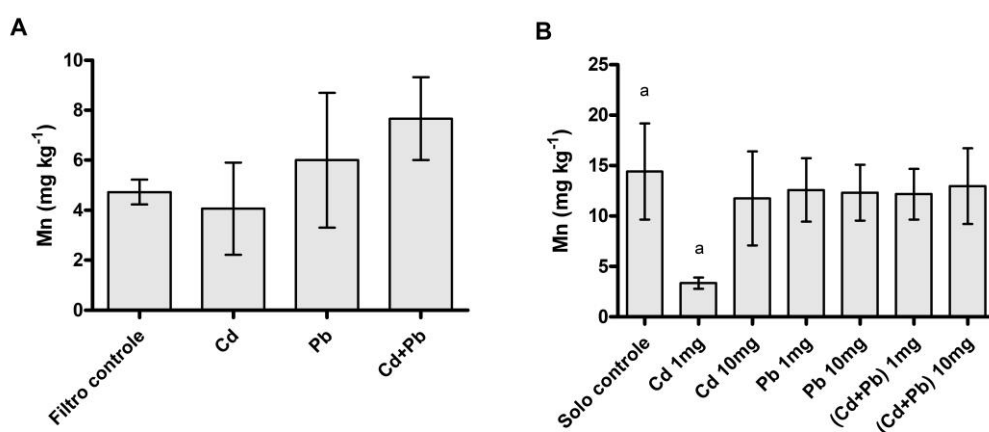


#### 4.4.3. Manganês

Com relação ao elemento Mn (Figura 7A), não houve diferença significativa no teste de contato por papel filtro. No experimento em solo (Figura 7B), somente o

grupo exposto a Cd 1 mg apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo controle de solo.

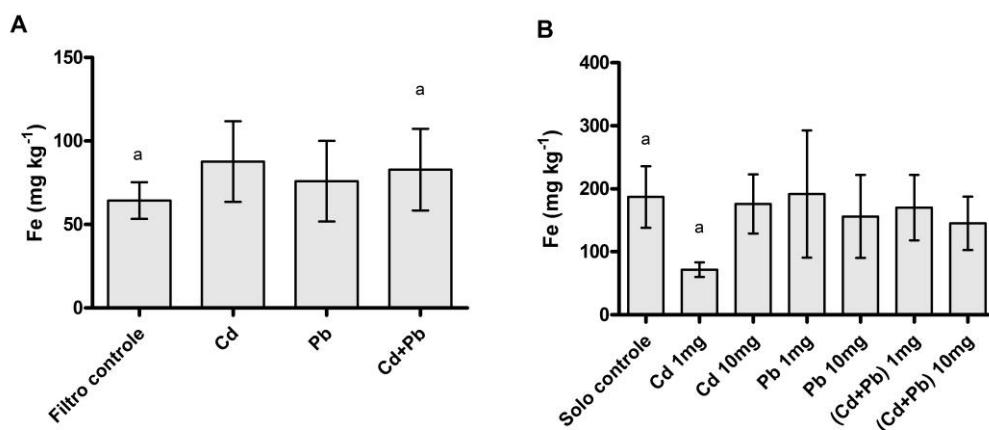
Figura 7. Comparação da média das concentrações de manganês no experimento do papel de filtro (A) e solo (B). Letras iguais indicam diferenças significativas entre si.



#### 4.4.4. Ferro

Com relação ao elemento Fe (Figura 8A), no teste de contato, houve diferença significativa entre o controle e o grupo contaminado com a mistura de Cd e Pb. Com relação ao experimento em solo (Figura 8B), apenas o grupo contaminado com Cd 1 mg apresentou diferença significativa quando comparado com o controle.

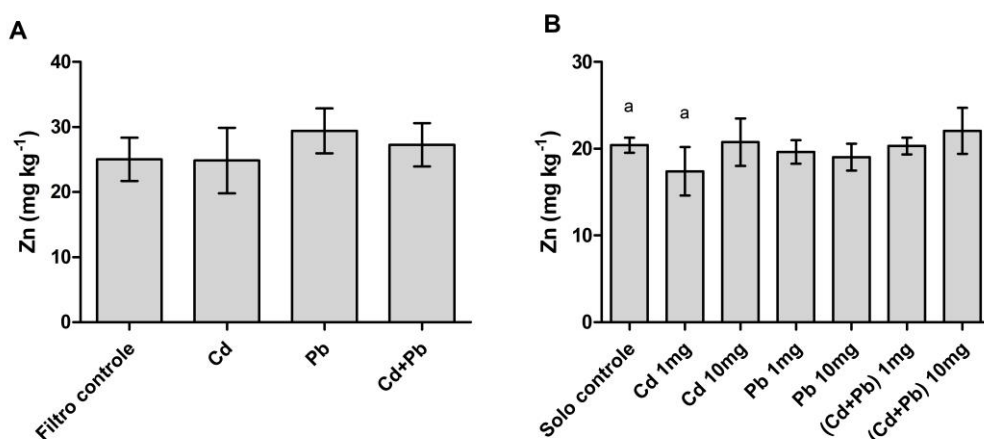
Figura 8. Comparação da média das concentrações de ferro no experimento do papel de filtro (A) e solo (B). Letras iguais indicam diferenças significativas entre si.



#### 4.4.5. Zinco

Com relação ao elemento Zn (Figura 9A), não houve alterações significativas no teste de contato por papel filtro. Com relação ao experimento em solo (Figura 9B), somente o grupo exposto a Cd 1 mg apresentou diferença quando comparado com o grupo controle de solo.

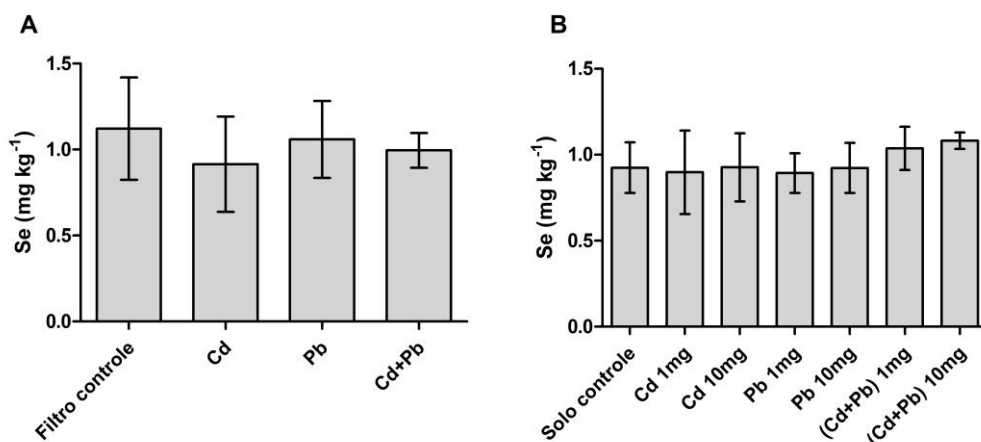
Figura 9. Comparação da média das concentrações de zinco no experimento do papel de filtro (A) e solo (B). Letras iguais indicam diferenças significativas entre si.



#### 4.4.6. Selênio

Com relação ao elemento Se (Figura 10), não houve alterações significativas no teste de contato por papel filtro e nem na exposição ao solo contaminado.

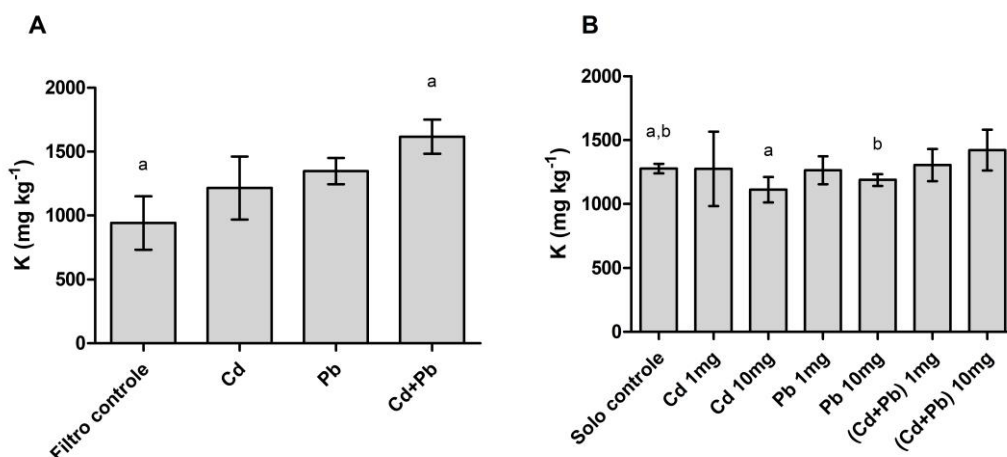
Figura 10. Comparação da média das concentrações de selênio no experimento do papel de filtro (A) e solo (B).



#### 4.4.7. Potássio

Com relação ao elemento K (Figura 11A), verificou-se diferença significativa para o grupo exposto a mistura dos elementos ao comparar os grupos com o grupo controle no teste de contato por papel filtro. Com relação ao experimento em solo (Figura 11B), os grupos Cd 10 mg e Pb 10 mg apresentaram diferença significativa comparadas com o grupo controle.

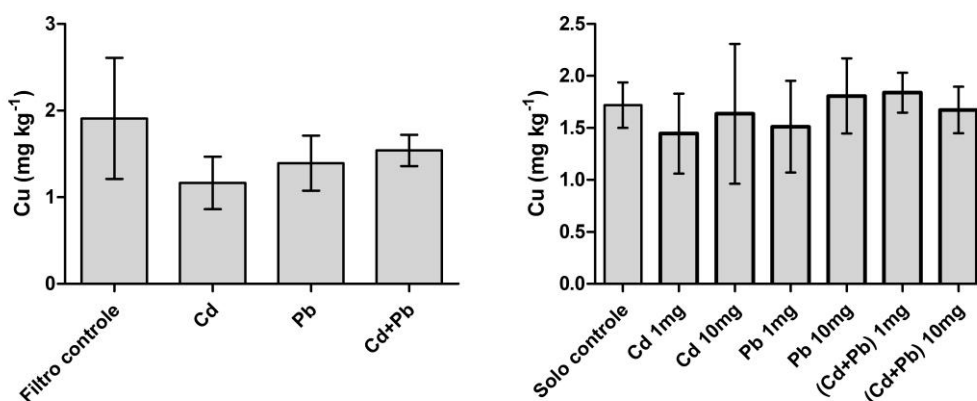
Figura 11. Comparação da média das concentrações de potássio no experimento do papel de filtro (A) e solo (B). Letras iguais indicam diferenças significativas entre si.



#### 4.4.8. Cobre

Para o Cu (Figura 12), não houve alterações significativas no teste de contato por papel filtro nem na exposição ao solo contaminado.

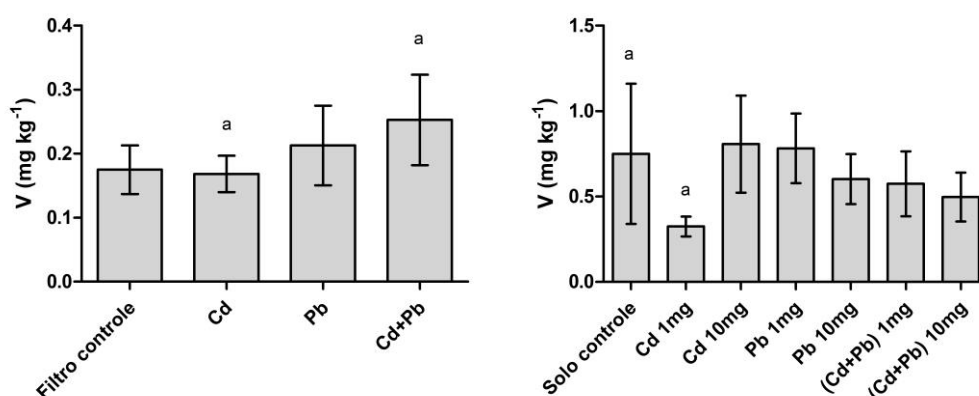
Figura 12. Comparação da média das concentrações de cobre no experimento do papel de filtro (A) e solo (B).



#### 4.4.9. Vanádio

Para o V (Figura 13A), houve diferença significativa entre o grupo Cd e o grupo contaminado pela mistura no teste de contato por papel filtro. Com relação ao experimento em solo (Figura 13B), apenas o grupo exposto a Cd 1 mg apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo controle de solo.

Figura 13. Comparação da média das concentrações de vanádio no experimento do papel de filtro (A) e solo (B). Letras iguais indicam diferenças significativas entre si.



#### 4.4.10. Discussão

Os resultados mostraram que os elementos Fe, Mg, Mn, V e Zn apresentaram diminuição de absorção na presença de 1 mg kg<sup>-1</sup> de Cd. Se fosse um erro de análise, essa queda seria apresentada em todos os elementos analisados. O fato de apresentar somente nesses elementos e somente nessa concentração de Cd é um fato que deve ser estudado mais a fundo. De acordo com ROCHA (2008), o Cd pode apresentar uma ação competitiva com Zn e Fe, o que poderia explicar essa redução. QUEIROZ (2019) também observou correlações entre Cd com os metais essenciais Fe, Zn, Cu e Mn. No presente trabalho, porém, não foi observada essa variação com o Cu.

#### 4.5. Cálculo do fator de bioconcentração de Cd e Pb em minhocas *E. andrei* expostas

Como indicado na introdução, a bioacumulação é a relação existente entre a concentração no organismo com a concentração do meio em que o organismo se encontra. Por isso, é importante enfatizar que o ideal seria fazer análises com o solo



onde os organismos permaneceram. Assim, bastaria fazer a divisão entre a concentração do analito nas minhocas sobre a concentração do analito no solo (DAI et al., 2004; LI et al., 2010). Como não foi feito, os resultados serão discutidos qualitativamente.

#### 4.5.1. Cádmio

Para o Cd, ao se adicionar  $1,00 \text{ mg kg}^{-1}$  no solo, o valor médio encontrado foi de  $1,42 \pm 0,32 \text{ mg kg}^{-1}$  e no grupo controle foi de  $0,59 \pm 0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ .

$$[M]_{\text{absorvida}} = 1,42 - 0,59 = 0,83 \pm 0,34 \text{ mg kg}^{-1}$$

$$\text{FBC} = 0,83 / (1,00 - 0,83) \sim 4,88 \pm 2,04$$

Ao se adicionar  $10,00 \text{ mg kg}^{-1}$  no solo, o valor médio encontrado foi de  $13,05 \pm 1,65 \text{ mg kg}^{-1}$ .

$$[M]_{\text{absorvida}} = 13,05 - 0,59 = 12,46 \pm 1,65 \text{ mg kg}^{-1}$$

$$\text{FBC} = 12,46 / (10,00 - 12,46) \sim -5,07 \pm 0,68$$

Neste tipo de cálculo, valores negativos indicam concentrações mais altas nos organismos do que no solo, podem ocorrer perdas de substâncias voláteis e um FBC mais baixo que o real é esperado, pois a tendência é que a concentração real seja menor que o valor estimado (ARNOT E GOBAS, 2006). Como no presente trabalho, foi usado uma conta de subtração para se chegar ao valor da concentração do metal, abre a possibilidade de o valor encontrado ser negativo. Será considerado o módulo do FBC calculado na conclusão do presente trabalho.

Analisando esse parâmetro ao se adicionar  $1,00 \text{ mg kg}^{-1}$  da mistura dos dois metais tem-se o valor médio  $2,14 \pm 1,09 \text{ mg kg}^{-1}$ .

$$[M]_{\text{absorvida}} = 2,14 - 0,59 = 1,55 \pm 1,09 \text{ mg kg}^{-1}$$

$$\text{FBC} = 1,55 / (1 - 1,55) \sim 2,82 \pm 2,10$$

Já ao se adicionar  $10,00 \text{ mg kg}^{-1}$  da mistura, o valor médio encontrado foi de  $15,57 \pm 1,73 \text{ mg kg}^{-1}$ .

$$[M]_{\text{absorvida}} = 15,57 - 0,59 = 14,98 \pm 1,73 \text{ mg kg}^{-1}$$

$$\text{FBC} = 14,98 / (10 - 14,98) = 3,01 \pm 0,37$$

Ambos os trabalhos supracitados indicam que a bioacumulação de Cd foi maior que a do Pb, corroborando os resultados observados no presente estudo.

#### 4.5.2. Chumbo

Para o Pb, ao se adicionar  $1,00 \text{ mg kg}^{-1}$  no solo, o valor médio encontrado foi de  $0,17 \pm 0,08 \text{ mg kg}^{-1}$  e no grupo controle foi de  $0,15 \pm 0,06 \text{ mg kg}^{-1}$ .

$$[M]_{\text{absorvida}} = 0,17 - 0,15 = 0,02 \pm 0,10$$

$$\text{FBC} = 0,02 / (1 - 0,02) \sim 0,02 \pm 5,00$$

Ao se adicionar  $10,00 \text{ mg kg}^{-1}$  no solo, o valor médio encontrado foi de  $0,36 \pm 0,07$ .

$$[M]_{\text{absorvida}} = 0,36 - 0,15 = 0,21 \pm 0,09$$

$$\text{FBC} = 0,21 / (10 - 0,21) = 0,02 \pm 0,43$$

Analisando o que ocorre ao adicionar  $1,00 \text{ mg kg}^{-1}$  da mistura com o valor médio de  $0,14 \pm 0,04$ .

$$[M]_{\text{absorvida}} = 0,14 - 0,15 = -0,01 \pm 0,07$$

$$\text{FBC} = -0,01 / (1 - (-0,01)) = -0,01 \pm 7,00$$

Ao adicionar  $10,00 \text{ mg kg}^{-1}$  da mistura com o valor médio  $0,38 \pm 0,09$

$$[M]_{\text{absorvida}} = 0,38 - 0,15 = 0,23 \pm 0,11$$

$$\text{FBC} = 0,23 / (10 - 0,23) = 0,02 \pm 0,48$$

A Tabela 4 a seguir resume todos os dados calculados sem os desvios padrões para uma melhor discussão.

Tabela 4. Fator de Bioacumulação Cd e Pb solo

	$1 \text{ mg kg}^{-1}$	$10 \text{ mg kg}^{-1}$	Mistura $1 \text{ mg kg}^{-1}$	Mistura $10 \text{ mg kg}^{-1}$
Cd	4,88	5,07	2,82	3,01
Pb	0,02	0,02	0,01	0,02

De acordo com WANG et al. (2018), um valor de FBC acima de 1 indica absorção e bioacumulação do xenobiótico analisado. Li et al. (2010), ao avaliar a relação entre a bioacumulação de Cu, Zn, Pb e Cd em indivíduos adultos de *E. fétida* e sua biodisponibilidade em estrume de porco, observaram que baixas concentrações de Cd em solo, menores que  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ , levam a altos valores de FBC em minhocas, encontrando valores entre 2,476 e 3,014. Na mesma análise, encontraram valores de FBC menores que 1 para Zn, Cu e Pb no mesmo estudo.

Já PANDAY et al. (2019) analisaram três espécies de minhocas, *E. fetida*, *L. mauriti* e *P. excavatus*, após exposição a lixos específicos por 45 dias, dependendo do seu nicho. A *E. fetida* foi exposta a resíduos sólidos, a *L. mauriti* foi exposta a resíduos vegetais de cozinha e a *P. excavatus* foi exposta a resíduos de papel. Após as análises de metais, os autores calcularam FBC menores que 1 para Pb e Cd, como a seguir: As concentrações de Pb nas minhocas foram de  $8,75 \pm 2,12 \text{ mg kg}^{-1}$  em *E. fetida*;  $9,38 \pm 0,38 \text{ mg kg}^{-1}$  em *L. mauriti* e  $9,62 \pm 1,23 \text{ mg kg}^{-1}$  em *P. excavatus*, e nos resíduos, de  $37,09 \pm 1,88 \text{ mg kg}^{-1}$  nos resíduos sólidos,  $47,63 \pm 1,21 \text{ mg kg}^{-1}$  nos resíduos de cozinha e  $45,09 \pm 1,03$  nos resíduos de papel. Assim, o fator de bioconcentração para Pb foi de  $0,217 \pm 0,03$ . Já para o Cd, concentrações de  $1,08 \pm 0,18 \text{ mg kg}^{-1}$  foram observadas em *E. fetida*;  $1,33 \pm 0,07 \text{ mg kg}^{-1}$  em *L. mauriti* e  $1,13 \pm 0,04 \text{ mg kg}^{-1}$  em *P. excavatus*, e nos resíduos,  $4,50 \pm 0,35 \text{ mg kg}^{-1}$  nos resíduos sólidos;  $5,12 \pm 0,53 \text{ mg kg}^{-1}$  nos resíduos de cozinha e  $4,06 \pm 0,73 \text{ mg kg}^{-1}$  nos resíduos de papel. O fator de bioconcentração para o Cd foi de  $0,26 \pm 0,03$ .

O presente trabalho verificou que *E. andrei* bioacumulou Cd, mas não Pb e ainda, que a bioacumulação do Cd é menor na presença de contaminação por Pb, indicando um possível efeito de competição entre esses dois metais. Esse resultado corrobora com o estudo de WANG et al. (2018). Nesse estudo, amostras de solo foram coletadas em torno de uma mina abandonada, assim como amostras de minhocas de 13 áreas perto dessa mesma mina. Após análise de metais, os fatores de bioconcentração para Pb e Cd foram calculados para cada espécie. Para o Pb, o fator foi de  $0,56 \pm 0,17$  para *M. californica*,  $0,68 \pm 0,18$  para a *A. homochaetus*,  $0,95 \pm 0,30$  para *A. pecteniferus* e  $0,56 \pm 0,12$  para *A. heterochaetus*, todos abaixo de 1, indicando que este elemento não foi absorvido e bioacumulado. Para o Cd, o fator foi de  $10,8 \pm 1,21$  para a *M. californica*,  $10,6 \pm 2,68$  para a *A. homochaetus*,  $18,8 \pm 4,57$  para a *A. pecteniferus* e  $11,1 \pm 2,37$  para a *A. heterochaetus*, todos acima de 1,

indicando absorção e bioacumulação do Cd. Enquanto as bioacumulações de Pb foram menores que 1, indicando que não houve bioacumulação.

#### 4.6. Correlações entre elementos essenciais e Pb e Cd

Um outro teste realizado foi o teste de Spearman para verificar interferências entre elementos dentro de um mesmo grupo. A Tabela 5 mostra as correlações que apresentaram diferenças significativas nos testes ( $p < 0,05$ ) entre elementos essenciais e Cd ou Pb.

Tabela 5. Correlações entre metais essenciais e contaminantes encontradas no teste de exposição ao solo

Correlação	Coefficiente de Spearman	P
<b>Mn</b> controle x <b>Pb</b> controle	1,000	0,003
<b>Na</b> Cd 1 mg x <b>Pb</b> Cd 1 mg	0,786	0,048
<b>Mg</b> Cd 1 mg x <b>Pb</b> Cd 1 mg	0,919	0,007
<b>Zn</b> Cd 1 mg x <b>Pb</b> Cd 1 mg	0,786	0,048
<b>V</b> Cd 10 mg x <b>Pb</b> Cd 10 mg	0,929	0,007
<b>Mn</b> Cd 10 mg x <b>Pb</b> Cd 10 mg	0,857	0,024
<b>Cu</b> Cd 10 mg x <b>Pb</b> Cd 10 mg	0,893	0,012
<b>Se</b> Cd 10 mg x <b>Cd</b> Cd 10 mg	0,929	0,007
<b>K</b> Pb 1 mg x <b>Cd</b> Pb 1 mg	-0,793	0,048
<b>Na</b> Pb 1 mg x <b>Cd</b> Pb 1 mg	-0,809	0,034
<b>V</b> Pb 10 mg x <b>Pb</b> Pb 10 mg	0,986	0,003
<b>Fe</b> Pb 10 mg x <b>Pb</b> Pb 10 mg	0,899	0,033
<b>Na</b> (Cd+Pb) 1 mg x <b>Cd</b> (Cd+Pb) 1 mg	0,821	0,007
<b>V</b> (Cd+Pb) 1 mg x <b>Pb</b> (Cd+Pb) 1 mg	0,882	0,012
<b>Fe</b> (Cd+Pb) 1 mg x <b>Pb</b> (Cd+Pb) 1 mg	0,818	0,034
<b>Zn</b> (Cd+Pb) 1 mg x <b>Cd</b> (Cd+Pb) 1 mg	0,929	0,007
<b>Se</b> (Cd+Pb) 1 mg x <b>Cd</b> (Cd+Pb) 1 mg	0,883	0,012
<b>V</b> (Cd+Pb) 10 mg x <b>Pb</b> (Cd+Pb) 10 mg	1,000	0,017

Não foram encontradas correlações com  $p < 0,05$  entre os elementos no teste de contato.

A presença de Cd pode levar à destruição das membranas de lipídio da célula por produzir espécies de caráter oxidativo. Para reduzir a toxicidade desse elemento,

o organismo pode utilizar metais essenciais para se proteger, e alguns estudos reportam uma relação entre Cd com Se, Cu, Zn, Fe e Mn, com possível efeito protetivo contra a toxicidade do Cd (QUEIROZ, 2019; ROCHA, 2008). Já o Pb é reconhecidamente neurotóxico, e também possui caráter oxidativo, também apresentando relações reportadas com o Se, Cu e Zn (QUEIROZ, 2019), podendo estes apresentar possível efeito protetivo contra sua toxicidade. O estudo de QUEIROZ (2019), assim como o presente trabalho, também observa uma relação entre Pb e Mn. Também já foi reportado que organismos expostos aos metais Pb ou Cd podem absorver altas concentrações destes elementos na sua forma iônica ( $Pb^{2+}$  ou  $Cd^{2+}$ ), devido à semelhança destes elementos com certos elementos essenciais, como  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  (AUGUSTO et al., 2014).

Pode-se observar em quase todos os grupos a correlação entre o Na ou o K com Pb já comentados por ROCHA (2008). Também pode-se perceber a relação entre Fe ou Zn com Cd ou Pb, o que estaria de acordo com QUEIROZ (2019). Há um antagonismo de inibição entre Zn e Pb, mostrado na Tabela 4 em alguns grupos (FLORA et al., 1982). Observou-se também uma relação entre Pb e Fe na Tabela 4, indicando possíveis efeitos deletérios devido ao fato que o Pb pode impedir a redução de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , impedindo a formação da hemoglobina (CAPITANI, 2009).

Além disso, uma relação direta entre a ingestão de Cd e Pb e aumento da eliminação de Na e K do organismo foi verificada em mamíferos (ratos Wistar) LUZ (1997). Isto pode explicar as correlações encontradas entre Cd e Pb com Na e K em todos os grupos analisados no presente estudo.

## 5. Conclusões

A presença de Cd e Pb podem alterar a absorção de metais essenciais especialmente Fe, Mg, Mn, V e Zn. Várias diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) apontam para de-homeostase metálica como reportado na literatura. Essa contaminação pode influenciar, desenvolvimento, tamanho dos indivíduos e a reprodução da espécie *E. andrei*. Os fatores de bioacumulação apontam para a bioacumulação de Cd nos organismos estudados, porém, o Pb não apresentou esse resultado. Os resultados apontam ainda para uma diminuição de bioacumulação de Cd quando há presença de Pb. O critério de bioacumulação é apenas um entre vários para indicar organismos como bons bioindicadores.

## Referências

ARNOT, J. A.; GOBAS, F. A. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. **Environmental Reviews**, v. 14, n. 4, p. 257–297, 2006.

ASSIS, O. **ENQUITREÍDEOS (*ENCHYTRAEIDAE*, *OLIGOCHAETA*) COMO INDICADORES DO MANEJO DO SOLO E EM ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS**. Curitiba, 2016. Disponível em: <[http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/1848/1/CT\\_PPGCTA\\_M\\_Assis%20Orlando\\_2015.pdf](http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/1848/1/CT_PPGCTA_M_Assis%20Orlando_2015.pdf)>. Acesso em: 29 jul. 2019.

AUGUSTO, A. DOS S. et al. Avaliação dos efeitos tóxicos de Cd e Pb na cultura da mostarda (*Brassica juncea*). **Eng Sanit Ambient | Edição Especial** |, p. 61–68, 2014.

BARETTA, D. et al. Colêmbolos (*Hexapoda: Collembola*) como bioindicadores de qualidade do solo em áreas com *Araucaria angustifolia*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. spe, p. 2693–2699, dez. 2008.

BERTHELOT, Y. et al. Integration of toxicological and chemical tools to assess the bioavailability of metals and energetic compounds in contaminated soils. **Chemosphere**, v. 74, n. 1, p. 166–177, 2008.

BROWN, G. G.; DOMÍNGUEZ, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas – o 3º Encontro Latino Americano de Ecologia e Taxonomia de Oligoquetas (ELAETAO3). **Acta Zoológica Mexicana (N.S.)**, 2017.

CAPITANI, E. M. DE. Metabolismo e toxicidade do chumbo na criança e no adulto. 2009.

CHRISTIAN, G.; SKOOG, G. D.; WEST, A. D. **Analytical Chemistry: An Introduction**. Saunders College Publishing, 1988. v. 12

DAI, J. et al. Heavy metal accumulation by two earthworm species and its relationship to total and DTPA-extractable metals in soils. 2004.

**Desastre de Minamata, crime ecológico que deixou marcas por décadas no Japão | Acervo**. Disponível em: <<https://acervo.oglobo.globo.com/fatos-historicos/desastre-de-minamata-crime-ecologico-que-deixou-marcas-por-decadas-no-japao-10102255>>. Acesso em: 25 jun. 2019.

DUARTE, L. **O aquecimento global e a convenção sobre mudanças climáticas**, 1994.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U. S. **DETERMINATION OF**

**METALS IN AMBIENT PARTICULATE MATTER USING INDUCTIVELY COUPLED PLASMA/ MASS SPECTROMETRY (ICP/MS).** Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-io-3.5.pdf>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

FLORA, S. J. S. et al. Protective role of trace metals in lead intoxication. **Toxicology Letters**, v. 13, n. 1–2, p. 51–56, 1 set. 1982.

FROSSARD, A. et al. The snake Bothrops jararaca (*Squamata: Viperidae*) is a suitable bioindicator of environmental exposure to cadmium: An experimental study. **Ecological Indicators**, v. 104, p. 166–171, set. 2019.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695–706, jun. 2007.

INMETRO. Orientação Sobre Validação De Métodos Analíticos. **Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia**, p. 31, 2016.

KAUR, G.; HUNDAL, S. S. Effect of heavy metals on the survival, growth and development of earthworm *Eisenia fetida*. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 8, n. 1, p. 208–212, 2016.

KHARKAN, J. I.; HOSSEIN SAYADI, M.; REZA REZAEI, M. I. Investigation of heavy metals accumulation in the soil and pine trees. **Environmental Health Engineering and Management Journal**, v. 6, n. 1, p. 17–25, 2019.

LI, L. et al. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworm *Eisenia fetida* in relation to bioavailable metal concentrations in pig manure. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3430–3436, 2010.

LUZ, C. P. EFEITO AGUDO DE METAIS PESADOS (Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>) SOBRE A REGULAÇÃO CENTRAL DA EXCREÇÃO RENAL DE ÁGUA, SÓDIO E POTÁSSIO. Disponível em:

<[https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/5885/1/Carla\\_Patricia\\_Novais\\_Luz](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/5885/1/Carla_Patricia_Novais_Luz)>



Efeito agudo... 1997.pdf>. Acesso em: 9 ago. 2019.

**O desastre ecológico do superpetroleiro Exxon Valdez, no Alasca, em 1989 | Acervo.** Disponível em: <<https://acervo.oglobo.globo.com/fatos-historicos/o-desastre-ecologico-do-superpetroleiro-exxon-valdez-no-alasca-em-1989-9938120>>. Acesso em: 25 jun. 2019.

PANDAY, R. et al. BIOCONCENTRATION OF HEAVY METALS IN VERMICOMPOSTING EARTHWORMS (*Eisenia fetida*, *Perionyx excavatus* and *Lampito mauritii*) IN NEPAL. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2019, n. vol. 8, p. 416–418, 2019.

PANIAGO, G. G. et al. Ecotoxicidade da água residual de suinocultura usando minhocas *Eisenia andrei* como bioindicador Ecotoxicity of swine wastewater using the earthworms *Eisenia andrei* as bioindicator. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 39, n. 3, p. 447–455, 2016.

PAPINI, S.; ANDRÉA, M. M. Ação de minhocas *Eisenia fetida* sobre a dissipação dos herbicidas simazina e paraquat aplicados no solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 1, p. 67–73, fev. 2004.

PIECHALAK, A. et al. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. **Phytochemistry**, v. 60, n. 2, p. 153–162, 1 maio 2002.

QUEIROZ, F. M. Estudo da distribuição subcelular e destoxificação bioquímica elementar em duas espécies de golfinhos do sudeste Brasileiro Dissertação de Mestrado Rio de Janeiro. 2019.

ROCHA, A. F. DA. **Cádmio, Chumbo, Mercúrio-A problemática destes metais pesados na Saúde Pública?**, 2008. Disponível em: <[https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/54676/4/127311\\_0925TCD25.pdf](https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/54676/4/127311_0925TCD25.pdf)>. Acesso em: 30 jul. 2019.

SEGAT, J. C. Avaliação ecotoxicológica do uso de dejetos de suínos em solos de

Santa Catarina. p. 1–107, 2012.

SOBRINO-FIGUEROA, A. S. et al. Effect of cadmium, chromium, lead and metal mixtures on survival and growth of juveniles of the scallop *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842). **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 42, n. 10, p. 1443–1447, 2007.

SKOOG, D.A.; WEST, D., M.; HOLLER, F., J.; CROUCH, S., R. **Fundamentos de Química Analítica** 8ed. 2008.

STEFANUTTI, R.; MURAOKA, ; ; T; MALAVOLTA, ; ; E. **COMPORTAMENTO DE EXTRATORES EM SOLO TRATADO COM FONTES DIVERSAS DE FÓSFORO**, 1994. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sa/v51n1/17.pdf>>. Acesso em: 21 maio. 2019.

VAMPRÉ, T. M.; FUCCILLO, R.; DE ANDRÉA, M. M. Oligoqueta *Eisenia andrei* como bioindicador de contaminação de solo por hexaclorobenzeno. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 34, n. 1, p. 59–66, 2010.

WANG, K. et al. Bioaccumulation of heavy metals in earthworms from field contaminated soil in a subtropical area of China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, n. February, p. 876–883, 2018.

ŽALTAUSKAITĖ, J.; SODIENĖ, I. Effects of total cadmium and lead concentrations in soil on the growth, reproduction and survival of earthworm *Eisenia fetida*. **Ekologija**, v. 56, n. 1, p. 10–16, 2010.

ZHANG, L.; VAN GESTEL, C. A. M. Effect of ageing and chemical form on the bioavailability and toxicity of Pb to the survival and reproduction of the soil invertebrate *Enchytraeus crypticus*. **Science of The Total Environment**, v. 664, p. 975–983, 10 maio 2019.

ZIĘTARA, J. et al. Concentrations of cadmium and lead, but not zinc, are higher in red fox tissues than in rodents—pollution gradient study in the Małopolska province

(Poland). **Enviromental Science and Pollution Research**, 2018.