UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA ENGENHARIA AMBIENTAL

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E XENOBIÓTICOS ATRAVÉS DE
ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS: PROPOSTAS PARA A GERAÇÃO DE TECNOLOGIAS DE
DETOXIFICAÇÃO AQUÁTICA**

Domingos Sávio Barbosa

Orientador: Prof. Assoc. Evaldo L. G. Espíndola

Tese apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Ciências da Engenharia
Ambiental como parte dos requisitos
para obtenção do Título de Doutor

São Carlos

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

B238a	<p>Barbosa, Domingos Sávio Barbosa</p> <p>Análise da interação entre substâncias húmicas e xenobióticos através de estudos ecotoxicológicos : proposta para a geração de tecnologias de detoxificação aquática / Domingos Sávio Barbosa ; orientador Evaldo L. G. Espíndola. -- São Carlos, 2008.</p> <p>Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2008.</p> <p>1. Substâncias húmicas. 2. Detoxificação. 3. Avaliação de risco solo e água. 4. Ecotoxicologia. I. Título.</p>
-------	--

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Licenciado **DOMINGOS SÁVIO BARBOSA**

Tese defendida e julgada em 31/10/2008 perante a Comissão Julgadora:

Prof. Associado **EVALDO LUIZ GAETA ESPINDOLA (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP) APROVADO

Dr^a. **SUZELEI RODGHER**
(Comissão Nacional de Energia Nuclear/MG) Aprovado

Prof^a. Dr^a. **MARIA DA GRAÇA GAMA MELÃO**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar) Aprovado

Prof^a. Dr^a. **ANA LUCIA FONSECA**
(Universidade Federal de Itajubá/UNIFEI) APROVADO.

Prof^a. Dr^a. **IRAMAIA CORRÊA BELLIN**
(Universidade Federal de Sergipe/UFS) Aprovado

Prof. Titular **MARCELO PEREIRA DE SOUZA**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Engenharia Ambiental

Prof. Associado **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

Resumo: Análise da interação entre substâncias húmicas e xenobióticos através de estudos ecotoxicológicos: propostas para a geração de tecnologias de detoxificação aquática

Este estudo teve como objetivo avaliar a interação entre substâncias húmicas e xenobióticos através de estudos ecotoxicológicos. O principal foco foi avaliar a resposta entre diferentes níveis tróficos em organismos aquáticos (fitoplanctônicos, zooplanctônicos, peixes e macroinvertebrados bentônicos) e terrestres (vegetais superiores, insetos e anelídeos) avaliando os efeitos diretos e indiretos das SH e de sua mistura com xenobióticos sobre os organismos. O reconhecido efeito das SH aumentarem ou reduzirem o efeito tóxico de algumas substâncias foi estudado. Os principais pontos para discussão são: a) SH podem reduzir ou estimular o crescimento algal (*P. subcapitata*); b) A presença de SH podem proteger os organismos contra efeitos tóxicos de metais, no entanto, a presença de Cd/Cu afeta negativamente o crescimento de *C. xanthus*. d) Em uma análise integrada de processos de remediação solo/água, a presença de SH afetou negativamente ou positivamente os efeitos tóxicos da atrazina em alguns organismos. A significância das SH como tecnologia é discutida.

Abstract

BARBOSA, D. S. (2008) Study of humic substances and xenobiotics interaction using ecotoxicological studies: aquatic detoxification technologies purposes.

This study focuses the interaction of humic substances and xenobiotics, through ecotoxicological studies. The main point was quantify and qualify the ecotoxicological responses of several trophic levels of freshwater (algae, zooplankton, fishes and benthic organisms) and soil organisms (higher plants, insects and annelids) analyzing the direct and indirect effects of humic substances (HS) and their mixture on organisms. The recognized ability of HS to improve or reduce the toxic effect of some substances has been studied. The main points of discussion are: a) humic can both reduce or stimulate the algal growth (*P. subcapitata*); b) The presence of HS can protect aquatic organisms to negative effects of metals. However, the presence of mixture of Cd/Cu affects negatively the growth of *C. xanthus*; d) In an integrated analysis of remediation process in soil/water microcosm, the presence of HS displayed negative or positive effects on atrazine toxicity for some organisms. The value of humic technology was discussed.

Sumário

	Pg
Capítulo 1 - As substâncias húmicas como função de força no ecossistema: perspectivas para a ecotoxicologia aquática e tecnologias ambientais	01
Capítulo 2 - Efeitos diretos das substâncias húmicas no crescimento da Clorofícea <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> : propostas para o controle de florações algais	19
Capítulo 3 - Detoxificação de efeitos agudos e crônicos de Cd e Cu sobre organismos aquáticos: aplicação de simulações para cenários de risco	46
Capítulo 4 - Efeitos da presença de ácidos húmicos na toxicidade de Atrazina em organismos aquáticos e de solo: estudo integrado em microcosmos	83
Considerações finais e recomendações para políticas públicas	108

Agradecimentos

Os antigos clichês que “estas páginas serão insuficientes para cobrir todos os agradecimentos” ou “desculpas antecipadas pelos esquecimentos” são as únicas formas justas que eu teria para começar este tópico. Fico na esperança de criarem algo mais original, porém, tão justo quanto, para começar os agradecimentos das teses!

Agradeço sobre tudo as pessoas, que representando ou parte integrante de suas instituições, colaboraram de forma direta ou indireta para este trabalho. Primeiramente, ao meu orientador, o Prof. Assoc. Evaldo L. G. Espíndola, que por duas vezes acreditou em meu potencial e ofereceu chance de realizar verdadeiros sonhos, não apenas meus, mas de toda uma família. Devido ao meu formalismo, ele ainda não tem a noção exata do bem que fez, mas digo foi grande o bastante para impedir de ser descrito e será duradouro o suficiente para se perder no tempo.

A Profa. Eny Maria Viera, que acreditou no projeto e sempre colaborou em tudo que esteve ao seu alcance, não apenas comigo, mas com muitos alunos que sempre encontraram nela o apoio que faltava.

Aos Profs. José Paulo Sousa e Rui Ribeiro, que me proporcionaram uma excelente permanência em Portugal e a todos os amigos portugueses e brasileiros que me acolheram nesta jornada.

A Profa. Odete Rocha, a qual sempre pude contar com a experiência e sabedoria durante todos estes anos, agradeço pela amizade e apoio. Ao meu irmão Danilo que por todo o amparo dentro e fora do laboratório durante todos estes anos.

A minha mãe, que não é simpática de menções deste tipo, mesmo assim, em mais uma desobediência, agradeço por ter sido mãe e avó.

Aos “oceanógrafos de água-doce” (Doutores Ricardo Luvizoto “Cabelo”, Ricardo Reis, Felipe Gusmão e Alessandro Minillo) e a Márcia Eler e Celso Maran pela amizade e companheirismo.

A todos os amigos do CRHEA (Amândio Nogueira, Marcelo Nogueira, Lucí Zanata, Clarice Botta, Janete Brigante, Wilma Montagnoli, Patrícia Lima, Vanderlei, Andréa Novelli, Suzelei Rodgher, Aline Campagna, Beatriz Rodrigues, Danieli Delello, Yuri Hanaí, Edna Nunes, Lucí Queiróz, Evelin, América Moraes, Nelson Tessarin, Carlos Matheus, Claudete Poianas, Mara Albuquerque e tantos outros) e a tantos outros que as páginas não permitem, os quais me apoiaram nestes sete anos.

Aos alunos das turmas de graduação da Eng. Ambiental da EESC, pelos momentos produtivos e outros nem tanto, obrigado pela força. Aos amigos do IQSC e da UFSCar e da Embrapa.

E aos que esta página não permitiram citar, obrigado!

Minha amada filha Luiza,

Quando leres estas palavras, acredito que já tenha passado tempo o suficiente para cobrir as cicatrizes que o exercício das obrigações às vezes nos impõe. Saiba que esta história se repete a cada instante, sempre que um pai sai à busca da realização dos sonhos dos filhos, antes mesmo destes poderem sonhar.

Ao menos, tenha certeza que não foi a única e não será a última filha neste mundo a enfrentar o desafio de estar longe do pai, pois a nossa determinação é movida pela nossa fé em Deus, e somente esta nos proverá.

Filha, saiba que entre as linhas deste texto você nasceu, morou com a sua mãe, com seu tio, com sua avó, aprendeu a andar, falar e como o papai havia prometido, antes de você aprender a ler eu terminei a tese!

Luiza, parece que a vida é assim mesmo, não podemos ter tudo ao mesmo tempo e crescemos um pouquinho a cada dia. Mas lembre-se que para aqueles que crêem não há nada neste mundo que não seja boa ventura!

Beijos do papai!

Apresentação

Não apresentarei nas linhas a seguir nenhum resumo ou explanação técnica sobre o presente trabalho, mas sim, um pouco sobre a história das páginas que seguem.

A presente Tese teve seu início a partir de uma decisão, tomada após anos de trabalho na área de diagnóstico ambiental: são necessárias medidas de mitigação para alguns dos problemas ambientais identificados.

Para aqueles que se ocupam do diagnóstico geralmente lhes cabe indicar a cura. No contexto ambiental, a regra não se aplica. Disto, surgiu a sensação de imobilidade perante as muitas questões relevantes para a conservação da qualidade os recursos hídricos em particular.

Para os problemas cuja solução é a cessão da fonte causadora de dano ou o bom uso dos recursos naturais, não há necessidade de grandes aportes de tecnologia e sim de gestão e bom senso. No território dos casos omissos à gestão, à tecnologia existente ou ao conhecimento científico, são necessárias medidas que ajudem a compatibilizar desenvolvimento antrópico e bem estar ambiental, reconhecendo-se, porém, que não existem atividades humanas que não gerem danos ambientais ou mesmo que se sustentem *ad eternum*.

Desta forma, tendo desenvolvido o Mestrado com o tema de diagnóstico ambiental em rios (Barbosa, 2003), decidimos abraçar a causa da busca por soluções a alguns casos omissos na área de ecotoxicologia aquática.

O primeiro projeto de doutorado, surgiu de uma extensão do trabalho de mestrado, onde foi proposto o estudo de alternativas para a recuperação de rios de pequeno porte, através da reestruturação de habitats aquáticos, seguindo os princípios da ecohidráulica. Este projeto, apoiava-se na hipótese que a estrutura física dos habitats, especialmente em rios, são como um grande cenário para todas os outros processos ecológicos, e desta forma, a reestruturação dos habitats favoreceriam o restabelecimento de outros processos ecológicos. Após alguns meses, o projeto foi inviabilizado devido aos custos elevados para a execução em campo das medidas propostas, mesmo em pequena escala.

Deste projeto, restou apenas o fato de que alguns processos secundários à modificação do habitat influenciavam nas características físicas e químicas das águas. Um dos exemplos, citava que a reconstrução de meandros em rios degradados, favorecia o acúmulo de matéria orgânica detrital e um subsequente aumento do *organic load* (incluindo na forma de carbono orgânico dissolvido) tanto na coluna de água quanto no sedimento.

Esta informação foi utilizada na estruturação de um segundo projeto, onde desta vez, seriam avaliados os efeitos deste enriquecimento de carbono orgânico no sistema aquático como medida de recuperação. O universo do carbono orgânico abria-se com grande complexidade. Deu-se início a um amplo processo de revisão, desde os clássicos aos estudos mais atuais sobre carbono orgânico em sistemas aquáticos.

Uma vez definido o tema, restava o objeto de estudo. Desta vez, a grande variedade de possibilidades e de processos relacionados ao carbono ofuscavam a definição dos objetivos do

estudo, mesmo sabendo-se, que o foco seria o desenvolvimento de uma “tecnologia” de carbono orgânico para mitigação aquática.

Na ocasião, ainda estava em andamento o Projeto Pesque-Pague financiado pela Fapesp. Considerando que as centenas de lagos de pesca e de viveiros de piscicultura espalhados pelo Estado de São Paulo consistem em um problema ambiental e ao mesmo tempo uma fonte de emprego e renda, e que, existe a necessidade de serem desenvolvidas tecnologias específicas para esta atividade, foi desenvolvido um projeto que buscava alternativas, dentro do contexto do carbono orgânico, para solucionar algumas questões relativas a qualidade de água.

Uma nova revisão foi iniciada, desta vez, incorporando-se as principais vertentes dentro da piscicultura, tentando adotar uma visão tecnológica no que tange a qualidade da água como requisito mínimo para a produtividade. Considerando que um viveiro de piscicultura não é um lago, mas possui complexidade ecológica, que o objetivo da piscicultura intensiva e semi-intensiva é a produtividade e que como qualquer indústria tem de minimizar os impactos, foi elaborada uma proposta onde o objetivo era reduzir os impactos e atingir o melhor da qualidade da água através do balanço de carbono em um viveiro de piscicultura.

A metodologia consistia, resumidamente, na análise em três grandes etapas: a) balanço quantitativo das principais rotas de C-org (grandes compartimentos); b) valoração destas rotas, uma vez que a principal fonte de C-org do sistema era a reação que possui custo financeiro; c) análise conjuntas das duas informações, através de técnicas de ACV (avaliação do ciclo de vida) e aplicação de modelos de balanço de carbono e, por fim, d) medidas de mitigação, através de ajustes quantitativos e qualitativos das fontes de C-org. Neste ajuste qualitativo, estaria o teste do uso de lixiviados de plantas e ácidos húmicos, que apesar de representarem uma fração pequena frente ao estoque de carbono existente, poderiam incidir em grandes mudanças no comportamento do sistema.

Desta vez, não foi a viabilidade da técnica e sim, a financeira e de tempo que impediriam a execução do projeto. Após meses de estruturação, os custos, a logística, e outras variáveis dificultariam o desenvolvimento. Para se conseguir responder com precisão algumas questões, seriam necessárias diversas análises tais como a de isótopos estáveis (cadeia trófica) e inúmeras leituras de TOC. Algumas estimativas e tentativas de levantamento foram executadas, mas sem resultado prático.

Com o fim do projeto Pesque-Pague, partia-se então para uma terceira odisséia ainda com o tema carbono orgânico e mitigação. Das quatro etapas do projeto anterior, a última chamou a atenção quanto as possibilidades de se trabalhar com o carbono orgânico dissolvido. Outra revisão bibliográfica foi iniciada, voltada para os aspectos do comportamento dos lixiviados de plantas e das substâncias húmicas (SH) nos sistemas aquáticos, e sua importância como tecnologia de recuperação ambiental. Depois de alguns meses, optou-se por estudar as substâncias húmicas tendo como foco de recuperação a redução da toxicidade.

Somente assim, foi possível dar início ao trabalho prático da tese que internamente também passou por diversas modificações. Além disto, a esta altura, era necessário ser executada em paralelo com um grande projeto em andamento dentro do mesmo grupo de pesquisa.

A grande diferença de se trabalhar como diagnóstico e tecnologia, especialmente na busca direta por soluções, é que enquanto no diagnóstico sempre existe um resultado, mesmo sendo contrário ao esperado, mas que, com um certo esforço, pode ser explicado, na tecnologia existe a chance do não-resultado ou do resultado errado, caso as metas de desenvolvimento não sejam atendidas.

Este processo ocorreu várias vezes desde o início do trabalho, sendo que por força do formato adotado na presente tese, tem pouca possibilidade de serem apresentados, excluindo-se, obviamente, os muitos problemas comuns aos trabalhos de pesquisa com organismos vivos. Contudo, abaixo está um breve sumário de alguns dos *não-resultados* ou as *deleted scenes* da tese:

- a) Nas primeiras extrações foi detectada toxicidade do extrato húmico. As causas foram investigadas e o problema com a purificação resolvido.
- b) O projeto previa o uso de uma fonte renovável de SH. Tentou-se utilizar um extrato de composto vegetal, mas devido ao baixo rendimento de húmicos, dificuldade no controle do processo de compostagem e dificuldades para obtenção de um composto não tóxico, esta possibilidade foi descartada.
- c) Um ensaio com o mesmo o extrato do composto vegetal com algas, apresentou grande contaminação por diversos organismos, inclusive outras espécies de algas, o que mascarou os efeitos reais da presença do extrato na toxicidade das algas. Seria necessário avaliar os métodos de extração e purificação.
- d) Como o composto apresentava problemas, tentou-se obter material de natureza semelhante as SH (*humic like*) através da oxidação de taninos, mas estes produtos também apresentaram toxicidade.
- e) Uma tentativa de se avaliar a influência das SH na taxa de respiração em um ensaio de incubação em campo (respirometria), não obteve resultado detectável pela metodologia adotada.
- f) Na Universidade de Coimbra, em Portugal, o desenho experimental só permitiu a execução dos ensaios com microcosmos em uma única dose de SH, o que limitou algumas possibilidades de discussão.

Após pouco mais que quatro anos, muitos amigos e uma filha, com a esperança de que seja útil, apresento-lhes a Tese.

Atenciosamente,

O Autor.

"Dificuldades reais podem ser resolvidas; apenas as imaginárias são insuperáveis."

Theodore N. Vail

Capítulo 1

As substâncias húmicas como função de força nos ecossistemas aquáticos: perspectivas para a nanotecnologia ambiental

RESUMO

As substâncias húmicas (SH's) são reconhecidas como sendo de grande importância nos processos ambientais. Contudo, o estudo do real *status* destas substâncias frente ao componente biológico dos sistemas naturais ainda permanece pouco desenvolvido. Diversos estudos, no entanto, já têm demonstrado que as substâncias húmicas atuam direta e indiretamente sobre os organismos aquáticos e a dubiedade das respostas sobre os organismos tem suscitado algumas questões, como: a) as SH's podem ter influência direta nos organismos em diversas escalas incluindo o nível gênico e b) a interação das SH's com xenobióticos pode reduzir ou aumentar o efeito tóxico de diversas substâncias? Muitos dos processos de interação entre xenobióticos e SH's ocorrem em nanoescala, sendo a vertente da nanotecnologia ambiental uma base conceitual importante para o desenvolvimento de futuros estudos em ecotoxicologia. No presente texto, ambas as vertentes serão discutidas, expondo-se as principais tendências para o estudo da ecologia das substâncias húmicas e ecotecnologia.

Palavras-chave: Substâncias húmicas, ecotoxicologia, nanotecnologia ambiental

O CARBONO ORGÂNICO NOS ECOSISTEMAS

De acordo com Odum (1988), o principal destino da fração detrital é a mineralização, no qual a matéria orgânica é transformada, através da ação de diversos processos, em compostos minerais mais simples e o carbono retorna à atmosfera na forma de gases biogênicos tais como o dióxido de carbono (CO₂) e metano (CH₄). Este ciclo é denominado ciclo dos detritos e envolve o aproveitamento, por diversos organismos, da energia armazenada nas ligações químicas da matéria orgânica dos organismos mortos.

Contudo, o carbono orgânico é transformado por meio de diferentes processos dentro do complexo ciclo da mineralização, o qual envolve diversas etapas de transformação e organização dos sub-produtos da ação biológica e química sobre a matéria orgânica. Uma folha, um animal morto ou as suas fezes, ao entrarem em contato com o meio aquático ou terrestre, começam a sofrer uma série de transformações, muitas delas ainda pouco conhecidas, que darão origem a uma grande variedade de compostos orgânicos.

Na tentativa de organizar as diversas etapas da transformação da matéria orgânica, foram criadas classificações em função das dimensões físicas e das propriedades químicas das formas de matéria orgânica. Em muitos casos, as definições são apenas operacionais e são regidas pela capacidade tecnológica que a ciência dispõe.

Didaticamente, em uma primeira análise para aspectos ambientais, pode-se classificar as substâncias orgânicas segundo suas propriedades físicas e químicas, buscando compreender a sua funcionalidade ambiental. Dentre as propriedades que correspondem à dimensão física, o tamanho das moléculas orgânicas e seus agregados são uma das estratégias mais rotineiras de abordagem ao estudo do carbono orgânico em sistemas aquáticos.

Segundo Wetzel (1995), o carbono orgânico total em um sistema aquático está presente sob a forma orgânica e inorgânica. As formas inorgânicas correspondem principalmente aos diversos sais de carbonatos, incluindo o CO_2 dissolvido. Dentre as formas orgânicas, o carbono está distribuído na forma viva, correspondendo ao conjunto de organismos, e a forma detrital. Estimativas sugerem que a proporção de carbono detrital é sempre maior em relação à de carbono vivo. Em sistemas terrestres, a proporção é de 1:3, na água doce de 1:10 e nos oceanos de 1:400. Ou seja, nos oceanos a soma de todo o carbono vivo corresponde a menos de 1% do existente sob a forma de detritos.

Por convenção e limite tecnológico, o carbono orgânico total (COT) pode ser fracionado em particulado (COP) e dissolvido (COD), através de filtros de porosidade entre 0,20 e 0,45 μm e esta classificação também se aplica ao carbono detrital. Estes detritos podem ainda ser classificados de acordo com a sua funcionalidade biológica, que em alguns casos está relacionado com o grau de metabolização ambiental Wetzel (1995).

ORIGEM E DEFINIÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS (SH'S)

As substâncias húmicas pertencem ao universo dos detritos aquáticos e terrestres e em sistemas aquáticos as SH's podem corresponder a 50% do total de carbono orgânico dissolvido (COD) na fração detrital. As SH's podem estar presentes em ambas as formas (dissolvida ou particulada), agregadas ou não a partículas inorgânicas.

A humificação é o processo de transformação dos detritos orgânicos em um complexo denominado de substâncias húmicas. De acordo com Hedges e Oades (1997), é o segundo maior processo de transformação da matéria viva depois da fotossíntese, com uma estimativa de 20 Gton C/ano. O processo de humificação ainda não está totalmente esclarecido, embora a teoria mais aceita remeta a combinação de complexas cadeias de degradação e reorganização de compostos orgânicos.

As substâncias húmicas são, de acordo com Aiken et al (1985), uma classe de substâncias orgânicas de natureza coloidal ou semi-coloidal, formando em alguns casos pseudo-polímeros, que são resultantes de diversos processos de condensação de moléculas orgânicas menores.

Segundo Thurman & Malcolm (1981), as SH's são compostos orgânicos complexos, com coloração castanha, que podem ser classificadas operacionalmente em função de sua solubilidade em determinado pH em: a) ácidos húmicos (AH), que são solúveis em pH alcalino; b) ácidos fúlvicos (AF), que são solúveis em qualquer pH e c) humina (HU), que é insolúvel em qualquer pH. Esta classificação é a base dos processos de isolamento das substâncias húmicas e embasa o método de isolamento recomendado pela International Humic Substances Society (IHSS)

Em ambientes aquáticos naturais a coloração castanha ou amarelada das águas dos rios é consequência do enriquecimento de substâncias húmicas (ácidos húmicos e fúlvicos). De acordo com Leenheer e Croué (2003), as substâncias húmicas compõem cerca de 50% do COD de um rio, em concentrações médias de 5 mgL^{-1} , e possuem propriedades físicas e químicas diferentes em função de sua origem e formação. Em sistemas lóticos, as principais fontes de COD são os *inputs* da vegetação terrestre e a produção autóctone, gerada pela morte e degradação da biota.

A contribuição relativa de cada fonte dependerá de um conjunto complexo de fatores, que incluem as características da bacia, composição biológica de macrófitas e a extensão da

vegetação ciliar. Nos sedimentos, assim como nos solos, as concentrações são variáveis em função das fontes e da dinâmica da matéria orgânica no sistema Steinberg (2003).

Caracterização das substâncias húmicas para estudos ambientais

Segundo Abbt-Braun et al (2004), devido à natureza complexa das substâncias húmicas, diferentes técnicas de caracterização têm sido empregadas e estas fornecem diferentes tipos de informação para a compreensão da dinâmica ambiental das SH's. De modo geral, os principais métodos de caracterização e as principais informações obtidas estão sintetizadas na Tabela I.

Diferente de outros compostos orgânicos, a natureza complexa das SH's não permite a definição de uma fórmula estrutural geral sendo que, na escala molecular, a caracterização é geralmente expressa sob a forma de dados estatísticos como relações, proporções ou mesmo medidas individuais de entidades químicas (Steinberg, 2003). Em estudos ambientais, existe a tendência à aplicação de métodos que permitam correlacionar aspectos estruturais com respostas biológicas. A abordagem QSAR (em inglês **Quantitative-Structure-Activity-Relationship**) é realizada através de métodos numéricos e estatísticos, e pode ser utilizada como estratégia na busca por correlações de processos biológicos com aspectos estruturais das SH's, sendo este método bastante útil para estudos ambientais (Steinberg et al., 2000).

Tabela I: Principais técnicas analíticas empregadas na caracterização das substâncias húmicas e as principais informações obtidas. UV = Ultra Violeta; VIS = Luz visível; GC = Cromatografia Gasosa; LC = Cromatografia líquida; MS = Espectrometria de Massa; NMR = Ressonância Nuclear Magnética. (Modificado de Abbt-Braun et al, 2004).

Método	Informações
<i>Químico/Físico</i>	
Análise elementar, derivatização, pirólise, degradação oxidativa e redutiva,	Composição elementar, grupos funcionais, capacidade protônica e monômeros (combinado com GC/MS, MS, LC/MS)
Microscopia, viscometria	Tamanho e forma
<i>Espectroscopia</i>	
UV/VIS	Determinação de grupos que absorvem UV/VIS; razão E4/E6
MS	Determinação de monômeros em combinação com GC ou LC.
IR, Fluorescência e NMR	Determinação qualitativa de grupos funcionais e estruturais (radicais e grupamentos)

De acordo com Thurman & Malcolm (1981), os grupos funcionais predominantes são carboxilas, álcool, hidroxilas fenólicas e carbonilas. Contudo, a degradação das SH's não oferece informações sobre a estrutura pseudo-polimérica e coloidal. Técnicas não degradativas de análise, como a ressonância magnética nuclear (NMR), são consideradas por diferentes autores (p.ex. Wershal, 1985; Malcolm, 1990 e Abbt-Braun et al, 2004) como as técnicas mais importantes de avaliação qualitativa e das características funcionais das substâncias húmicas.

Nos sistemas aquáticos, as substâncias húmicas apresentam uma estrutura coloidal, resultado da agregação de diversas moléculas húmicas e não húmicas. Esta estrutura coloidal é, segundo Buffle & Lepard (1995), uma estrutura básica para compreender os processos de complexação e floculação da matéria orgânica e seus agregados. Esta avaliação é realizada em uma escala macromolecular e procura descrever e modelar os processos de complexação através de técnicas como a microscopia de transmissão de elétrons (TEM).

Portanto, pode-se constatar que existem diferentes métodos de caracterização das SH's que necessitam de uma abordagem multidisciplinar para a sua avaliação. Segundo Abbt-Braun et al (2004), em muitos estudos faz-se necessária à adoção de diversas técnicas como estratégia de caracterização, visto a diversidade de informações que cada técnica oferece e a complexidade de interações ambientais que as SH's apresentam.

Efeitos diretos e indiretos sobre os organismos aquáticos

Nos sistemas aquáticos as substâncias húmicas podem interagir com a biota através de duas vias principais: a) efeitos diretos, quando ocorre a interação entre as espécies húmicas diretamente sobre a estrutura física dos organismos e b) indiretas, quando as substâncias húmicas atuam como modificadores do meio, interagindo com diversas substâncias que em diferentes escalas atuarão sobre os organismos. A figura 01 ilustra este cenário, buscando exemplificar a influência direta e indireta das SH nos processos em um dado nível organizacional e as manifestações em cascata.

Figura 01: Exemplos de processos relativos à influência direta e indireta das SH's em diferentes níveis de organização biológica.

Efeitos diretos sobre os organismos

Os efeitos diretos das SH's sob os organismos aquáticos são diversos e não passíveis de generalizações, pois a origem, natureza química e mesmo a metodologia adotada nos estudos (extração e purificação) podem influenciar nas características do material em estudo. Além disto, os estudos sobre os efeitos diretos das SH's nos organismos ainda são poucos quando comparados com outras substâncias.

De acordo com Steinberg (2006), as SH's podem exercer grande influência direta sobre os organismos. Dentre os principais processos, estão a interação com as membranas biológicas, que podem acarretar em respostas semelhantes à presença de xenobióticos. Em alguns casos, as

substâncias húmicas podem ser absorvidas pelas células e desencadear respostas do sistema de detoxificação¹ do organismo.

Estudos desenvolvidos com o peixe *Colossoma macropomum* (Tambaqui) por Matsuo et al (2006) mostram que os ácidos húmicos (naturais e comerciais), da mesma forma que os hidrocarbonetos aromáticos, podem induzir a atividade do Cytochromo P450 1A, que atuam como catalizadores no sistema de biotransformação oxidativa (Fase I). Este fato abre duas possibilidades igualmente importantes: que os ácidos húmicos podem induzir a uma resposta do sistema de defesa dos organismos, sem necessariamente apresentar efeito tóxico, e também evidenciam que o uso de certos grupos de enzimas como biomarcadores de exposição podem ser mascarados devido à presença das SH.

Outros exemplos de ação direta sobre os organismos são representados pela ação direta sobre o crescimento das algas e macrófitas aquáticas. Na comunidade fitoplanctônica, as SH's e as *humic-like substances* podem apresentar efeitos de inibição dos crescimento. Segundo Ridge et al (1999), as substâncias húmicas e outros cromóforos não húmicos derivados da decomposição da palha da cevada (*barley straw*), tem efeito inibitório do crescimento de fitoplâncton. Este efeito de inibição pode ser atribuído a um conjunto de substâncias presentes na degradação aeróbia do *litter* terrestre e tem grande relevância em projetos de manejo de tanques de piscicultura e pequenos reservatórios. Efeitos inibitórios para a eficiência fotossintética em macrófitas são descritos em Pflugmacher et al. (2006). No entanto, Pouneva (2005) relata que a presença de baixas doses de SH (entre 1 e 10 mgL⁻¹) podem estimular o crescimento celular.

Efeitos indiretos em organismos aquáticos: interação com xenobióticos e nanotecnologia ambiental

Os xenobióticos são substâncias “externas” (*xen (o)* = externo) ou estranhas ao meio ambiente. Esta é uma designação genérica a todas as formas de substâncias cuja introdução no sistema causam efeitos nefastos aos organismos. Independente dos usos ou do nível de interesse de proteção do sistema aquático em questão, a presença de metais pesados,

¹ O termo detoxificação ocorre comumente na literatura técnica. Trata-se de um possível neologismo da palavra *detoxification* (verbo *detox*) da língua inglesa (Longman dictionary). De acordo com o Dicionário Houaiss da língua portuguesa ocorre apenas a expressão *destoxificação*. No entanto, os prefixos *des-* e *de-* podem assumir o mesmo sentido de retirar, diminuir na língua portuguesa. (N. A.)

pesticidas e toxinas algais é indesejável. Ressalta-se que as toxinas algais são aleloquímicos (notadamente as cianotoxinas) e podem ser exportadas para rios e reservatórios através de afluentes contaminados. Os xenobióticos podem, em determinadas concentrações, causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos e ao homem, sendo necessárias estratégias para a destoxificação aquática.

De acordo com Alexander (1999), a detoxificação é o processo onde uma determinada substância tem seu efeito tóxico inativado. Este mecanismo pode ser desencadeado através de processos biológicos ou abióticos. A substância inativada pode ser metabolizada para a mineralização, para a formação de produtos típicos (esperados no processo) ou mesmo produtos atípicos. O processo de detoxificação pode ser monitorado através de ensaios com os organismos-alvo do sistema em estudo (ensaios ecotoxicológicos ou toxicológicos).

A dificuldade na aplicação deste conceito está na definição de “efeito tóxico” adotada como referencial. De acordo com Chasin & Azevedo (2003), o efeito tóxico pode ser expresso através de diferentes critérios, em função do tipo de substância, organismo e rota de exposição. Contudo, é fato comum a maioria dos estudos expressar a toxicidade através de uma relação entre a dose ou concentração de exposição de uma determinada substância e a resposta biológica (incluindo letalidade). Desta forma, a detoxificação, por derivação de conceito, é quando uma dada substância reduz de forma significativa a toxicidade, dentro de critérios pré-estabelecidos. Na figura 02, é apresentado uma síntese do processo de detoxificação.

Figura 02: Visão geral dos possíveis processos que envolvem a aplicação de substâncias húmicas como medida de detoxificação (modificado de Alexander, 1999).

Todos estes processos ocorrem em diferentes escalas físicas, desde processos moleculares, como a interação entre os íons metálicos e os radicais das SH's, até a escala microscópica, com a formação de agregados de argila e SH. Há cerca de 30 anos houve um grande aumento no conhecimento relativo aos processos biológicos que ocorrem em nanoescala, que por definição operacional encontram-se geralmente relacionados às partículas entre 1 e 100 nm. Nos últimos anos, o aumento da capacidade de manipular e analisar impulsionou a nanotecnologia e, mais recentemente, diversos processos em nanoescala têm sido aplicados a questões ambientais.

De acordo com Masciangioli e Zhang (2003), a nanotecnologia ambiental possui diversas aplicações no controle e remediação da poluição. A aplicação de nanotubos de carbono com funções ambientais específicas (para a captura de substâncias tóxicas, por exemplo) e como catalizadores de processos degradativos são ramos promissores desta nova área.

Por derivação de conceito, Tang et al. (2004) discutem que muitos compostos tóxicos presentes no meio ambiente, tais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), são típicos representantes de nanopoluentes ambientais. Estas substâncias possuem diversas propriedades físicas em função do tamanho e tendem a interagir com superfícies de outras nano

ou micropartículas presentes no ambiente. No caso dos PAH, existe a tendência de interação com as SH's promovendo mudanças no destino e toxicidade destes compostos. Em alguns casos, pode-se considerar a possibilidade do uso desta capacidade de interação como estratégia de remediação.

Em uma análise mais ampla, os estudos envolvendo SH e mesmos os estudos ecotoxicológicos, deverão nos próximos anos sofrer grande impacto dos conhecimentos produzidos no campo da nanotecnologia, tanto na aplicação de medidas de prevenção e remediação, quanto no uso de técnicas analíticas que permitam explorar em nanoescala a toxicodinâmica e toxicocinética dos poluentes.

As substâncias húmicas, por exemplo, têm sido utilizadas em projetos de descontaminação de águas subterrâneas, com ênfase em hidrocarbonetos e metais. Segundo Lesage et al (1995), os PAHs em águas subterrâneas, tornam-se mais solúveis na presença de substâncias húmicas e favorecem os processos de bioremediação de aquíferos contaminados.

Em águas superficiais, o processo de interação entre substâncias húmicas e poluentes dependerá tanto das características do poluente como da origem e formação das substâncias húmicas. A detoxificação pode ser vista da ausência de toxicidade de um determinado poluente na presença de substâncias húmicas, sendo este processo o resultado entre a interação do poluente e as SH's.

Segundo Jones & Huang (2003), as substâncias húmicas, em concentrações entre 2 e 42 mg/L de C, reduziram a toxicidade do clorpirifós e do arsênico, em ensaios com microtox. Desta forma, a presença de SH's é um fator essencial em estudos de descontaminação de águas subterrâneas e superficiais.

Em relação a outros compostos orgânicos, tais como a Atrazina, segundo Martin-Neto et al (2001), discutem os mecanismos de interação entre estes pesticidas e as substâncias húmicas. Em linhas gerais, os ácidos fúlvicos, provenientes dos oxisolos brasileiros, possuem adsorção máxima da atrazina em uma faixa de pH~3.0, sendo que esta capacidade diminui na faixa de pH de 6,0 a 7,5. Isto poderá implicar em diferenças relacionadas ao risco da presença destas substâncias no solo e na água, uma vez que, em tese, a labilidade do pesticida seria maior nos sistemas aquáticos devido a faixa de pH desfavorável para a adsorção ótima.

A exemplo de outros compostos orgânicos, as substâncias húmicas podem influenciar na fotólise da atrazina em meio aquático. De acordo com Zeng et al (2002), em solução tamponada de pH 7,0, a fotodegradação da atrazina é aumentada na presença de ácidos húmicos, enquanto

com ácidos fúlvicos não é observado efeito significativo em dez dias de observação. Segundo Steinberg (2003), este processo é dependente da estrutura funcional das substâncias húmicas, da presença de íons e da disponibilidade de radiação UV. Adicionalmente, as substâncias húmicas podem atuar como retardantes de liberação da atrazina no meio aquático. Desta forma, existe a possibilidade de aumentar o tempo de exposição da biota ao pesticida em função da presença e do tipo de material húmico presente.

Diversas atividades antrópicas manipulam a carga de carbono orgânico nos sistemas aquáticos. Os efluentes domésticos e industriais, tratados ou não, incrementam o conteúdo húmico dos sistemas enquanto, inversamente, o desflorestamento reduz a entrada de material orgânico alóctone e, conseqüentemente, reduz a carga de matéria húmica aquática. Considerando a importância que estas substâncias desempenham frente à disponibilidade, transporte e toxicidade de diversos poluentes, são necessários estudos que avaliem o risco da redução quali-quantitativa das SHs frente aos contaminantes.

Mesmo considerando os diversos mecanismos de interação entre SH e as diferentes classes de pesticidas e a possibilidade de favorecimento dos processos de degradação dos princípios ativos, faz-se necessária a realização de testes de toxicidade para avaliar a resposta da biota a formação dos complexos HS+pesticidas.

Em relação à comunidade zooplancônica, os estudos de Akkanen et al (2004), mostram que as substâncias húmicas podem aumentar a biodisponibilidade de poluentes orgânicos (PAH) para *Daphnia magna*, o que, em alguns casos, favorece a metabolização dos compostos. Em relação aos metais pesados a redução da toxicidade é reportada em literatura (Steinberg, 2003), sendo que a presença de substâncias húmicas tende a reduzir a toxicidade aguda do cobre, medida pela LC₅₀, ao organismo *Ceriodaphnia silvestrii* (Santos et al, 2008) devido a processos de complexação que ocasionaram a redução da concentração do metal na água.

Em macroinvertebrados, de acordo com Höss et al (2001), o DOC influencia na reprodução do nematóide *Caenorhabditis elegans* de diversas formas, em função da composição química e origem do DOC. Efeitos positivos foram encontrados devido ao DOC servir de fonte adicional de carbono e nutrientes e outras substâncias como ativadores endócrinos. De acordo com Kullberg (1992), as SH's influenciam na composição de espécies de macroinvertebrados, demonstrada através de uma relação positiva entre a complexação de alumínio (tóxico) com o COD em rios.

Os peixes possuem respostas diversificadas a presença de COD. De acordo com Richards et al (1999), as brânquias da truta arco-íris (*Oncorhynchus mikiss*) são protegidas do ataque dos metais Cd e Cu pela presença de COD, devido a processos de quelação dos metais. Segundo Meinnelt et al (2001), as SH's, em presença de cálcio, reduzem o efeito tóxico do verde de malaquita e da formalina utilizada no tratamento de ovos e alevinos. Em outro estudo, Meinnelt et al (2004), discutem como as substâncias húmicas estimulam o crescimento de *Xiphophorus helleri* e, devido a presença de grupos alquil-fenólicos, podem ainda estimular a feminilização dos organismos.

Desta forma, os estudos que visam avaliar a interação entre substâncias húmicas e a toxicidade de poluentes são de grande importância como ferramenta para a avaliação da capacidade de depuração dos sistemas aquáticos. Ressalta-se que o potencial de depuração dos rios pode estar associado à presença da vegetação ripária, uma vez que as fontes alóctones de matéria orgânica são grandes fontes de SH's para os rios de pequeno e médio porte. Desta forma, pode-se estabelecer uma relação entre as políticas de preservação de matas ciliares e a capacidade de depuração dos sistemas, via processos de quelação/solubilização.

De acordo com Perminova & Hatfield (2005), as principais tecnologias de remediação ambiental *in situ* não necessariamente envolvem a remoção da substância alvo, mas a sua degradação ou imobilização. A maioria das tecnologias de tratamento envolve a combinação de diferentes estratégias ou técnicas de tratamento (físico, químico e biológico). Ainda segundo estes autores, as tecnologias de tratamento mais promissoras para os produtos húmicos são: *flushing*/Imobilização, barreiras reativas permeáveis (PRBs), aumento da biorremediação e fitoremediação. Na Tabela II apresenta-se as principais aplicações destas tecnologias.

Tabela II: Principais aplicações das tecnologias de remediação *in situ* com base em produtos húmicos. Modificado de Perminova e Hatfield (2005).

Técnica/Tecnologia	Exemplos de aplicação/polvente alvo
Flushing/Imobilização	Metais pesados
Barreiras reativas permeáveis (PRBs)	Hidrocarbonetos (vazamentos) em solos
Fitoremediação	Redução da toxicidade do solo
Biodegradação	Aumento da biodegradabilidade de orgânicos

Neste contexto, destacam-se dois processos principais, os quais são adotados como estratégia de aplicação da tecnologia: a) a imobilização do composto tóxico, que poderá reduzir o risco de dispersão do poluente e/ou dificultar a sua ação tóxica localmente e b) o estímulo direto ou indireto a biodegradação do composto de interesse, atuando como co-adjuvante nos processos de biorremediação.

A contaminação em sistemas aquáticos é um dos temas de maior interesse na área ambiental. Os riscos a saúde humana e ambiental dependem, em muitos casos, da exposição a estes contaminantes e a recuperação ambiental está associada à capacidade dos sistemas naturais de imobilizar e degradar estas substâncias. Neste contexto, as substâncias húmicas (SH's) desempenham um importante papel como entidades químicas orgânicas, capazes de promover a quelação/solubilização de diversas substâncias como íons metálicos e pesticidas (Aiken et al, 1985).

De acordo com McCarthy (1994), em ciências do solo as substâncias húmicas têm grande importância na produtividade das culturas devido, principalmente, as suas propriedades complexantes, estimulantes de crescimento vegetal, de efeito tampão, agregadores de partículas e fonte de nutrientes. Estas propriedades, que ressaltam a importância das substâncias húmicas, vêm sendo observadas a séculos pela humanidade, antes mesmo do emprego dos modernos métodos analíticos

A exemplo do que ocorre em sistemas terrestres, as substâncias húmicas estão envolvidas em relevantes processos da dinâmica em sistemas aquáticos. Em sistemas aquáticos, Steinberg & Muenster (1985) admitem que as substâncias húmicas contribuem pouco em aspectos quantitativos, mas, qualitativamente, são os componentes mais significativos dos detritos em sistemas aquáticos. As SH's desempenham grande influência nos processos de sorção de íons metálicos, poluentes hidrofóbicos, nutrientes e na disponibilização de substratos para flora microbiana. Além disso, as substâncias húmicas são fontes de grupos metílicos que interagem com compostos clorados, formando, por exemplo, trihalometanos em estações de tratamento de águas, que são substâncias com elevado potencial carcinogênico.

Os estudos de substâncias húmicas no Brasil têm sido, em grande parte, voltados para o comportamento destas substâncias no solo, tendo em vista as propriedades nutricionais, agregadoras de partículas e a interação entre pesticidas (como a Atrazina) e métodos espectroscópicos de caracterização (Martin-Neto et al, 1998).

Apesar da grande importância que estas substâncias desempenham no ambiente, uma das maiores limitações para a realização de estudos de cunho ecológico com estas substâncias é o aspecto técnico-metodológico. A dificuldade de isolamento, purificação e caracterização das SH's e a necessidade de recursos humanos especializados, são alguns dos principais fatores que podem estar limitando a investigação da influência das SH's no componente biológico. Observa-se que, em muitos casos, os grupos de pesquisa em SH's são predominantemente constituídos por centros de vanguarda em química analítica.

Além disso, as análises de compostos orgânicos não são rotina em muitos estudos limnológicos no Brasil. Em geral, as substâncias orgânicas são estudadas para casos de contaminantes específicos, como por exemplo, os pesticidas e as toxinas algais. Apesar da variável cor da água (que esta relacionada a presença de SH's) figurar em diversos estudos, não existe, em muitos casos, uma discussão mais específica acerca das substâncias húmicas.

Considerações finais

- As substâncias húmicas podem agir de forma direta nos organismos, produzindo respostas ecológicas no sentido de favorecer ou não o desenvolvimento das espécies;
- A interação das SH's com compostos tóxicos tem sido utilizada como medida de recuperação/remediação ambiental para uma variedade de substâncias. Contudo, a variabilidade funcional das SH's, em função de suas origens, pode gerar efeitos diferentes da mesma substância;
- Uma das linhas de pesquisa mais promissoras no campo da aplicação da tecnologia de SH como remediadora de toxicidade é o *design* funcional das SH's, através da manipulação laboratorial de suas propriedades em função do efeito desejado;
- A aplicação dos conceitos da nanotecnologia a processos ambientais e a ecotoxicologia, constitui uma poderosa ferramenta para o desenvolvimento de tecnologias ambientais.

REFERÊNCIAS

Aiken, G R; McNigh, D. M; Wershaw, R. L, McaCarthy. (1985) An introduction to humic substances in soil, sediment and water. Cap1p. 1-9. *In*: Aiken, G R; McNigh, D. M; Wershaw, R. L (ed). (1985) Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization. John Wiley Sons. 692p.

Alexander, M. (1999) Biodegradation and Biorremediation. Academic Press. New York. 453p.

Campos, S. X., Vieira, E. M; Di Bernardo, L (2001) Quantificação de metais em turfa e ácido húmico após os processos de extração e purificação. IV encontro brasileiro de substâncias húmicas (IHSS Brazilian Chapter), Viçosa, UFV 259-261 p.

Cunha-Santino, M B & Bianchini Júnior, I (2002) Humic substance mineralization in a tropical oxbow lake (São Paulo, Brazil) *Hydrobiologia* 468: 33–43, 2002.

Hedges, I.J., Oades, J.M. (1997) Comparative organic geochemistries of soils and marine sediments. *Org. Geochem.* 27, pp. 319-361.

Hoss, S., Bergtold, M., Haitzer, M., Traunspurger, W., Steinberg, C. E. W. (2001). Refractory dissolved organic matter can influence the reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). *Freshwater Biology* 46, pp. 1-10.

Jones, K. D., Huang W (2003) Evaluation of toxicity of the pesticides, chlorpyrifos and arsenic, in the presence of compost humic substances in aqueous systems. *Journal of Hazardous Materials B*, 103: pp 93–105.

Leenheer, J. A.; Croué, J.-P. Characterizing dissolved aquatic organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37, pp. 19A-26A.

Lesage, XU, H, Novakowski K. S, Brown S; Durham L (1995) Use of humic acids to enhance the removal of aromatic hydrocarbons from contaminated aquifers. part II: pilot scale *In: Proceedings of the 5th annual Symposium on Groundwater and Soil Remediation*, Oct 2-6, 1995, Toronto Ontario. Proceedings on CD/ROM.

Malcolm R. L. (1985) Geochemistry of stream fulvic and humic substances. Cap 7. p. 181-209. In AIKEN, G R; Mcnigh, D. M; Wershaw, R. L (ed). (1985) Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization. John Wiley sons. 692p.

Martin-Neto L., Rosell, R.; Sposito, G. (1998) Correlation of spectroscopic indicators of humification with mean annual rainfall along tempered grassland climosequence. *Geoderma*, 81: 305-311.

Martin-Neto, L, Milori, D. M. B; Silva, W. T. L. (ed) (2004) Internatinal Meeting of International Humic substances society (IHSS): Humic substances and soil water environment, Proceedings. São Pedro-SP, 2004. Embrapa/IHSS.

- Masciangioli, T. and Zhang, Wei-Xian (2003). Environmental technologies at the nanoscale. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 102A.
- Matsuo, A Y; Woodin, B.; Reddy, C. M; Val, A; Stegeman, J (2006) Humic Substances and Crude Oil Induce Cytochrome P450 1A Expression in the Amazonian Fish Species *Colossoma macropomum* (Tambaqui). *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40, 2851-2858
- Mccarthy, M. D; Hedges, J. I; Benner, R (1997). The chemical composition of dissolved organic matter in seawater. *Chem. Geol.* 107: 503-507 p.
- Meinelt, T. Playle, R, Schreckenbach, K, Pietrock M (2001). Humic substances and the water calcium content change the toxicity of the antiparasitic mixture FMC. *Aquaculture Research*, 2001, 32, 1-8p.
- Richards, J. G, Burnison, B. K; Playle, R. C. (1999) Natural and commercial dissolved organic matter protects against the physiological effects of a combined cadmium and copper exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56: 407–418
- Odum, E. P.(1983). *Ecologia*. Guanabara-Koogan. 434p.
- Pflugmacher, S, Pietsch, C, Rieger, W. Steinberg, C.E.W. (2006) Dissolved natural organic matter (NOM) impacts photosynthetic oxygen production and electron transport in coontail *Ceratophyllum demersum*. *Science of the Total Environment* 357 169– 175
- Perminova, I.V & Hatfield, K. (2005) Remediation Chemistry Of Humic Substances: Theory And Implications For Technology. *In: PERMINOVA, I.V & HATFIELD, K, Hertkorn, N. Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice. Series IV: Earth and Environmental Series – Vol. 52 Springer. 435p.*
- Pouneva I. D. (2005). Effect of Humic Substances on the Growth of Microalgal Cultures. *Russian Journal of Plant Physiology*, Vol. 52, No. 3, 2005, pp. 410–413
- Ridge, I, walters, J & Street, M (1999). Algal growth control by terrestrial leaf litter: a realistic tool? *Hydrobiologia*. 395/396: pp.173-180.
- Santos, M. A. P. F., Melão, M. G. G., Lombardi, A. T. (2008) The effects of humic substances on copper toxicity to *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) *Ecotoxicology* 17, 449-454p.

Seteinsteinberg C; Muentner, U; (1985) Geochemistry and ecological role of humic substances in lake water. Cap 5. p. 105-145 In: AIKEN, G R; MCNIGHT, D. M; WERSHAW, R. L (ed). (1985) Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization. John Wiley sons. 692p.

Steinberg, C.E.W., Haitzer, M, Brüggemann, R, Perminova, I. V., Yashchenko, N. Y. , Valery S. Petrosyan (2000). Towards a Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) of Dissolved Humic Substances as Detoxifying Agents in Freshwaters. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 85 pp 253-266.

Stevenson, F. J., (1982). *Humus chemistry*. New York: John Wiley Interscience.

Tang,H, Wang, D, Ge, X (2004) Environmental nano-pollutants (ENP) and aquatic micro-interfacial processes Water Science and Technology Vol 50 No 12 pp 103-109

Thurman E. M; Malcolm, R.. L. (1981) Preparative isolation of aquatic humic substances. *Env. Sci. Tech.* v 15, n. 4, pp. 463-466.

Wetzel, R. G. & Likens, G. E. Limnological analysis. 2 ed. New York, W. B. Saunders Company, 1991. 391p.

Capítulo 2

Efeitos diretos das substâncias húmicas no crescimento da alga clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata*: propostas para o controle de florações algais

Resumo

As substâncias húmicas (SH's) podem agir como xenobióticos naturais para alguns organismos. Em algas, por exemplo, diversos estudos têm demonstrado a tendência de limitações no crescimento populacional na presença de substâncias húmicas e derivados de extratos vegetais. Contudo, também é observado um favorecimento ao crescimento populacional em baixas concentrações de SH. No presente estudo, através da metodologia de superfície de resposta (RSM), foram avaliados os efeitos da adição das SH's sobre a alga clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata* em função do tempo. Os resultados obtidos caracterizam dois modelos de respostas altamente significativos, evidenciando que em baixas concentrações (0,3 até 10 mgL⁻¹) as SH's estimulam o crescimento algal e em altas existe a tendência de redução do crescimento. Os modelos gerados permitiram o desenvolvimento de um *software* para agilizar as previsões da densidade celular e da concentração de clorofila em função das concentrações de SH's e tempo. A metodologia de RSM possui diversas aplicações na ecotoxicologia e no desenvolvimento de produtos voltados a tecnologia ambiental. Com base em dados de literatura, propõe-se ainda a aplicação da SH como técnica viável no controle de florações algais, em sistemas que não envolvam captação direta de águas para o abastecimento.

Palavras-chave: Substâncias húmicas, *Pseudokirchneriella subcapitata*, superfície de resposta, *software*

INTRODUÇÃO

Nos sistemas aquáticos as substâncias húmicas podem interagir com a biota através de duas vias principais: a) por meio de efeitos diretos, quando ocorre a interação entre as espécies húmicas diretamente sobre a estrutura física dos organismos e b) indiretos, quando as substâncias húmicas atuam como modificadores do meio, interagindo com diversas substâncias que, em diferentes escalas, atuarão sobre os organismos.

Segundo Steinberg (2003) os efeitos diretos das SH's sob os organismos aquáticos são diversos e não passíveis de generalizações, pois a origem, natureza química e mesmo a metodologia adotada nos estudos (extração e purificação) podem influenciar nas características do material em estudo. Além disto, os estudos sobre os efeitos diretos das SH's sobre os organismos ainda são poucos desenvolvidos quando comparados com outras substâncias.

De acordo com Steinberg (2006), as SH's podem exercer grande influência direta sobre os organismos. Dentre os principais processos, estão a interação com as membranas biológicas, que podem acarretar em respostas semelhantes à presença de xenobióticos. Em alguns casos, as substâncias húmicas podem ser absorvidas pelas células e desencadear respostas do sistema de detoxificação do organismo.

Em relação às algas, estudos desenvolvidos por D'Aquino (1979) com a alga *Melosira italica* evidenciaram que o ácido húmico tende a favorecer o crescimento algal em baixas concentrações (até 56 µg/L) e em altas concentrações sua ação é depreciativa. Segundo Pflugmacher et al (2006) e Steinberg (2003) as SH's interferem na cadeia transportadora de elétrons do sistema fotossintético e, por conseqüência, diminuem a fotossíntese, fazendo as SH's atuarem como herbicidas. Além disto, extratos de plantas em fase de decomposição, também chamados de *humic-like substances*, também atuam como inibidores de crescimento algal (RIDGE et al, 1999; MARTIN & RIDGE, 1999).

Contudo, as SH's também podem favorecer a viabilidade e longevidade das células algais. De acordo com Pouneva (2005), o preparado comercial patenteado como Bionim auxiliou na viabilidade de culturas de clorofíceas e cianofíceas. Contudo, esta relação é dose e espécie-dependente, sendo que em altas concentrações as SH's promovem a inibição do crescimento.

As aplicações das propriedades anti-algais dos extratos vegetais têm sido aplicadas há muitos anos por piscicultores, como forma de controle das florações em viveiros (RIDGE et al, 1999). Desta forma, apesar de muitas limitações, discute-se a hipótese de adoção das substâncias húmicas como auxiliares no controle de florações, especialmente em viveiros de aquicultura.

A demanda por tecnologias para o controle de algas cresce à medida que os prejuízos e riscos das florações aumentam. Estimativas apontam para perdas econômicas decorrentes das florações da ordem de US\$ 449 milhões nos EUA (ANDERSON et al, 2000) e na Austrália podem chegar a US\$ 240 milhões (LWRRDC, 2000).

Grande parte destes custos está relacionada à eutrofização de águas para o abastecimento, que necessitam, devido à escala, de medidas de gerenciamento eficazes para a

prevenção. Contudo, as perdas da aquicultura também correspondem a valores econômicos significativos e este setor necessita de tecnologias efetivas para o controle de florações, uma vez que apenas as práticas de manejo não são suficientes. Muitas das perdas em aquicultura são causadas pela redução drástica das concentrações de oxigênio dissolvido e pela intoxicação crônica por toxinas algais.

Nestes sistemas o risco dos efeitos negativos da presença das SH's seriam menores quando comparados, por exemplo, a açudes e lagos para abastecimento. A remoção das SH's se faz necessária quando o processo de tratamento de água inclui compostos a base de cloro, uma vez que a interação entre matéria orgânica (MO) e compostos clorados podem levar a formação de compostos altamente tóxicos como os trihalometanos (THM) (Di Bernardo e Tangerino, 2006).

Frente às constâncias de aparecimento e problemas associados, diversas tecnologias estão disponíveis no mercado para o controle de florações, como apresentado na Tabela I. Na prática, o alvo de muitos destes tratamentos são florações de algas cianofíceas, uma vez que oferecem riscos em diversas atividades, como aquicultura e abastecimento público. Ressalta-se que cada país possui um conjunto de legislações próprias para o uso e aplicação de diferentes produtos para controle das florações.

Tabela I: Exemplos das principais tecnologias empregadas no controle de florações algais, baseadas em estudos científicos ou empíricos.

Tecnologia/produto	Princípio	Referência
BioWorld Algae Treatment®	Inoculação de consórcio microbiano (competidores)	www.adbio.com
Sulfato de cobre	Intoxicação	
Óxido de zinco e brometo de amônio em concretos	Intoxicação/prevenção de biofilme	Alum et al (2008)
Herbicidas (p. ex. Atrazina)	Intoxicação	
Peróxido de hidrogênio	Oxidante	
HydroSmart®	Frequências ressonantes (quebra de substrato e mudança de afinidade de nutrientes)	www.hydrosmart.com.au
Sonic Solutions® LG Sonic®	Ultrassom (lise celular)	www.canadianpond.ca http://www.lgsonic.com Zhang et al (2006)
Manipulação de cadeia trófica	Controle de <i>Cochlodinium polykrikoides</i> por ciliado (<i>Strombidinopsis jeokjo</i>)	Jeong et al (2008)
	Controle com manipulação de espécies de peixes	Xie & Liu (2001)

Um aspecto importante na escolha da tecnologia adequada para o controle de florações é a escala. Algumas das tecnologias descritas na Tabela I não são aplicáveis a grandes reservatórios e zonas costeiras, por exemplo. Para sistemas abertos, na escala de bacias hidrográficas, o gerenciamento das fontes poluidoras e a prevenção à poluição ainda são as melhores alternativas.

Em um outro sentido, a possibilidade de risco da ocorrência de florações tóxicas torna necessária a adoção de medidas específicas para o controle não apenas da densidade celular, como das toxinas geradas pelas algas. Dentre as toxinas de maior ocorrência estão as Microcistinas, um grupo de heptapeptídeos monocíclicos com mais de 70 variantes identificados (Spoof et al, 2003). Na Tabela II são apresentadas algumas das principais tecnologias para o tratamento de controle das microcistinas.

Desta forma, apesar dos objetivos de controle de florações e controle de toxinas poderem ser congruentes, os dados apresentados revelam que existem diferenças substanciais entre as estratégias de controle de densidade celular e de toxinas algais (no exemplo Microcistinas). A interação entre Microcistinas e SH é reportada por alguns autores (Welker e Steinberg, 2000).

Tabela II: Eficiência do tratamento da água para remoção de microcistinas. Modificado de Hrudehy *et al.* (1999).

Técnica de tratamento	Expectativa de remoção		Observações
	Célula intacta	Toxinas dissolvidas	
Coagulação/sedimentação/flotação por ar dissolvido	>80%	<10%	Remove apenas a toxina celular
Precipitação/sedimentação	>90%	<10%	Remove apenas a toxina celular
Filtração rápida	>60%	<10%	Remove apenas a toxina celular
Filtração lenta em areia	~90%	Provavelmente significativa	A eficiência para microcistina dissolvida depende do biofilme e comprimento do filtro
Coagulação/sedimentação/filtração combinadas	>90%	<10%	Remove apenas a toxina celular
Adsorção (PAC)	Insignificante	>85%	Para doses adequadas (>20mg/L), a competição COD reduz a capacidade
Adsorção (GAC)	>60%	>80%	A competição COD reduz a capacidade e acelera a lise celular
Carvão ativado granular biológico	>60%	>90%	A atividade biológica aumenta eficiência de remoção
Pré-ozonização	Aumenta a coagulação	Aumenta o potencial	Utilizado em doses baixas para auxiliar a coagulação das células, risco de lise celular
Pré-cloração	Aumenta a coagulação	Provoca lise celular e liberação de toxinas	Útil para auxiliar a coagulação, mas aplicável para algas tóxicas apenas se o tratamento posterior remover toxinas dissolvidas
Ozonização (pós-clarificação)	—	>98%	Rápido e eficiente para toxinas solúveis
Cloro livre (pós-filtração)	—	>80%	Efetivo se Cl ⁻ >0,5 mg/L após 30 minutos a pH<8 e baixo COD
Cloramina	—	insignificante	Ineficiente
Dióxido de cloro	—	insignificante	Não efetivo com doses usadas em tratamento de água para abastecimento
Permanganato de potássio	—	95%	Efetivo sobre toxina solúvel, mas apenas na ausência de células
Peróxido de hidrogênio	—	insignificante	Não efetivo
Radiação UV	—	insignificante	Capaz de degradar microcistinas e anatoxinas, em doses impraticavelmente altas
Processos de membranas	>99%	incerto	Depende do tipo de membrana

No presente estudo, são avaliados os efeitos da aplicação das substâncias húmicas sobre o crescimento da clorofícea *Pseudochirchinerilla subcapitata* e discutidas as possibilidades

quanto a sua aplicação como tecnologia de suporte ao controle de florações, no entanto, sem explorar as possibilidades de redução das concentrações de toxinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração e purificação das SH's

Como fonte de ácidos húmicos tropicais foi usada uma amostra de solo húmico (turfa) obtida em uma região de floresta localizada às margens do rio Mogi-Guaçu, no município de Luiz Antônio-SP. As amostras foram coletadas a cerca de 10 cm da superfície evitando ao máximo a contaminação com outras camadas de solo. A cor negra da turfa facilitou a localização do horizonte no solo.

As amostras de solo húmico (turfa) foram submetidas aos procedimentos de extração em fase alcalina, de acordo com a metodologia recomendada pela International Humic Substances Society (IHSS) e de Thurman & Malcolm (1981). Inicialmente, as amostras foram submetidas à extração alcalina com NaOH 0,5 mol/L, à temperatura ambiente, na razão volume de extrator/substrato de 1:10 (m/v), por um período de duas horas. Neste procedimento extraiu-se as substâncias húmicas (SH's) que são constituídas por ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF). O extrato de substâncias húmicas (AH+AF) foi acidificado para precipitação da fração de ácidos húmicos e centrifugado por 15 min. Posteriormente, submeteu-se o material a diálise em membrana de celulose (celulose comercial) em água destilada. Não foram observadas perdas significativas de ácido húmico através de análise de amostras do meio de diálise em 450 nm, evidenciando que a porosidade da membrana estava adequada.

Posteriormente o extrato de ácido húmico foi solubilizado com um pequeno volume de uma solução de NH_4OH 0,1M purificadas em um sistema de colunas contendo a resina de troca iônica Amberlite IR-120 e IRA-400. O material foi liofilizado até o emprego. Para a ressuspensão foi utilizada água purificada (Mili Q[®]) sob forte agitação mecânica, obtendo-se desta forma a solução estoque com concentração definida de SH.

*Cultura e preparação das culturas de *Pseudochirchineriella subcaptata**

Os organismos foram cultivados de acordo com as normas da ABNT (2005) e AFNOR (1986). O meio L.C: Oligo foi preparado conforme a formulação descrita na Tabela III. O meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 15 minutos antes do uso. Cerca de 100 ml de meio foram

distribuídos em frascos de 250 ml, inoculados e mantidos a 25°C, com iluminação 12:12h claro/escuro e agitação constante, até atingirem a fase exponencial de crescimento. Os inóculos foram então mantidos sob refrigeração (10°C) até exposição no ensaio. As condições de iluminação para o crescimento e os ensaios foram: lâmpadas fluorescentes brancas (luz do dia, vapor de mercúrio) de 46W, 60Hz, 6400K e iluminância média na mesa agitadora de $1,04 \times 10^7$ cd.cm^{-1} .

Tabela III: Composição do meio L. C. Oligo utilizado no estudo (AFNOR, 1980)

Solução	Composto	Concentração (M)	Volume (mL) da solução estoque para 1L de meio
1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.24	1.00
2	KNO_3	0.99	1.00
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.20	1.00
4	K_2HPO_4	0.23	1.00
5	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.00016	0.50
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.00005	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0002	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0001	
	$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.0002	
	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.0005	
	H_3BO_3	0.001	
6	$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.005	0.50
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.002	
7	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.002	1.00
	NaHCO_3	0.2	

Desenho experimental e exposição dos organismos

Como forma de avaliar os efeitos combinados das variáveis tempo (t) e concentração de SH, foi adotada a metodologia da superfície de resposta (RSM), adotando os princípios do planejamento fatorial com ponto central. De acordo com Barros Neto et al (2001) esta metodologia pode ser adotada sempre que se deseja obter uma otimização de variáveis em procedimentos operacionais. O planejamento fatorial determina quais fatores têm efeitos relevantes na resposta e ao mesmo tempo como o efeito de um determinado fator varia com os níveis dos outros fatores. O planejamento fatorial permite medir o grau das interações entre diferentes fatores e a geração de modelos baseados nas análises.

O planejamento adotado levou em consideração duas variáveis (tempo em horas) e concentração de SH (mgL^{-1}) com quatro pontos centrais. O intervalo da primeira variável foi entre zero e 183 h e o da segunda entre 0,3 e 15 mgL^{-1} de SH. Cada combinação gerou um tratamento (tempo/concentração) em um total de 11 combinações. A cada tempo foi amostrado

um controle como forma de verificação da qualidade. Na Tabela IV estão apresentadas as combinações de tempo e de concentração adotadas.

Cada um dos 11 tratamentos, mais os cinco controles de cada tempo, foi inoculado a uma densidade entre 10^4 e 10^5 cél.ml⁻¹ em fase exponencial de crescimento (algas e SH) sob condições assépticas e expostos sob iluminação e agitação constantes. Os tratamentos foram retirados nos tempos determinados pelo planejamento e alíquotas foram reservadas para contagem de células (em câmara de Newbauer) e determinação da concentração de clorofila total (Nush, 1980).

Tabela IV: Planejamento fatorial 2^2 com quatro pontos centrais. Os valores da concentração de SH foram gerados pelo modelo. Em cada um dos cinco tempos foi amostrado um controle.

Tratamento	Tempo (níveis)	SH (níveis)	Tempo (h)	SH (mgL ⁻¹)
1	-1.41	0	81	7.65
2	-1	-1	96	2.45
3	-1	1	96	12.85
4	0	-1.41	132	0.30
5	0	0	132	7.65
6	0	0	132	7.65
7	0	0	132	7.65
8	0	1.41	132	15.00
9	1	-1	168	2.45
10	1	1	168	12.85
11	1.41	0	183	7.65

Análise de dados e simulações

Os dados obtidos foram avaliados com auxílio do programa computacional Statistica[®]. As estimativas de IC₅₀ com as simulações de taxa de crescimento foram obtidas através de interpolação linear (USEPA ICP, 1993). Os modelos de crescimento (densidade celular) e concentrações de clorofila (µgL⁻¹) obtidas foram utilizados na elaboração de um programa computacional (AlgiTox Versão Beta) desenvolvido com a plataforma LabView[®] como forma de agilizar a realização das simulações.

RESULTADOS

O crescimento do controle (Figura 01) atendeu aos critérios mínimos de validade e apresentou correlação linear significativa ($p < 0.05$) em relação ao tempo. Desta forma, pode-se inferir que as células apresentaram a tendência de crescimento em função do tempo, sendo possível então atribuir à variável SH as alterações na taxa de crescimento.

Figura 01: correlação linear entre tempo e densidade celular no controle.

A partir dos dados de densidade celular (cél·ml⁻¹) e concentração de clorofila (µg.L⁻¹) foram gerados os modelos de regressão quadrática, seguindo a metodologia da superfície de resposta. A análise de variância (ANOVA) para ambas as respostas (densidade celular e concentração de clorofila) apresentou-se altamente significativa ($R^2 = 0,97$ e $0,98$, respectivamente), conforme apresentado nas Tabelas V e VI. Desta forma, os modelos gerados explicam satisfatoriamente a variância dos dados.

Tabela V: Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da densidade celular.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-Calculado	F-tabelado
Modelo	3,17 E+13	5	6,355E+12	43,83	5,05
Residual	7,25 E+11	5	1,45E+11		
Total	3,25 E+13	10			

% variação explicada (R^2) = 0,9753 e α = 0,05. F- Calc / F- Tabelado = 8,68 (altamente significativo)

Tabela VI: Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da clorofila total.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-Calculado	F-Tabelado
Model	14.630.471	5	2.926.094,2	96,04	5,05
Residual	152.345	5	30.469,0		
Total	14.782.816	10			

% variação explicada (R^2) = 0,9896 e α = 0,05. F- Calc / F- Tabelado = 19,02 (altamente significativo)

Para a densidade celular, através da análise da superfície de resposta gerada, observa-se a tendência de quanto maior o tempo e menor a concentração de SH maiores são as densidade algais (Figuras 02 e 03). Na Figura 04 está apresentada a correlação entre os valores preditos pelo modelo e os observados.

Figura 02: Superfície de resposta da densidade de células (cel.ml⁻¹) em função do tempo (h) e da concentração de SH (mg.L⁻¹).

Figura 03: Gráfico de contornos da superfície de resposta da densidade de células (cel.ml⁻¹) em função do tempo (h) e da concentração de SH (mg.L⁻¹).

Figura 04: Correlação entre valores preditos e observados do modelo de densidade de células (cel.ml⁻¹) em função do tempo (h) e da concentração de SH (mg.L⁻¹).

Os dados obtidos com as concentrações de clorofila corroboram com hipóteses apresentadas acima, verificando-se que há uma redução na concentração/atividade das células algais na presença de concentrações mais elevadas de SH (Figuras 05, 06 e 07).

Figura 05: Superfície de resposta da concentração de clorofila total (µg.L⁻¹) em função do tempo (h) e da concentração de SH (mg.L⁻¹).

Figura 06: Gráfico de contornos da concentração de clorofila total ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em função do tempo (h) e da concentração de SH (mg.L^{-1}).

Figura 07: Correlação entre valores preditos e observados da concentração de clorofila total ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em função do tempo (h) e da concentração de SH (mg.L^{-1}).

A partir das equações obtidas nas superfícies de resposta, foram efetuadas simulações de densidade de células (cel.ml^{-1} , Eq. 1) e concentração de clorofila total ($\mu\text{g.L}^{-1}$, Eq. 2). As equações adotadas foram as que descrevem a superfície de resposta:

$$D_{cel} = A+Bx+Cx^2-Dy+Ex^2-Fxy.....(1)$$

Onde,

D_{cel} = densidade celular em cél.ml^{-1} , x é a concentração de SH (mgL^{-1}) e y o tempo (horas) e as constantes,

$$A = 493381,8144639$$

$$B = 585491,83822187$$

$$C = 115943,42274591$$

$$D = 1585140,7938617$$

$$E = 1091749,4687195$$

$$F = 720000$$

$$C_{clo} = A+Bx+Cx^2-Dy+Ex^2-Fxy.....(2)$$

Onde,

C_{clo} = concentração de clorofila em μgL^{-1} , x é a concentração de SH (mgL^{-1}) e y o tempo (horas) e as constantes,

$$A = 718,25$$

$$B = 550,7324780651$$

$$C = 92,1984375$$

$$D = 1052,349260723$$

$$E = 600,4984375$$

$$F = 562,16875$$

Em linhas gerais, as equações descrevem que as respostas são influenciadas positivamente pela variável x (SH), de sinal positivo na equação, e negativamente por y (tempo), de sinal negativo. Desta forma, o modelo pressupõe que as SH's tendem a aumentar a densidade de células e a concentração de clorofila, mas seriam limitadas no tempo. O tempo, neste caso, pode ser traduzido de duas formas: o tempo necessário para uma nova geração de indivíduos e o tempo de exposição das algas junto com a SH. Contudo, o último termo da equação (xy) descreve a interação das duas variáveis (tempo e SH) na resposta. Como a interação de tempo e SH têm sinal negativo, logo, a interação destas promove uma redução em ambas as respostas. Ou seja, neste termo do modelo, pressupõe-se o efeito limitante causado pela concentração de SH.

As simulações estão dentro dos limites experimentais que são as mesmas faixas utilizadas nos ensaios (tempo entre 81 e 183 h e SH entre 0,3 e 15 mgL^{-1}). Na Figura 8 pode ser observada a simulação para concentração de clorofila em função do tempo em diferentes concentrações de SH.

A

B

Figura 08: Simulação da concentração de clorofila em função do tempo em diferentes concentrações de SH. Em A= Faixa entre 0 e 9,0 mgL^{-1} ; B= faixa entre 8,0 e 15,0 mgL^{-1} .

As simulações com a concentração de clorofila total para a espécie *P. subcapitata* resultaram em concentrações de clorofila na faixa de 96 a 5570 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo esta a faixa de trabalho mais provável para este modelo. Os dados evidenciam que a concentração de 10 mg L^{-1} de SH é que provavelmente irá estabilizar a concentração ao longo do tempo, enquanto a concentração de 15 mg L^{-1} de SH tenderá reduzir a zero a concentração de clorofila.

Os dados de simulação da densidade apresentaram tendências semelhantes às observadas para a clorofila (Figura 09). A faixa de densidade simulada pelo modelo é de cerca de zero (valores negativos não são considerados) até $5.86 \times 10^6 \text{ cel. ml}^{-1}$, sendo essa faixa o limite para as interpretações. Observa-se que a população tende a extinção na concentração mais elevada (12 mg L^{-1} de SH). Ressalta-se ainda que, em ambos os casos, o modelo prevê as respostas apenas dentro dos limites de tempo e SH.

A

B

Figura 09: Simulação da densidade celular em função do tempo em diferentes concentrações de SH. A= Faixa de SH entre 0.0 e 9.0 mgL⁻¹. B= Faixa de SH entre 8.0 e 12.0 mgL⁻¹.

As taxas de crescimento calculadas com base nas simulações estão apresentadas na Figura 10. O gráfico mostra que a taxa de crescimento tende a zero em concentrações a partir de 12 mgL⁻¹, corroborando as simulações de densidade em função do tempo. A EC50 calculada por interpolação linear, a partir destes dados, foi de 12,47 mgL⁻¹ de SH, sendo que as simulações prevêm para esta concentração uma densidade celular próxima a zero por volta do tempo

118,4 h. Estes dados situam, portanto, a faixa de concentração e de tempo mais prováveis para a extinção das populações de *P. subcapitata* de acordo com o modelo.

Na Figura 11 estão representadas as médias e os desvios padrão ($\pm$ SD, IC 95%) das densidades celulares em função do tempo. Observa-se uma tendência de redução da amplitude do desvio em função do aumento da concentração de SH. Esta análise permite inferir qual a provável variação da densidade celular em uma dada concentração, independente do tempo, bem como estabelecer a faixa de concentração com menor variação da densidade populacional de *P. subcapitata* de acordo com o modelo.

Figura 10: Simulação da taxa de crescimento celular em diferentes concentrações de SH para a espécie *P. subcapitata*.

Figura 11: Simulação da densidade celular (médias e $\pm$ desvios padrão) em diferentes concentrações de SH para a espécie *P. subcapitata*.

Como forma de agilizar as simulações, foi desenvolvido um programa computacional que utiliza as equações quadráticas (1 e 2) geradas pelo modelo de superfície de resposta, para produzir cenários de risco dentro dos limites estabelecidos. O programa AlgiTox versão Beta 1.0.0 simula a densidade celular ou concentração de clorofila a partir dos dados de concentração de SH e tempo, dentro das condições experimentais. Diversas simulações podem ser desenvolvidas com o uso desta ferramenta, a qual integra elementos visuais e de cálculo em uma interface amigável (Figuras 12 e 13).

Figura 12: *Workspace* do programa AlgiTox versão Beta desenvolvido com base nos modelos quadráticos para densidade de celular e concentração de clorofila.

Figura 13: Exemplos de simulações de densidade geradas pelo programa AlgiTox.

DISCUSSÃO

Os dados obtidos corroboram a literatura no sentido de que as altas concentrações de SH's podem afetar negativamente o crescimento das algas. De acordo com Prokhot'skaya & Steinberg (2007), em linhas gerais, as SH's podem agir de modo similar aos aleloquímicos, sendo que, apesar da falta de pesquisas específicas sobre a toxicocinética das SH em algas, os mais prováveis modos de ação são: interação com quinóides, estresse oxidativo e foto-toxicidade.

O processo de estresse oxidativo causado por SH é documentado tanto para espécies vegetais (BLOKHINA, 2000) como para animais, como peixes (MATSUO et al, 2006), nos quais a presença de SH induz a reposta do sistema de defesa (Citocromo P750). A foto-toxicidade é um processo que ainda carece de comprovação experimental, mas de modo análogo ao que ocorre com derivados de petróleo, a exposição simultânea dos organismos à SH e luz, poderia iniciar a liberação de radicais livres e espécies de oxigênio reativas (ROS) e causar danos celulares.

De acordo com Gjessing & Kallqvist (1991), a toxicidade das SH's sobre *P. subcaptata* pode estar relacionada a uma reação entre a radiação UV e as SH na formação de peróxidos. Segundo estes autores, esta reação seria mediada pelo íon Fe, caracterizando um processo de produção de peróxidos via uma reação foto-fenton. Desta forma, a formação direta de peróxidos pode ser uma das causas para a lise celular das algas na presença de SH.

Sun et al (2006) testaram o efeito algicida das SH's com a espécie *Anabaena circinalis* em função da presença de luz. O estudo mostrou que os peróxidos estão envolvidos com a lise celular das populações, nas condições experimentais adotadas. No entanto, não foram encontradas evidências da formação de peróxidos via reação Fenton na presença de SH. Contudo, as SH's poderiam estar envolvidas na inibição da catalase na presença de luz e por consequência na expressão tóxica dos peróxidos. Neste estudo, a concentração de SH que causou efeito negativo no crescimento das algas foi de 1.0 mgL^{-1} de C.

Portanto, o efeito negativo da presença das SH sobre o crescimento das algas pode ser condicionado a presença e a qualidade da radiação luminosa, sendo baseada em reações enzimáticas. No entanto, são necessários maiores estudos para a compreensão da cinética deste processo e na elucidação do papel do fenton e outros cátions nas reações.

Outro processo relacionado à interação das SH's com enzimas, é a complexação das fosfatases por SH. De acordo com Boavida & Wetzel (1998), as fosfatases são importantes enzimas responsáveis pela disponibilização do ortofosfato para organismos aquáticos. As fosfatases são complexadas pelas SH's incidindo em sua inativação temporária e transporte para

outros locais do sistema ou mesmo a exportação para outros ambientes. Este mecanismo é de grande importância na dinâmica das comunidades fito, zoo e bacteriplânctônicas. No entanto, estes autores mostram que as fostatases complexadas pelas SH's podem ser liberadas na presença da radiação UV, tornando-se novamente ativas para os organismos.

Este último exemplo reforça o antagonismo de efeitos existentes na presença das SH's em relação à comunidade fitoplanctônica. Por um lado, as SH's podem mediar a inibição do crescimento celular através da inibição da catalase, mas por outro pode favorecer a disponibilização de enzimas responsáveis pela liberação de nutrientes, como o fostato.

De acordo com Pflugmacher et al (2006) vários tipos de SH's podem interferir na eficiência fotossintética, devido provavelmente a interferência de quinonas no processo de fotossíntese de *Ceratophyllum demersum*. Outros estudos têm demonstrado a influência das SH's no sistema de transporte de elétrons em diversas reações redox de microorganismos (Nurmi & Tratnyek, 2002; Field & Cervantes, 2005; Perminova et al, 2005).

Este mecanismo de ação é análogo ao mecanismo de ação de alguns herbicidas. Comparando-se os valores de IC_{50} obtidos pela simulação com as taxas de crescimento de *P. subcapitata* com SH entre os obtidos experimentalmente por Fairchild et al (1997) para 16 pesticidas para a mesma espécie, observa-se, na Figura 14, que as SH's apresentam uma toxicidade estimada menor em relação ao 2,4D e dicamba e na mesma faixa do bromoxynil, EPTC e simazina, sendo o 3º composto mais tóxico nesta comparação.

Mesmo baseando-se em simulações, esta estimativa mostra que a toxicidade das SH's ocorre em uma ordem de grandeza semelhante a compostos inibidores de fotossíntese (bromoxynil e simazina). Considerando as evidências para as interferências diretas das SH's no processo fotossintético, recomenda-se que sejam desenvolvidos mais estudos de forma a elucidar a interferência direta das SH's no processo fotossintético.

Os dados obtidos pelas simulações executadas pelo AlgiTox apresentam, no entanto, uma particularidade no que tange a discussão em relação à toxicidade. A partir da concentração de $9,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de SH, no tempo 180h, a curva de densidade tende a zero, indicando a extinção da população. Nos valores menores que $9,0 \text{ mg.L}^{-1}$, no mesmo intervalo de tempo, especialmente nas concentrações mais baixas, as tendências de densidade apresentam uma curva em forma de "U", mostrando uma redução da densidade seguida de uma recuperação. Apesar de não ter sido possível comprovar esta simulação com experimentos específicos uma questão surge para estudos futuros: é possível ocorrer a recuperação da população de algas após uma redução

drástica? O presente estudo sugere que existe uma relação direta entre a toxicidade das SH e o tempo, sendo que, em parte, os dados apresentados apontam para uma dependência da toxicidade das SH's em função do tempo.

De acordo com Pouneva (2005), existe a possibilidade das SH's estimularem o crescimento algal em baixas concentrações, processo também observado por D'Aquino (1979) para *Melosira italica* e por Prokhot'skaya & Steinberg (1997), onde o crescimento de *Desmodesmus communis* foi estimulado pela presença de SH a partir de 11 dias. O modelo desenvolvido corrobora tanto com as tendências apresentadas para o estímulo quanto para a o declínio populacional.

Figura 14: IC50 96h média para 16 pesticidas em relação a *P. subcapitata* (Fairchild et al, 1996) em relação à estimativa de IC50 para SH (*) no presente estudo.

As perspectivas de aplicação da tecnologia de SH para controle de florações têm fundamentos em estudos de campo. De acordo com Sun et al (2005, 2006) existem evidências de uma tendência para redução da densidade celular de cianofíceas em função do aumento da concentração de SH. Este fato abre possibilidades para o desenvolvimento de produtos húmicos com o intuito de controlar florações em situações de campo. No entanto, pondera-se que, por diversos fatores, este controle seja executado sob condições que não impliquem em captação de água para consumo e que sejam em sistemas fechados, tais como, por exemplo, viveiros/tanques de piscicultura e ETEs. Comparando-se com as demais tecnologias existentes,

um possível cenário de risco para as atuais tecnologias de controle de florações está apresentado na Tabela VII.

Tabela VII: Cenários de risco para as principais tecnologias de controle de florações.

Tecnologia/técnica	Pontos favoráveis	Pontos negativos	Viabilidade
Herbicidas sintéticos	Ação rápida	Efeitos não específicos, bioacumulação, derivados pouco conhecidos.	Uso em circuitos fechados sem aplicação para consumo. Necessidade de análise antes do descarte.
Metais pesados (p.ex. Cu)	Ação rápida	Bioacumulação, persistência	Uso em circuitos fechados sem aplicação para consumo. Necessidade de tratamento (remoção de metais) antes do descarte.
Estruturas antibiofilme (impregnação de metais em concreto, p.ex.)	Ação semi-específica (limitada a superfície)	Liberação de compostos tóxicos	Avaliar os riscos devido à lixiviação dos compostos ativos.
SH	Baixa toxicidade ambiental. Detoxificação simultânea de outros compostos	Interação com outros compostos	Não utilizar em águas de abastecimento
Extratos vegetais	Baixo custo	Pode ser tóxico (como os taninos)	Avaliar os riscos para uso em águas de abastecimento
Ultrassom	Processo físico, sem uso de reagentes	Pode liberar toxinas algais. Custo. Elevado para grandes volumes	Indicado como medida preventiva em sistemas fechados.

CONCLUSÕES

- Os resultados corroboram com as informações contidas na literatura de que as SH's podem tanto estimular quanto suprimir o desenvolvimento das algas, o que foi observado, neste estudo, para a espécie *Pseudokirchneriella subcapitata*.
- O modelo desenvolvido corrobora tanto com as tendências apresentadas para o estímulo quanto para a o declínio populacional, sendo que a combinação dos fatores tempo e concentração são os possíveis moduladores do crescimento. A metodologia de superfície de resposta apresenta diversas vantagens para os estudos ecotoxicológicos, por possibilitarem a geração de modelos com as variáveis testadas, sendo extremamente útil para o desenvolvimento tecnológico.

REFERÊNCIAS

ABNT (2005) Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2005. Ecotoxicologia aquática— toxicidade crônica Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). NBR12468, 27p, Rio de Janeiro.

- AFNOR (1980) Association Française de Normalisation Afnor. Norme expérimentale.T90-304. Essais deseaux Determination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance.
- Alum, A., Rashid, A, Mobasher, B, Abbaszadegan M. (2008) Cement-based biocide coatings for controlling algal growth in water distribution canals. *Cement and Concrete Composites* DOI:10.1016/j.cemconcomp.2008.06.012
- Anderson, D; Hoagland, P; Kaoru, Y; White, A. W; (2000) Estimated Annual Economic Impacts from Harmful Algal Blooms (HABs) in the United States. Technical Report Woods Hole Oceanog. Inst. Tech. Rept.,WHOI-2000-11.
- Barros Neto, B. Scarminio, I. S., Bruns, R. E (2001) Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Editora Unicamp. 401p.
- Boavida, MJ & Wetzel, R.G. (1998) Inhibition of phosphatase activity by dissolvedhumic substances and hydrolytic reactivation by natural ultraviolet light. *Freshwater Biology* 40, 285-293p.
- D'Aquino, V. A.(1979) Influência do ácido húmico no crescimento de *Melosira italica*. Diss. Mestrado. UFSCar. São Carlos. 95p.
- DiBarnardo, L e Tangerino, E. P. (2006) Removal of Humic substances in slow sand and slow sand/activated carbon filtration using ozone and hydrogen peroxide as pre-oxidants. *In: By Gimbel,R, Graham, N. J. D, Robin, M* (2006) Recent Progress in Slow Sand and Alternative Biofiltration Processes. IWA Publishing. 225-231p.
- Fairchild J. F, Ruessler D. S,. Haverland P. S, Carlson A. R. (1997) Comparative Sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to Sixteen Herbicides *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32, pp. 353–357

- Field JA, Cervantes FJ (2005): Microbial redox reactions mediated by humus and structurally related quinones. In: Perminova IV, Hatfield K, Hertkorn N (eds), Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice. NATO Science Series IV: Earth and Environmental Sciences 52. Springer, Chapter 17, pp 343–352
- Gjessing ET, Kallqvist T (1991) Algicidal and chemical effect of U.V.-radiation of water containing humic substances. *Water Res* 25:491–494
- Hrudey, S.; Burch, M.; Drikas, M., Gregory, R. (1999). Remedial measures. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E & FN Spon. p.267–301.
- Jeong . H. J., Kim, J. S., Yoo, Y. D., Kim, S. K., Song, J. Y., Kim, T. H., Seong, K. A, Kang, N. S., Kim, M. S., Kim, J. H, Kim, S., Ryu, J., Lee, R. M, Yih, W. H. (2008) Control of the harmful alga *Cochlodinium polykrikoides* by the naked ciliate *Strombidinopsis jeokjo* in mesocosm enclosures. *Harmful Algae* 7 pp. 368–377
- LWRRDC (2000) 'Cost of algal blooms', LWRRDC Occasional Paper 26/99 Green Words & Images, Canberra. Fonte: www.lwrrdc.gov.au (acessado em 10 setembro de 2008).
- Martin D, Ridge I (1999): The relative sensitivity of algae to decomposing barley straw. *J Appl Phycol.* v.11, n3, pp. 285-291.
- Nurmi JT, Tratnyek PG (2002): Electrochemical properties of natural organic matter (NOM), fractions of NOM, and model biogeochemical electron shuttles. *Environ Sci Technol* 36, 617–624
- Nush, E A. (1980) Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Archiv. fur Hydrobiologie Stuttgart*, v.14: p. 14-36.
- Perminova IV, Kovalenko AN, Schmitt-Kopplin P, Hatfield K, Hertkorn N, Belyaeva EY, Petrosyan VS (2005): Design of quinoid-enriched humic materials with enhanced redox properties. *Environ Sci Technol* 39, pp.8518–8524

- Pflugmacher S, Pietsch C, Rieger W, Steinberg CEW (2006): Influence of structural moieties of dissolved organic matter on the photosynthetic oxygen production of aquatic plants. *Sci Total Environ* 357, pp.169–175
- Pouneva I. D. (2005). Effect of Humic Substances on the Growth of Microalgal Cultures. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 52, n 3, pp. 410–413.
- Prokhotskaya V.Yu, Steinberg C.E.W. (2007): Differential Sensitivity of a Coccal Green Algal and a Cyanobacterial Species to Dissolved Natural Organic Matter (NOM). *Env Sci Pollut Res* 14, Special Issue 1, pp.11–18
- Ridge I, Walters J, Street M (1999) Algal growth control by terrestrial leaf litter: a realistic tool? *Hydrobiologia* 395/396, pp. 173–180
- Spoof, L., Vesterkvist, P., Lindholm, T. & Meriluoto, J. (2003). Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1020. pp. 105–19.
- Steinberg CEW (2003): Ecology of Humic Substances in Freshwaters. Determinants from Geochemistry to Ecological Niches. Springer, Berlin. 440p.
- Sun BK, Tanji Y, Unno H (2005): Influences of iron and humic acid on the growth of the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Biochem Engin J* 24, pp.195–201
- Sun BK, Tanji Y, Unno H (2006): Extinction of cells of cyanobacterium *Anabaena circinalis* in the presence of humic acid under light. *Appl Microbiol Biotechnol* 72. pp. 823–828
- USEPA. (1993) ICP A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach. v 2.0.
- WELKER, M., STEINBERG, C.E.W. (2000) Rates of Humic Substance Photosensitized Degradation of Microcystin-LR in Natural Waters. *Environ. Sci. Technol*, 34, pp. 3415–3419

- Xie, P., Liu, J. (2001) Practical Success of Biomanipulation using Filter-feeding Fish to Control Cyanobacteria Blooms a Synthesis of Decades of Research and Application in a Subtropical Hypereutrophic Lake. *The Scientific World* pp. 337–356 .
- Zhang, G., Zhang, P., Wang, B., Liu, H. (2006) Ultrasonic frequency effects on the removal of *Microcystis aeruginosa* *Ultrasonics Sonochemistry* v. 13, n5, pp 446-450.

Capítulo 3

Efeitos diretos e indiretos das substâncias húmicas em organismos aquáticos e sua interação com xenobióticos: propostas para estruturação de cenários de risco ecológico

Resumo

As SH's têm reconhecido efeito na redução da toxicidade de metais e poluentes orgânicos em organismos aquáticos, sendo que, em alguns casos, a interação entre as SH's e um xenobiótico pode acarretar em aumento da toxicidade. Nesse sentido, o presente estudo avalia os efeitos diretos da SH e sua capacidade de detoxificação em relação aos íons metálicos Cu e Cd, atrazina, surfactante (Extran) e microcistina-LR em diferentes organismos aquáticos. Os principais efeitos diretos foram a aceleração da emergência de *C. xanthus* e a ausência de mortalidade, em testes agudos, para as espécies *D. magna* e *D. longispina*. Para as duas espécies zooplancônicas testadas (*D. similis* e *C. silvestrii*) houve redução dos efeitos agudos e crônicos para o Cobre. Os ensaios agudos com *D. rerio* apresentaram tendência semelhante. No entanto, a espécie *C. xanthus* apresentou uma resposta negativa a presença de SH quando exposto simultaneamente a Cu e Cd. Tendências de redução de toxicidade para metais e microcistina-LR foram observadas nos ensaios crônicos parciais com *D. rerio*. A presença das SH's reduziu a toxicidade das amostras ambientais contaminadas com atrazina e surfactantes. A viabilidade do uso de SH para a detoxificação de metais é discutida, juntamente com uma análise dos efeitos da presença isolada das SH's sobre alguns organismos aquáticos.

Palavras-chave: Substâncias húmicas, metais pesados, atrazina, surfactante, microcistina-LR, detoxificação, organismos aquáticos.

Introdução

A capacidade de complexação das substâncias húmicas (SH) pode se traduzir em detoxificação, quando os efeitos negativos de uma determinada substância anulam-se ou são reduzidos (STEINBERG, 2003). Em alguns casos, a interação entre as SH's e um xenobiótico pode acarretar em incremento da toxicidade, tanto para efeitos agudos quanto crônicos, especialmente para compostos orgânicos como pesticidas, como por exemplo 2,4 Diclorofenol e Terbutilazina (Steinberg et al, 1992, 1994).

As causas desta variabilidade, além das propriedades da substância tóxica de interesse, é a natureza das SH's em si. A variabilidade funcional ocorre em função de diversos fatores como origem, idade, meio reacional e estrutura, e outras influenciam na toxicocinética e na toxicodinâmica dos xenobióticos na presença das SH's. Além disto, a resposta também dependerá do organismo em estudo, uma vez que é reconhecida que as espécies possuem comportamentos distintos frente a uma mesma fonte e concentração de SH.(Steinberg, 1993).

Em alguns casos, como na interação das SH's com os cátions, alguns processos termodinâmicos foram mais elucidados e possibilitaram o surgimento de modelos matemáticos, que auxiliados por softwares, conseguem prever algumas tendências em relação à toxicidade em função da concentração de SH e COD. Dentre os modelos e *softwares* mais utilizados estão o MINEQL (Schecher & Mcavoy, 1991), WHAM (TRIPPING, 1994) e BLM (Ditoro et al, 2001). Contudo, ainda restam inúmeras lacunas para melhor entender a interação das SH's com substâncias orgânicas e, principalmente, em amostras complexas. Nesta linha de pesquisa diversos estudos vêm avançando, por exemplo, sobre a interação das SH's com agroquímicos (e.g. Runes, 2000; Martin-Neto et al, 2001),

No que tange aos aspectos ambientais das SH's, de forma didática pode-se avaliar o cenário da necessidade da pesquisa da interação destas substâncias de duas formas: a) a tecnológica, que visa desenvolver produtos e tecnologias baseadas nas propriedades funcionais das SH's ou b) ecológica, que visa compreender as interações das SH's no ambiente *per se*. Porém, ambas as linhas necessitam de caminhar simultaneamente devido a um princípio denominado de fatalístico: as SH's estão presentes nos ambientes aquáticos e terrestres de todo o globo, e mesmo que não se tenha a intenção de se fazer uso das propriedades das SH's para mudar o destino, toxicidade, partição ou reatividade de um dado composto, a natureza certamente o fará. Como foi abordando no Capítulo 1 do presente estudo, a contribuição do carbono orgânico detrital no planeta supera a de seres vivos.

O presente estudo foi baseado nas seguintes constatações: a) as SH's podem desempenhar ação direta sobre os organismos aquáticos (vertebrados e invertebrados), podendo alterar desde aspectos comportamentais até conduzir a letalidade; b) a interação com metais é passível de modelagem, porém tecnologicamente de difícil execução pois os metais mudam apenas de espécie a não ser que possam ser removidos do sistema em que se encontram, c) os poluentes orgânicos podem ser degradados com auxílio das SH's, porém devido a diversidade e complexidade de processos envolvidos a previsibilidade dos efeitos ecotoxicológicos sobre os organismos é, em muitos casos, praticamente nula.

Segundo Steinberg (2003) a natureza reacional das SH's varia de acordo com fatores regionais, intrínsecos de sua gênese e fonte de matéria orgânica. Desta forma, é necessário levantar o máximo de informações possíveis sobre SH de uma dada origem, especialmente se as mesmas têm interesse e potencialidade comercial, como no caso das SH's da bacia do rio Mogi-Guaçu.

Neste sentido, foram selecionados organismos teste, *endpoints* e funções ecológicas que possibilitassem contribuir com algumas questões relacionadas à tecnologia do emprego de SH ou suas funções ecológicas. As principais hipóteses testadas dizem respeito a: a) efeitos diretos sobre os organismos aquáticos, avaliando a sobrevivência e reprodução em diferentes espécies condicionadas por fatores genéticos ou não; b) efeitos agudos e crônicos relacionados a toxicidade de metais (Cd e Cu) e c) efeitos agudos e crônicos relacionados a poluentes orgânicos e amostras complexas. Na impossibilidade de se rastrear e combinar todos as substâncias/espécies, buscou-se selecionar algumas das principais ou mais problemáticas relações de causa-efeito de interesse científico-tecnológico ou econômico-estratégico.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta dos organismos a presença de SH isolada e na mistura com xenobióticos. Os *endpoints* e espécies testadas foram: a) ensaios agudos com SH isoladas (*Daphnia similis*, *D. magna* e *D. longispina*); b) efeitos crônicos e crônico parcial das SH's isoladas (*Danio rerio*, *Chironomus xanthus* e *Ceriodaphnia silvestrii*); c) ensaios agudos com mistura de SH e xenobióticos (*Daphnia similis* e *Danio rerio*); d) efeitos crônicos e crônico parcial das misturas de SH com xenobióticos (*Danio rerio*, *Chironomus xanthus* e *Ceriodaphnia silvestrii*). Os xenobióticos avaliados foram: Nitrato de Cobre, Nitrato de Cádmio, Gesaprim (Syngenta) © como fonte de atrazina, Extran Neutro (Merck)© como fonte de surfactantes, extrato semi-puro de Microcistina-LR e uma amostra ambiental tóxica.

Material e Métodos

Fontes de SH e extração e purificação dos ácidos húmicos tropicais

Como fonte de ácidos húmicos tropicais foi usada uma amostra de solo húmico (turfa) obtida em uma região de floresta localizada às margens do rio Mogi-Guaçu, no município de Luiz Antônio - SP. As amostras foram coletadas a cerca de 10 cm da superfície evitando ao máximo a

contaminação com outras camadas de solo. A cor negra da turfa facilitou a localização do horizonte no solo.

As amostras de solo húmico (turfa) foram submetidas aos procedimentos de extração em fase alcalina, de acordo com a metodologia recomendada pela International Humic Substances Society (IHSS) e de Thurman & Malcolm (1981). Inicialmente, as amostras foram submetidas à extração alcalina com NaOH 0,5 mol/L, à temperatura ambiente, na razão volume de extrator/substrato de 1:10 (m/v), por um período de duas horas. Neste procedimento extraíram-se as substâncias húmicas (SH) que são constituídas por ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF). O extrato de substâncias húmicas (AH+AF) foi acidificado para precipitação da fração de ácidos húmicos e centrifugado por 15 min. Posteriormente, submeteu-se o material a diálise em membrana de celulose (celulose comercial) em água destilada. Não foram observadas perdas significativas de ácido húmico, através de análise de amostras do meio de diálise em 450 nm, evidenciando que a porosidade da membrana, que apesar de desconhecida, estava adequada.

Posteriormente o extrato de ácido húmico foi solubilizado com um volume de uma solução de NH_4OH 0,1M purificada em um sistema de colunas contendo a resina de troca iônica Amberlite IR-120 e IRA-400. O material foi liofilizado até o momento de sua utilização. Para a ressuspensão foi utilizada água purificada (Mili Q[®]) sob forte agitação mecânica, obtendo-se desta forma a solução estoque com concentração definida de SH.

Como fonte comercial de SH foi utilizado o humic salt-Na Sigma-Aldrich. A solução estoque foi preparada através da diluição no meio de cultura a ser utilizado nos ensaios e, posteriormente, realizadas as diluições seriadas para obter a concentração desejada.

Reagentes e fontes de xenobióticos

Como fonte de metais pesados foram usados o Nitrato de Cobre (Sigma-Aldrich AAS Standard >99,0 % pureza) e Nitrato de Cádmio (Sigma-Aldrich AAS Standard >99,0 % pureza) e, como surfactante complexo e de uso comercial, o Extran Neutro (Merck)©.

O extrato semi-puro de Microcistina-LR foi fornecido pelo Dr. Alessandro Minillo (UNESP-FEIS) obtido através de culturas axênicas de *Microcystis aeruginosa* e extraídas e fracionadas em solventes orgânicos. Detalhes sobre parte do processo de extração e purificação podem ser obtidos em Matthiensen et al (2000).

Foram utilizadas duas amostras ambientais a) *runoff* contaminado por herbicida e b) água de um rio brasileiro altamente contaminado. O *runoff* foi obtido de uma área experimental piloto instalada no Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA-NEEA), onde são desenvolvidos diversos experimentos relacionados a análise dos efeitos de agroquímicos na interação aquático-terrestre. Dos experimentos desenvolvidos, amostras provenientes dos experimentos de contaminação por Gesaprim 500 CG (Syngenta)© foram selecionadas como fonte de atrazina (herbicida). Estes ensaios são parte de um projeto de colaboração do Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos, coordenado pelo Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola, e a Universidade de Coimbra (Portugal), coordenado pelos Dr. Rui Ribeiro e Dra. Isabel Lopes (IAV/IMAR Universidade de Coimbra) .

Para obtenção do *runoff* foram abertas duas parcelas paralelas de 10m x1m (teste e controle) onde foi simulada uma condição real de aplicação de herbicida (Figura 01). Na parcela teste foi aplicada a dose recomendada de Gesaprim 550 CG © na proporção de 4 L/ha. Após duas horas foi simulada uma forte chuva torrencial com a aplicação de 10L de água em ambas as parcelas. O *runoff* (controle e teste) foi recolhido e levado ao laboratório.

Figura 01: Vista geral da área utilizada para ensaios envolvendo *runoff*. À esquerda estão as parcelas de teste e controle. A direita detalhe da fossa de captura dos lixiviados.

Com o intuito de testar a eficiência da aplicação das SH's em um cenário realístico e complexo, foram utilizadas amostras provenientes de um rio brasileiro de grande porte e com

alto grau de contaminação por efluentes industriais. As amostragens fazem parte de um projeto de monitoramento de qualidade da água por meio de análises físicas e químicas da água e sedimento e ensaios ecotoxicológicos desenvolvido pelo NEEA/CRHEA/SHS/EESC/USP. Uma das metodologias adotadas neste projeto envolve a identificação das causas da toxicidade através da metodologia de avaliação e identificação da toxicidade ou AIT (TIE em inglês) de acordo com os protocolos da USEPA (1991, 1993a, 1993b). Assim, a estratégia foi efetuar a aplicação de SH sempre que as amostras apresentassem toxicidade aguda, avaliando o potencial de detoxificação. Comparando-se as evidências das causas da toxicidade obtidas pelo AIT com os resultados da aplicação de SH, procurou-se discutir sobre as potencialidades e limitações da aplicação das SH's na detoxificação de amostras complexas. Foi analisado um total de cinco amostras durante um período de três anos (2006, 2007 e 2008) e em todas as amostras a dose de SH tropical adotada foi de 10 mgL⁻¹.

Manutenção dos organismos-teste

As espécies *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* foram cultivadas de acordo com as recomendações das normas brasileiras (CETESB, 1991; ABNT 13373, 2005) para organismos em condições tropicais (23°C ± 2, fotoperíodo de 12 horas), em água reconstituída de acordo com as recomendações da ASTM (dureza de 40 a 48mg/L de CaCO₃, pH entre 7,2 a 7,6 e condutividade elétrica na faixa de 160µS/cm). Os organismos foram alimentados com alimento composto (ração de peixe e levedura) de acordo com a recomendação de Fonseca (1997), Rodgher, (1998) e Pamplin, (1999).

Os peixes na fase juvenil (*Danio rerio*) foram adquiridos comercialmente e aclimatados em laboratório por cerca de dez dias antes dos ensaios. Os procedimentos para aclimação seguiram as recomendações da norma ABNT (2003c), utilizando-se meio ASTM (dureza de 40 a 48mg/L de CaCO₃, pH entre 7,2 a 7,6 e condutividade elétrica na faixa de 160µS/cm).

As larvas de *Chironomus xanthus* foram cultivadas em bandejas plásticas cobertas por gaiolas de nylon para a retenção dos organismos adultos. Nessas bandejas foi colocado o sedimento (calcinado em mufla, 500°C, por 2h) e água de manutenção (água destilada mais soluções nutritivas), sendo que o cultivo dos organismos foi mantido sob constante aeração, em sala com temperatura controlada (entre 23 e 25°C) e fotoperíodo de 12 horas. Para a alimentação das larvas de *C. xanthus* foi utilizada uma concentração de 10⁵ células/mL de algas

(clorofícea *P. subcapitata*), apenas no primeiro dia do cultivo, e ração para peixes na proporção de 0,04 mg/mL de água nos demais dias (FONSECA, 1997; PAMPLIM, 1999).

Os ensaios com *Daphnia magna* e *D. longispina* foram desenvolvidos no Laboratório de Ecotoxicologia do IMAR - Universidade de Coimbra (Portugal). Os organismos foram mantidos em béqueres com 1L de água de manutenção com dureza de 200 mg/L de CaCO₃ e pH próximo a 8,0 conforme recomendações da norma ISO 6341:1996. A temperatura de cultivo foi de 20 ± 1°C, com fotoperíodo de 14h:10h (dia:noite). Como alimento foi utilizada cultura de *P. subcapitata* e o extrato orgânico Marinure 25 como fonte de vitaminas (Glenside, Stirling, UK).

Os indivíduos de *Daphnia longispina* foram selecionados de culturas ordenadas por grau de sensibilidade ao cobre. Os clones são originários da seleção de duas populações obtidas no campo: um local referencia (N) e outra originária de local impactado (E). De cada população foram selecionadas 150 linhagens classificadas de acordo com o grau de tolerância ao cobre (LOPES, 2002; LOPES et al, 2004). As linhagens selecionadas para os ensaios agudos foram: N: 22, 31, 35, 37, 91 e 116 e E: 09, 83, 89, 99 e 128.

Exposição dos indivíduos (ensaios toxicidade)

Para os ensaios de toxicidade aguda com *D. similis*, os neonatos com idade de 6 a 24 horas foram expostos por um período de 48 horas. Os ensaios de toxicidade crônica com indivíduos de *C. silvestrii* foram expostos por um período de sete dias com renovações de meio a cada dois dias. Para os ensaios agudos, em cada tratamento foram utilizadas quatro réplicas, com cinco organismos cada. Nos ensaios crônicos foi acompanhada a reprodução de 30 indivíduos, em recipientes isolados, para cada concentração ou tratamento.

Os ensaios agudos envolvendo *D. magna* e *D. longispina* seguiram metodologia semelhante aos ensaios agudos com *D. similis* (48h de exposição, sem alimentação, 20 organismos por tratamento divididos em 4 réplicas), de acordo com as recomendações da norma ISO 6341:1996.

Para os ensaios agudos, durante o período de teste os organismos foram mantidos no escuro e sem alimento em sala com temperatura de 23 ± 2 °C. Após o período de exposição foram contados os organismos imóveis, considerando aqueles que não conseguiram nadar

dentro de um intervalo de 15 segundos, após leve agitação da amostra (ABNT, 2003b). Com os ensaios crônicos a cada troca de solução foi contabilizado o número de crias viáveis (móveis) seguindo os mesmos critérios descritos anteriormente. No início e no final do teste foram feitas medidas das variáveis pH, condutividade iônica e concentração de oxigênio dissolvido, nas amostras e no controle.

Os peixes (*D. rerio*) foram expostos às amostras e mais um controle, com água de cultivo. Para cada amostra, incluindo o controle, foram testadas 3 réplicas, cada uma com 0,5 litros da amostra e 10 por tratamento, mantendo-se a proporção de 1g.litro⁻¹ de indivíduos por réplica. Durante o período de teste, os organismos foram mantidos sem alimento em sala com fotoperíodo e temperatura de 25 ± 2 °C. Após o período de exposição (96 horas), foram contados os organismos mortos. Os testes foram considerados válidos quando a taxa de imobilidade do controle foi igual ou menor que 10%. As recomendações para os testes estão de acordo com ABNT (2003c).

Os ensaios crônicos parciais com *D. rerio* foram conduzidos em aquários de vidro de 4L de capacidade, medindo 30x8.0x12cm (Comprimento x Largura x Altura). Os aquários foram dispostos paralelamente e mantidos sob aeração contínua em sala com fotoperíodo de 16h:8h (dia/noite) a 25°C. O volume das soluções de ensaio foi de 2L e, durante o ensaio, a cada 48h fomos renovados 50% da solução. Os animais foram alimentados diariamente com uma pequena quantidade de ração. Os testes foram desenvolvidos por um período de 10 dias, com meio ASTM preparado e com pH ajustado a cada troca para a faixa de 7,5 de acordo com as recomendações de ABNT (2003c).

Os ensaios crônicos (10 dias, 4º instar) com *C. xanthus* foram realizados seguindo as recomendações das normas OECD/OCDE 219 (2004). Para cada tratamento, três réplicas contendo 15 larvas cada, foram adicionadas em frascos plásticos contendo 400 ml de solução e de 1 a 2 cm de areia de cultivo calcinada e lavada para eliminar as cinzas. Os frascos foram aerados e o cultivo alimentado a cada 48h sob as mesmas condições do cultivo (1ª alimentação suspensão de algas e demais dias ração para peixes). Após 10 dias de ensaio os organismos de 4º instar foram contados e medidos em estereomicroscópio Zeiss Axioscope com resolução de 0,1mm.

Desenho experimental: ensaios mono-específicos

Os ensaios foram organizados de acordo com o esquema apresentado na Tabela I. As faixas de concentração dos xenobióticos adotadas foram definidas de acordo com os critérios descritos na Tabela II. A concentração de Microcistina-LR adotada ($200 \mu\text{g.L}^{-1}$) corresponde a um valor estimado próximo ao encontrado na forma dissolvida em águas naturais (HIROOKA et al, 1999; MATTHIENSEN et al, 2000).

Tabela I: Desenho experimental para os organismos aquáticos. A = ensaios agudos, C = ensaios crônicos, SgA= Ácido húmico Sigma-Aldrich Na-salt e Tr = SH tropical

Espécie	Ensaio	Intoxicantes	Tipo de SH	Faixas de concentração
<i>Daphnia magna</i>	A	Não	SgA e Tr	SgA: 10 a 150 (mg.L^{-1}) Tr: 5 a 100 (mg.L^{-1})
<i>Daphnia longispina</i>	A	Não	SgA e Tr	SgA: 10 a 150 (mg.L^{-1}) Tr: 5 a 100 (mg.L^{-1})
<i>Daphnia similis</i>	A	Cu, Atrazina, amostra do rio, surfactante e runoff	Tr	Tr: 0.3 a 5.0 (mg.L^{-1}) Cu: 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Extran®: 0.005 a 0,05% v/v Runoff: amostra bruta
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	C	Cu,	Tr	Cu: 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Tr: 0.3 a 5.0 (mg.L^{-1})
<i>Danio rerio</i>	A e C	Cd, Cu e Microcistina-LR	Tr	A: Cu =150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ C: mistura Cd+Cu = 7,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cada metal Microcistina: 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Tr: 0.3 a 5.0 (mg.L^{-1})
<i>Chironomus xanthus</i>	C	Cd e Cu	Tr	Cu: 7,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Cd: 7,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Cd+Cu: 7,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cada Tr: 0.3 a 5.0 (mg.L^{-1})

Tabela II: Critérios para definição das concentrações dos xenobióticos. A= ensaios agudos, C= ensaios crônicos e VCs = Valor crônico de sobrevivência (próximo).

Xenobiótico	Espécie	Critério	Referência
Extran®	<i>Daphnia similis</i>	A= EC50(i)	Presente estudo
Cobre	<i>Daphnia similis</i> <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	A e C= Média da EC50	Oliveira-Filho (2004), Novelli (2005)
	<i>Danio rerio</i>	A= EC50 (média)	PAN (2008); USEPA (2008) e Oliveira-Filho (2004)
	<i>Chironomus xanthus</i>	C= EC50 $\times 100^{-1}$	Dornfeld (2006)
	<i>Chironomus xanthus</i>	C= EC50 $\times 100^{-1}$	Dornfeld (2006)
Cádmio	<i>Chironomus xanthus</i>	C= EC50 $\times 100^{-1}$	Dornfeld (2006)
Cobre+Cádmio	<i>Danio rerio</i>	C= VCs para o Cobre	Campagna (2005)
	<i>Chironomus xanthus</i>	C= EC50 $\times 100^{-1}$	Dornfeld (2006)
Microcistina-LR	<i>Danio rerio</i>	C = valor próximo ao real	Matthiensen et al. (2000). Hirooka et al. (1999)

Ensaio de colonização de insetos aquáticos

Para avaliar se a presença de Cu, SH e a mistura de ambos influenciavam na oviposição e sobrevivência de larvas de insetos aquáticos, foram dispostos aleatoriamente potes de polietileno de 400 ml de capacidade (20 cm diâmetro), contendo 150 ml de solução e 10g de substrato (areia para cultivo de *C. xanthus*). Os tratamentos foram similares aos usados nos ensaios de toxicidade aguda de peixes com cobre ($150 \mu\text{g L}^{-1}$), porém com apenas três concentrações de SH (0,3; 1,0 e 5,0). Foram preparadas 4 réplicas para cada tratamento (Controle ASTM, SH pura, SH+Cu e Cu) e dispostas aleatoriamente em uma área aberta às margens da Represa do Broa (Itirapina-SP), porém ao abrigo da chuva. Os experimentos foram conduzidos em fevereiro de 2007, durante um período de 30 dias.

Análise dos dados

Os dados gerados nos ensaios foram submetidos a análises estatísticas de acordo com as recomendações de Newman (1995) e Hoffman et al (2003). Em linhas gerais, os critérios adotados para a seleção dos testes estatísticos foram o desenho experimental, a existência ou não de normalidade na distribuição dos dados e o número de réplicas entre os tratamentos testados.

Proposta de desenvolvimento de software para a estimativa da capacidade de detoxificação e cenários de risco

Os dados de sobrevivência obtidos durante os ensaios foram utilizados para a construção de um modelo linear, onde as variáveis sobrevivência, concentração de SH e concentração de cobre livre foram correlacionadas. O programa foi desenvolvido para agilizar o cálculo da equação linear obtida pela correlação das variáveis Cu-livre (mg L^{-1}), sobrevivência e SH (mg L^{-1}). Os dados da concentração de Cu-livre foram obtidos através do programa BLM (Hydroqual Inc.) e os demais dados são experimentais (Figura 02).

Figura 2 : Esquema geral da adoção de modelos numéricos para a geração de cenários de risco de toxicidade de metais baseando-se nos princípios do BLM.

Resultados

Ensaio de toxicidade aguda e crônica com organismos zooplanctônicos

Os ensaios de toxicidade aguda realizados com *D. magna* e *D. longispina* não revelaram toxicidade aguda (imobilidade) em nenhuma das concentrações testadas, para ambas as SH's utilizadas (SH tropical e SgA humic salt). Mesmo em concentrações mais elevadas (100 mgL⁻¹ SH tropical e 150 mgL⁻¹ SH SgA) não se verificou nenhum efeito em termos de comportamento natatório. Os organismos foram mantidos ainda por um período de exposição extra de 48h, sem trocas, para a observação de reações em função do estresse, contudo também não ocorreram mudanças na imobilidade.

Os testes de toxicidade aguda com SH tropical e *D. similis*, com diferentes concentrações de SH, não apresentaram toxicidade aguda até a concentração de 5,0 mgL⁻¹, não havendo diferença significativa em relação ao controle. Nos ensaios com Cu em diferentes concentrações de SH verificou-se redução significativa da toxicidade (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) em relação ao controle a partir da concentração de 1,0 mgL⁻¹ de SH (Figura 3).

Figura 3: Percentual de sobrevivência de *D. similis* em 25 µgL⁻¹ de Cu em diferentes concentrações de SH. *= diferença significativa em relação ao controle (p<0.05); ns = não significativo.

Com base nos resultados dos ensaios agudos, foram realizados testes de toxicidade crônica com *C. silvestrii*. Apenas a concentração de 5,0 mgL⁻¹ foi testada, sendo a concentração de Cu adotada foi a mesma dos ensaios agudos (25 µgL⁻¹Cu), caracterizando o cenário de maior risco. Não foram obtidas diferenças significativas em relação ao controle (ANOVA, Dunnett, p>0,05) para os tratamentos com SH na presença ou ausência do metal. Desta forma, a SH adotada não causa efeitos deletérios significativos à reprodução quando presente de forma isolada e pode promover a detoxificação do meio quando associada ao Cu (Figura 4).

Figura 4: Número de neonatos de *C. silvestrii* em tratamentos com 5,0 mgL⁻¹ de SH na ausência e presença de 25 µgL⁻¹ de Cu. ns = não significativo (ANOVA, Dunnett).

Os ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* com *runoff* contaminado com atrazina mostraram que a presença das SH's reduziu cerca de 30% da toxicidade do *runoff* quando comparado com o tratamento de SH (Figura 5). O teste não paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para comparar as médias dos tratamentos deste ensaio. Em relação ao controle (Ctr) os tratamentos com a água da represa (Broa) e o runoff controle (Rn Ctr) não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$), denotando ausência de toxicidade. Também em relação ao controle, o tratamento runoff +atrazina (Rn+ATZ) apresentou diferença significativa com o teste estatístico adotado ($p<0,05$) caracterizando toxicidade aguda ao tratamento. O tratamento do runoff contaminado com as SH (Rn+ATZ+SH) não apresentou diferença significativa em relação aos tratamentos não contaminados (Ctr, Broa e Rn Ctr) sendo possível observar o efeito de detoxificação.

Neste ensaio a concentração residual de atrazina não foi avaliada, mas pode-se observar o efeito de outras variáveis na toxicidade. Observa-se que a água da Represa do Lobo, utilizada para simular a chuva, influenciou negativamente na sobrevivência dos organismos e, possivelmente, colaborou para o também discreto efeito do *runoff* controle (Rn Ctr).

Figura 5: Ensaio do efeito da presença de SH tropical na toxicidade do runoff. Ctr= controle, Broa= água da represa, Rn = Runoff, ATZ= Atrazina. * = diferença significativa em relação ao controle e ** = diferença significativa entre os tratamentos assinalados (Mann-Whitney, $p<0,05$).b

Os resultados dos ensaios com as amostras da água de rio podem ser observados na Figura 6. Observa-se que a presença de SH reduziu significativamente ($p < 0.05$ teste-t Student) a toxicidade das amostras avaliadas. Nas Figuras 7 e 8 são apresentadas as correlações não-lineares entre o fator de diluição e imobilidade do organismo teste, verificando-se que na presença de SH a correlação entre imobilidade e fator de diluição é significativa.

Figura 6: Médias e intervalo de confiança (95%) das amostras de rio tratadas com 10mgL^{-1} de SH tropical. As médias são significativamente diferentes pelo teste-t Student ($p < 0.05$).

Figura 7: Curva de correlação não-linear entre fator de diluição e imobilidade de *D. similis* na presença de SH em amostras de água de rio (5 amostras em 3 anos de observação). Correlação significativa ($p < 0.05$).

Figura 8: Curva de correlação não-linear entre fator de diluição e imobilidade de *D. similis* na ausência de SH em amostras de água de rio (5 amostras em 3 anos de observação). Correlação não significativa pelo modelo adotado.

De acordo com as análises de TIE desenvolvidas com estas amostras (BOTTA, comunicação pessoal), existem indícios que a toxicidade de algumas das amostras ambientais seja causada pela presença de surfactantes. Análises químicas indicaram uma concentração de surfactante próxima de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ nas amostras, que acredita-se estar em manifestação tóxica em conjunto com outros agentes. Por este motivo, foram realizados ensaios com um surfactante altamente tóxico em baixas concentrações e de uso amplo. O Extran neutral Merk © apresentou, em ensaios iniciais, uma CE50(i) para *D. similis* próxima a 0,03% (v/v), satisfazendo o requisito de um surfactante altamente tóxico em baixas concentrações.

Os ensaios agudos indicaram que a imobilidade em ausência de SH em uma solução com concentração nominal de 0,05% (v/v) de Extran© é de 95% enquanto na presença de SH (10 mgL^{-1}) a imobilidade reduz para 47%. Desta forma, preliminarmente, constata-se que as SH's utilizadas apresentam reatividade e capacidade de detoxificação em relação aos surfactantes.

Toxicidade aguda e crônica parcial com D. rerio

Os ensaios de toxicidade aguda com *D. rerio* não apresentaram toxicidade quando os organismos foram expostos a SH isolada até a concentração de $5,0 \text{ mgL}^{-1}$, não ocorrendo imobilidade ou comportamento natatório não usual. Nos ensaios com exposição de $150 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ de

Cu, em diferentes concentrações de SH, a presença de SH reduziu significativamente a toxicidade do Cu, avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$) como exposto na Figura 9.

Figura 9: Sobrevivência de *Danio rerio* em 150 µgL⁻¹ de Cu em diferentes concentrações de SH. *= diferença significativa em relação ao controle ($p < 0.05$); ns = não significativo.

Os aspectos biométricos do lote de organismos utilizados nos ensaios crônicos estão apresentados na Tabela III. A correlação massa/comprimento foi adequada aos ensaios ($r = 0,8$; $p < 0.05$), permitindo a análise destes parâmetros nos ensaios crônicos parciais.

Tabela III: Valores de referência para o lote de *D. rerio* utilizado nos ensaios crônicos parciais.

	Comprimento (mm)	Biomassa fresca (g)
Média	16.24	0.0615
Variância	5.14	0.0006
Desvio Padrão	2.27	0.024
Erro Padrão	0.49	0.0052
Corr. Linear (Pearson)	$r = 0,84$ $p < 0,05$	

Os resultados da exposição crônica parcial para metais de *D. rerio* estão apresentados nas Figuras 10 e 11. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para a comparações entre os tratamentos. De modo análogo ao observado nos ensaios agudos, a presença de SH parece exercer um efeito protetor nos organismos. As doses de metal utilizadas causaram um efeito redutor na biomassa dos organismos (cerca de 30%), significativo em relação ao controle (Mann-Whitney, $p < 0,05$). No entanto, foi observado um efeito de ganho de peso significativo

em função da concentração de SH (Mann-Whitney, $p < 0,05$). Tendência semelhante foi observada para o parâmetro crescimento.

Figura 10: Biomassa (g) de *D. rerio* em ensaios de toxicidade crônica parcial com Cd+Cu na presença de SH tropical. * = diferença significativa em relação ao controle e ** = diferença significativa entre os tratamentos assinalados (Mann-Whitney, $p < 0.05$). Me = Cd+Cu, SH = Substância húmica.

Figura 11: Comprimento padrão (mm) de *D. rerio* em ensaios de toxicidade crônica parcial com Cd+Cu na presença de SH tropical. * = diferença significativa em relação ao controle e ** = diferença significativa entre os tratamentos assinalados (Mann-Whitney, $p < 0.05$). Me = Cd+Cu, SH = Substância húmica.

Os dados de exposição crônica parcial na presença de microcistina-LR e SH apresentaram tendência semelhante à exposição crônica com os metais (Figuras 12 e 13). Foram encontradas diferenças significativas entre o controle e os demais tratamentos (microcistina-LR pura e na

mistura Myc+SH). Também foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos contaminados com microcistina-LR pura e os remediados com SH (Mann-Whitney, $p < 0.05$).

Figura 12: Biomassa (g) de *D. rerio* em ensaios de toxicidade crônica parcial com microcistina-LR na presença de SH tropical. * = diferença significativa em relação ao controle e ** = diferença significativa entre os tratamentos assinalados (Mann-Whitney, $p < 0.05$). MyC = Microcistina, SH = Substância húmica.

Figura 13: Comprimento padrão (mm) de *D. rerio* em ensaios de toxicidade crônica parcial com microcistina-LR na presença de SH tropical. * = diferença significativa em relação ao controle e ** = diferença significativa entre os tratamentos assinalados (Mann-Whitney, $p < 0.05$) MyC = Microcistina, SH = Substância húmica.

Ensaios de toxicidade crônica com *C. xanthus*

Os resultados dos ensaios de toxicidade crônica com o inseto aquático *C. xanthus* apresentaram resultados distintos aos obtidos com os organismos planctônicos e peixes. Os ensaios com os metais Cd e Cu separados ($7\mu\text{gL}^{-1}$ de cada um), na presença de diferentes concentrações de SH, não apresentaram diferenças significativas quanto a sobrevivência das larvas em 10 dias de ensaio ($p < 0.05$ ANOVA, Bonferroni), mantendo-se em média 15 larvas de cada réplica vivas ao final do teste. O comprimento médio das larvas também não apresentou diferenças significativas em relação ao controle em todos os tratamentos (Figuras 14 e 15), sendo que desta forma não houve indícios de toxicidade crônica nos ensaios com $7\mu\text{gL}^{-1}$ para os metais Cu e Cd separados.

No entanto, a mistura dos dois metais (Cd+Cu) provavelmente ocasionou um efeito sinérgico agravado pela presença de SH. Na Figura 16, observa-se que contrariamente aos resultados dos metais separados, houve mortalidade significativa das larvas com os metais juntos e, ainda, um provável agravamento desta resposta frente à presença das SH's. Esta tendência também é observada no comprimento médio das larvas (Figura 17). Contudo, ressalva-se que existe a necessidade de maiores estudos para a obtenção de respostas mais conclusivas.

Nas Figuras 18 e 19 estão apresentadas as simulações com o BLM para as condições de cultivo da concentração de metais livres Cd e Cu, respectivamente (separados). Para o Cu, a presença de $5,0\text{ mgL}^{-1}$ SH reduz a valores ínfimos ($0,00002\text{ }\mu\text{gL}^{-1}$) a concentração de metal livre, enquanto para o Cd a presença dos mesmos $5,0\text{ mgL}^{-1}$ SH reduzem a concentração livre para $0,57\text{ }\mu\text{gL}^{-1}$.

Figura 14: Comprimento larval de *C. xanthus* na presença de $7\mu\text{gL}^{-1}$ de Cd em diferentes concentrações de SH.

Figura 15: Comprimento larval de *C. xanthus* na presença de $7\mu\text{gL}^{-1}$ de Cu em diferentes concentrações de SH.

Figura 16: Sobrevivência larval de *C. xanthus* na presença de $7\mu\text{gL}^{-1}$ de Cu e $7\mu\text{gL}^{-1}$ de Cd em diferentes concentrações de SH. * = diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0.05$).

Figura 17: Comprimento larval de *C. xanthus* na presença de 7 μ L⁻¹ de Cu e 7 μ L⁻¹ de Cd em diferentes concentrações de SH. * = diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0.05$).

Figura 18: Concentrações de Cd livre calculadas pelo BLM nas condições de ensaio de *C. xanthus*.

Figura 19: Concentrações de Cd livre calculadas pelo BLM nas condições de ensaio de *C. xanthus*.

Em relação aos efeitos diretos da adição das SH's sobre *C. xanthus*, as Figuras 20 e 21, mostram, respectivamente, a emergência de indivíduos para cada sexo e o total em função dos dias de observação. Para ambos os sexos observou-se uma tendência semelhante: as maiores concentrações de SH promoveram uma precocidade na maturação dos organismos. Este processo é mais visível nos valores totais (Figura 22).

Cerca de 60% dos organismos emergiram na primeira semana dos 15 dias de observação, nas concentrações de 1,0; 3,0 e 5,0 mgL⁻¹ de SH. Nas concentrações menores, incluindo o controle, a tendência é inversa, sendo a primeira semana responsável por cerca de 40% das emergências. Este fato é reforçado pela presença de desovas em algumas réplicas nas concentrações mais elevadas de SH a partir do sétimo dia de observação, indicando maturidade sexual dos indivíduos.

Na Figura 30 são apresentados os dados de proporção sexual, verificando-se uma tendência de aumento do número de fêmeas em relação ao de machos em função do aumento da concentração de SH, contudo, sem significância estatística.

Figura 20: Emergência total de machos (A) e fêmeas (B) de *C. xanthus* em função do tempo (dias de observação) e concentrações de SH (0.0=controle).

Figura 21: Emergência total dos indivíduos em função do tempo (dias de observação) e concentrações de SH (0.0=controle).

Figura 22: Proporção de machos e fêmeas na emergência, em relação ao total de indivíduos por concentrações de SH (0.0=controle).

Aplicação do BLM e proposta de desenvolvimento de software para a estimativa da capacidade de detoxificação e cenários de risco (Detox Meter beta)

Sendo a toxicidade dos metais uma função de sua especiação, modelos como o BLM (Modelo de Ligante Biótico) procuram prever a toxicidade de metais (Cd e Cu) a partir de sua especiação e de constantes de interação com componentes biológicos (DiToro et al, 2001). Desta forma, os dados de sobrevivência obtidos foram correlacionados com a especiação do Cu (Cu livre $\mu\text{g L}^{-1}$) pelo BLM com o intuito de se obter as equações que possibilitassem a previsão da toxicidade. Foram obtidas correlações lineares significativas ($p < 0.05$) para ambos os organismos, cujas equações estão demonstradas na Tabela IV. Os gráficos obtidos podem ser visualizados nas Figuras 23 e 24.

Tabela IV: Equações lineares obtidas da correlação entre a concentração de Cu livre (BLM) e a sobrevivência (%) observada para *D. rerio* e *D. similis*.

	Correlação linear	Equação
<i>D. rerio</i>	$r^2 = 0.6509$; $r = -0.8068$, $p < 0,05$	$y = 104.5371 - 2042.2108x$
<i>D. similis</i>	$r^2 = 0.8399$; $r = -0.9165$, $p < 0,05$	$y = 108.0853 - 28115.7364x$

Figura 23: Correlação entre a concentração de cobre livre em $\mu\text{g L}^{-1}$ (BLM) e a sobrevivência (%) de *D. rerio*.

Figura 24: Correlação entre a concentração de cobre livre em $\mu\text{g L}^{-1}$ (BLM) e a sobrevivência (%) de *D. similis*.

Com o intuito de aumentar a capacidade preditiva dos resultados, foi desenvolvido, com o uso da plataforma LabView 8.5®, um programa que, com base nas equações de correlação entre os valores preditos da concentração de cobre livre (BLM) e o percentual de sobrevivência das espécies avaliadas, estima-se em tempo real a capacidade de detoxificação de uma determinada dose de SH (SH utilizada no presente estudo) frente a concentrações de cobre. A entrada de dados pode ser manual ou através de dispositivos externos de leitura, sendo este último caso bastante útil para automação de processos de tratamento (Figura 25).

Figura 25: Vista geral do *workspace* do programa desenvolvido com base nas equações obtidas.

Discussão

Efeitos diretos da presença das SH nos organismos aquáticos

As SH's não ocasionaram toxicidade aguda para *D. magna* e para *D. longispina* em nenhum de seus clones. No entanto, os efeitos crônicos não foram avaliados, o que limita as discussões e constatações sobre a influencia das SH's sobre este gênero. As quatro hipóteses levantadas neste ensaio não puderam ser observadas para efeitos agudos: a) a existência de efeitos agudos em função das diferentes origens de SH, b) a existência de diferenças congênicas em função da concentração e origem das SH's, c) as diferentes linhagens de *D. longispina* poderiam responder de forma diferenciada em função da concentração das SH's e ao mesmo tempo e) em função das origens de SH's.

Estas hipóteses estavam alicerçadas nos seguintes argumentos: a) de acordo com Meems et al (2004) a espécie *D. magna*, exposta a 100 mgL^{-1} SH naturais, apresenta cerca de 20% de imobilidade em ensaios agudos de 24h e até 30% de imobilidade para SH sintética (HS 1500) nas mesmas condições. Além disto, a resposta enzimática expressa pela atividade da GST indica que esta espécie trata as SH's como um xenobiótico e investe energia para detoxificação. Ou seja, o efeito agudo das SH's sobre esta espécie existe; b) A espécie *D. longispina* é tipicamente de lagos temperados com alto teor de DOC e substâncias húmicas. De acordo com Schwenk et al (2004) esta espécie exhibe preferência congênica para habitats com maior concentração de substâncias húmicas, e este aspecto combinado com outros fatores ambientais

(como cátions e temperatura), são um dos determinantes de nicho. Adicionalmente, acreditava-se que os clones com diferentes sensibilidade a cobre e outros tóxicos exibissem o mesmo comportamento na presença de SH (uma de fonte desconhecida e outra comercial).

Com estes dados, é possível constatar que os efeitos agudos em *D. magna* na presença de altas concentrações de SH (100 mgL^{-1}), como observado em literatura, depende da origem da SH e do meio reacional, como discutido por Meems et al. (2004). De acordo com Gloover et al (2005) a presença de SH pode causar uma disruptura no metabolismo de sódio de *D. magna*, contudo, a fonte de SH e o meio reacional também exercem grande influência neste processo. No entanto, neste último estudo, é reportando que a presença das SH's naturais reduziram o pH de 5,1 para 4,4 em função da concentração e no presente estudo em ambos os tratamentos o pH permaneceu na faixa de 7,8 a 8,0.

Com relação a *D. longispina*, a hipótese das substâncias húmicas causarem erosão genética por efeito agudo da mesma forma que outros contaminantes está descartada. Permanece-se a possibilidade deste processo manifestar-se através de outros efeitos. No entanto, considerando que as SH's podem ser reconhecidas como xenobióticos pelos dafinídios, duas questões adicionais podem ser pautadas: a) a determinação genética da sensibilidade da *D. longispina* pode não ser funcional a certos grupos orgânicos e/ou b) a tolerância para SH pode ser uma característica independente da linhagem de sensibilidade, na possibilidade de ser um atributo competitivo muito importante ao organismo.

Em contraponto, as espécies temperadas em águas duras ($\text{CaCO}_3 \sim 200 \text{ mgL}^{-1}$) e as espécies tropicais em condições de dureza na faixa de 40 mgL^{-1} apresentam uma sensibilidade maior a presença das SH's. Ensaios iniciais (não apresentados aqui) mostraram que *D. similis* não sobrevive nas concentrações de SH tropical acima de $45,0 \text{ mgL}^{-1}$. Muito provavelmente o efeito de seqüestro de Ca seja uma das principais causas, no entanto, na ocasião, a pureza do material húmico estava sob suspeita e os ensaios não puderam ser concluídos.

Para ambas as espécies em condições tropicais (*D. similis* e *C. silvestrii*) a presença de SH proporcionou efeitos benéficos até a concentração de $5,0 \text{ mgL}^{-1}$. Provavelmente um efeito combinado de estabilização de pH, seqüestro de possíveis íons tóxicos e fonte adicional de carbono possam estar envolvidos neste processo. Nas condições de ensaio e cultivo, seguindo as recomendações das normas da ABNT, grande parte dos laboratórios brasileiros não adota uma fonte de carbono suplementar como o Marinure® utilizado nas culturas de *D. magna* e *D.*

longispina neste estudo. A ausência de recomendações específicas é uma das causas da omissão da divulgação ou do desuso deste tipo de suplemento.

Alerta-se para o fato que as SH's, em específico, podem ser excelentes coadjuvantes no crescimento e na reprodução (como mostram as tendências dos dados), no entanto, são necessários mais estudos para verificar a influência das SH's na sensibilidade e na formação do *pool* gênico das culturas.

Os ensaios agudos com peixes também não evidenciaram imobilidade na presença de SH até 5,0 mgL⁻¹. Da mesma forma, a exposição/manutenção por longo tempo (30 dias) de indivíduos sendo mantidos em aquários de 10 L, não evidenciou diferenças significativas do peso e comprimento em relação a um lote sem SH (dados omitidos). Observa-se, porém, que a presença de SH causou uma reação fisiológica interpretada, em alguns casos, como sinal de estresse, que é o excesso de fezes em relação aos peixes não tratados com SH. Esta reação foi observada nos ensaios agudos, no aquário de manutenção com SH e nos tratamentos com concentração de SH mais elevada nos ensaios crônico parcial. Os dados mostram que não houve efeito deletério da presença das SH's, porém este fenômeno pode ser importante para o estabelecimento de diretrizes de estudos futuros.

De acordo com Matsuo (2006) as SH's podem, da mesma forma que apresentado para outros organismos, induzir a respostas semelhantes ao que ocorre a outros xenobióticos. Em ensaios realizados com *Colossoma macropomum* (Tambaqui) com SH's e hidrocarbonetos, ambas as substâncias foram capazes de ativar a CYP1A, responsável por parte do processo de oxidação de compostos planares como os PAH. A atividade desta enzima foi observada, inclusive, no fígado e nas brânquias dos organismos. Em escala bioquímica as SH's podem promover respostas nos organismos semelhantes a presença de intoxicantes, o que explica, em parte, as reações de estresse observadas em *D. rerio*.

De acordo com Steinberg et al. (2007) as SH's também atuam como protetoras e estimuladoras do tempo de vida dos organismos. As SH's podem diretamente colaborar para a sobrevivência dos peixes em condições extremas como pH ácido e baixas concentrações de cálcio. Também desempenham propriedades antiparasíticas. Em outros organismos, como o nematóide *C. elegans*, as SH's podem desempenhar um papel de retardantes do envelhecimento.

A constatação é que, frente à necessidade de maiores estudos sobre estes fenômenos, surgem diversas hipóteses e conceitos para novas pesquisas. Steinberg et al (2007) ressaltam

para o papel das SH's como possíveis agentes anti-envelhecimento, uma vez que certas reações fisiológicas negativas podem, na verdade, não levar a efeitos danosos mas a estimular o sistema de defesa dos organismos, em uma menção aos princípios da *Green Theory of Aging*.

Esta menção da literatura sobre possíveis propriedades antienvelhecimento e sinalizadoras das SH's corrobora, em parte, com os resultados obtidos para a emergência de *C. xanthus*. Duas hipóteses, relacionadas com o estresse, podem ser consideradas para explicar este processo. Um possível mecanismo de sinalização promovido pela SH faz com que o organismo reaja de modo semelhante a um episódio de redução de volume hídrico, onde o aumento da concentração do DOC ocorre com o aumento da evaporação do sistema.

Uma segunda possibilidade é a resposta ao seqüestro de Ca por parte das SH's. A dureza no meio de cultivo e de ensaios é baixa (cerca de 10 a 14 mgL⁻¹), sendo que a presença de concentrações de SH dentro da mesma ordem de grandeza podem competir com os cátions pelos organismos. Em resposta ao estresse ocorre a aceleração do ciclo biológico. Ensaios preliminares, neste estudo, usando turfa bruta como substrato para *C. xanthus*, causaram morte em 100% dos indivíduos em menos de 24 horas, provavelmente devido a uma combinação letal de acidez e seqüestro de Ca. A comparação com dados de campo como tentativa de procurar padrões semelhantes é difícil devido ao grande número de variáveis.

Com relação aos possíveis efeitos na proporção sexual de *C. xanthus*, um processo semelhante foi observado para o peixe *Xiphophorus helleri* por Meinelt et al (2004). Segundo os autores a presença de SH proporcionou um discreto aumento na proporção de fêmeas após a exposição crônica de juvenis desta espécie. Segundo este mesmo autor, as SH's possuem grupos alquilfenóis que são substâncias de reconhecida ação estrogênica e feminilizadora em anfíbios e peixes. Apesar dos processos de diferenciação sexual de insetos serem diferentes aos de vertebrados e dos dados ainda não serem conclusivos, destaca-se mais este processo como perspectivas para futuras ações de pesquisa.

Efeitos da presença das SH's na toxicidade de xenobióticos nos organismos aquáticos

A complexação de metais por ácidos húmicos e a redução de sua toxicidade é um processo extensivamente estudado e tem sido utilizado como base para a compreensão de diversos processos envolvendo a expressão da toxicidade de metais na presença de SH e outras formas de DOC (Nor, 1987; Playle et al, 1993; Steinberg, 2003; MatsuO et al, 2004, Santos et. al 2008).

Em linhas gerais, o sistema Metal+DOC+Cálcio é o responsável pela modulação da expressão tóxica do cobre em organismos aquáticos. De acordo com Meinelt et al (2007) a toxicidade do Cd em peixes é modulada tanto pela presença de DOC (ou HS) quanto pela concentração de Ca. O Ca atua como protetor das brânquias, competindo por sítios de ligação com Cd. Por outro lado, as SH's atuam como quelantes de Cd e Ca, fazendo a expressão da toxicidade ser dependente da concentração de SH e das condições do meio (como pH). O Cu possui um comportamento semelhante, fazendo da presença e da concentração de HS e Ca um dos fatores mais importantes na expressão da toxicidade deste metal (PLAYLE et al, 1993; SCHAMPHELAERE et al, 2004).

Os dados obtidos corroboram as informações contidas em literatura, sendo que o uso de condições semelhantes de dureza e pH nos ensaios permitiu que as tendências de resposta fossem similares. Este fator foi importante para tentar estabelecer o papel da mudança de concentração de SH na toxicidade dos íons cúpricos.

De acordo com Martinez et al (2003) ambos os metais (Cd e Cu) induzem a efeitos subletais nos organismos, como a deformidade. Em um ensaio de multigerações com *C. riparius* com Cu e Pb, Bisthoven (1998) demonstrou que a concentração de 10ppb de Cu pode levar a redução de cerca de 50% das larvas da geração 1, com tendências a extinção da população após 3 gerações.

Desta forma a concentrações de Cu e Cd isoladas seriam capazes de causar efeitos crônicos ou mesmo mortalidade dos organismos. Contudo, efeitos mais severos foram observados apenas na mistura dos dois íons. De acordo com Steinberg (2003) o efeito protetor das SH's frente aos metais não é universal, havendo a possibilidade de efeitos negativos. Segundo Winner (1984), a toxicidade do Cd para *Daphnia magna* aumenta com a presença das SH's devido provavelmente a menor afinidade do Cd pelas SH's (quando comparado ao Cu, por exemplo), ou como citado em Steinberg (2003), aos mecanismos de fotólíticos no complexo SH-metal, que podem aumentar a biodisponibilidade de Cd. Contudo, o aumento da toxicidade do Cd na presença de SH não explica por completo o efeito sinérgico da interação com o Cu. Um provável fator seria a competição dos íons Cu e Cd por sítios de ligação das SH's, de modo que a maior disponibilidade do metal explicaria o aumento da toxicidade da mistura.

Em contraposição aos insetos, não foi evidenciado o efeito sinérgico da presença da mistura de Cd+Cu ao *D. rerio* em ensaio crônico, sendo que aparentemente as SH's promoveram a detoxificação do metal. No entanto, para conclusões satisfatórias, são necessários os

resultados da bioacumulação para verificar se o mesmo mecanismo competitivo observado para os insetos não implica em bioacumulação seletiva para os peixes.

De acordo com Lugowska (2007) a presença da mistura Cd+Cu é potencialmente mais tóxica aos embriões de carpa em relação ao cádmio isolado. Este efeito potencializador também é observado na mistura Cu+Zn em *Oncorhynchus mykiss* (SYVOKIENĖ et al, 2006) e para o *Hirudo verbana* (PETRAUSKIENĖ, 2008). Desta forma, são necessários estudos que avaliem as misturas de contaminantes, mas uma dificuldade prática está na determinação de quais seriam as combinações mais relevantes e quais as proporções de cada um. Provavelmente, para estudos com combinação de variáveis, a metodologia de superfície de resposta (descrita no Capítulo 2 deste estudo) seja uma alternativa metodológica para os futuros estudos envolvendo misturas de toxicantes.

Os xenobióticos e aleloquímicos testados (Extran®, atrazina e microcistina-LR) apresentaram tendências semelhantes de redução de toxicidade. Contudo, opostamente ao cenário com os metais, ainda não é possível utilizar modelos para prever o comportamento tóxico destes compostos.

Com relação à capacidade de detoxificação da microcistina-LR os resultados demonstraram uma forte tendência para a inibição dos efeitos deletérios. Porém, assim como os metais pesados, são necessários dados sobre bioacumulação para discussões mais conclusivas. De acordo com Welker e Steinberg (2000), as SH's tendem a interagir com as microcistina-LR e outras variantes e promover a sua degradação através da fotólise indireta. De acordo com Cazenave et al (2006) a presença de matéria orgânica pode tanto prejudicar quanto auxiliar nos mecanismos de detoxificação da microcistina em embriões de *D. rerio*.

Uma particularidade do presente estudo foi o uso de uma via de exposição teoricamente de menor risco para os peixes, que foi a exposição ao extrato semi-puro dissolvido. Em muitos casos, grande parte da absorção da toxina é efetuada via oral. Contudo, os efeitos da presença de toxinas extracelulares têm de ser mais bem avaliados para uma compreensão mais ampla dos riscos.

O tratamento do *runoff* com a atrazina apresentou uma redução de toxicidade que pode ser atribuída ao efeito combinado da interação entre SH, atrazina e partículas. Como será visto no Capítulo 4 deste estudo, a interação da atrazina com as SH's ocorre em condições muito específicas e de difícil previsão. De acordo com Matin-Neto et al (2001), as substâncias húmicas tendem a aumentar a interação com a atrazina na faixa de pH em torno de 3 a 4 e condições de ensaio tornam o processo de detoxificação limitado.

O efeito de detoxificação das águas do rio contaminado mostrou-se eficiente, porém com um elevado grau de aleatoriedade. Em sistemas abertos não é possível controlar todos os aportes de materiais e por consequência as condições de uma ação de remediação podem ganhar contornos complexos. Além disto, como exposto no Capítulo 2 deste estudo, o uso de SH em corpos de água que sirvam de fonte para abastecimento é desaconselhável devido aos problemas causados em ETA que utilizam cloro. No entanto, apesar das limitações, o uso de SH como metodologia de remediação de águas naturais parece promissor, quando as causas da toxicidade puderem ser devidamente esclarecidas.

O TIE possibilitou a redução das incertezas e auxiliou a elucidar a viabilidade das medidas de remediação. Segundo Hermann et al (1997) as SH's aumentam a fotodegradação do LPC (dodecilpiridínio-cloreto), no entanto, as SH's adotadas no estudo não foram eficazes em relação ao LAS (dodecilbenzeno sulfonato). A interação das SH's com surfactantes catiônicos, como por exemplo DPC, altera a estrutura química das SH's e ao mesmo tempo modificam o destino ambiental destas substâncias (ISHIGURO et al, 2007).

Considerações finais

- As SH's estudadas apresentaram efeitos diretos em alguns dos organismos estudados, como por exemplo na taxa de emergência em *C. xanthus*. Os efeitos diretos podem se apresentar como uma forma de estresse, porém a literatura ainda questiona muitos dos efeitos negativos das SH's.
- A resposta dos organismos estudados a toxicidade do cobre pode ser avaliada através dos modelos existentes, tais como o *BLM*, permitindo inferir com maior grau de certeza quanto ao risco deste metal no ambiente;
- No entanto, para *C. xanthus* a interação entre os metais Cd e Cu apresentou um incremento da toxicidade com a presença das SH's em relação aos metais separados. Este fato pode ser explicado pela menor afinidade do íon Cd as SH's e ao efeito competitivo do Cu na presença das SH's.
- A resposta das substâncias orgânicas pode ocorrer em condições muito específicas, como o caso da atrazina. Algumas medidas de detoxificação só podem ser implementadas após a identificação das possíveis fontes de toxicidade pelo TIE.

Referências

- Bisthoven, L J, . Vermeulen, A Oliver, V. F. (1998). Experimental Induction of Morphological Deformities in *Chironomus riparius* Larvae by Chronic Exposure to Copper and Lead Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 249–256 (1998)
- Cazenave, J, Bistoni, M. A, Zwirnmann, E, Wunderlin, D. A, Wiegand, C. (2006) Attenuating Effects of Natural Organic Matter on Microcystin Toxicity in Zebra Fish (*Danio rerio*) Embryos—Benefits and Costs of Microcystin Detoxication *Environmental Toxicology* DOI 10.1002/tox
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., Santore, R.C., 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. Environ. Toxicol. Chem. 20, 2382–2396.
- Dornfeld, C. B (2004) Utilização de *Chironomus* sp. (díptera, Chironomidae) para avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais. Tese doutorado. EESC-USP. 211p.
- Glover, CN, Pane, E. F, Wood, C.M. (2005) Humic Substances Influence Sodium Metabolism in the Freshwater Crustacean *Daphnia magna* *Physiological and Biochemical Zoology* 78(6):1005–1016. 2005
- Hermann,R, Gerke, J., Ziechmann, W. (1997) Photodegradation of the surfactants Na-dodecylbenzenesulfonate and dodecylpyridinium-chloride as affected by humic substances *Water, Air, & Soil Pollution*. Volume 98, n 1-2, PP. 43-55.
- Hirook, E. Y., Pinotti, M. H. P., Tsutsumi, T., Yoshida, F., Ueno, Y., Survey of Microcystins in water between 1995 and 1996 in Paraná, Brazil using ELISA Natural Toxins v. 7 n3, pp.103-109
- Ishiguro, M, Tan, W, Koopal, L. K. (2007) Binding of cationic surfactants to humic substances *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. n29 pp.306–39
- Lopes, I. (2002) Among and within-populations variability of metal tolerances by Cladocerans. PhD thesis. Univ. Coimbra. Coimbra Portugal.

- Lopes, I., Baird, D. J., Ribeiro, R. (2004) Genetic Determination of Tolerance to Lethal and Sublethal Copper Concentrations in Field Populations of *Daphnia longispina*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, PP. 43–51
- Lugowska K. 2007. The effect of cadmium and cadmium/copper mixture during the embryonic development on deformed common carp larvae, *EJPAU* 10(4), #11. Available Online: <http://www.ejpau.media.pl/volume10/issue4/art-11.html>
- Martin-Neto, L.; Traghetta, D.G., Vaz, C.M.P., Crestana S. Sposito, G. (2001) On the Interaction Mechanisms of Atrazine and Hydroxyatrazine with Humic Substances *J. Environ. Qual.*, vol. 30, march–april, 520–525p.
- Martinez, E. Moore, B.C., Schaumloffel, J., Dasgupta, N. (2003) Morphological abnormalities in *Chironomus tentans* exposed to cadmium and copper spiked sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55 204–212
- Matsuo A.Y.O., Playle R.C., Val A.L. & Wood C.M. (2004) Physiological action of dissolved organic matter in rainbow trout in the presence and absence of copper: sodium uptake kinetics and unidirectional flux rates in hard and softwater. *Aquatic Toxicology*, 70, 63–81.
- Matsuo, A. Y. O., Woodin, B. Reddy, C., Val, A., Stegeman, J., (2006) Humic Substances and Crude Oil Induce Cytochrome P450 1A Expression in the Amazonian Fish Species *Colossoma macropomum* (Tambaqui) *Environ. Sci. Technol.* 40, 2851–2858
- Matthiensen, A., Beattie, K. A., Yunes, J. S., Kaya, K., Codd, G. A. (2000) [d-Leu¹]Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochemistry* 55 pp. 383–387.
- Meems, N. Steinberg, C.E.W., Wiegand, C. (2004) Direct and interacting toxicological effects on the waterflea (*Daphnia magna*) by natural organic matter, synthetic humic substances and cypermethrin *The Science of the Total Environment* 319 pp. 123–136

- Meinelt, T., Playle, R.C., Pietrock, M., Burnison, B.K., Wienke, A., Steinberg, C., 2001. Interaction of cadmium toxicity in embryos and larvae of zebrafish (*Danio rerio*) with calcium and humic substances. *Aquat. Toxicol.* 54, 205–215.
- Nor, Y.M. (1987) Ecotoxicity of Copper to Aquatic Biota a review. *Environmental research* 43, 274-282
- Novelli, A. (2005) Estudo limnológico e ecotoxicológico da água e sedimento do rio do Monjolinho- São Carlos (SP) com ênfase nas substâncias de referência Cadmio e Cobre. Universidade de São Paulo- EESC. Dissertação de mestrado. 212p.
- OECD/OCDE 219 (2004) Sediment-water Chironomid toxicity test using spiked water.
- Oliveira-Filho, E.C., Lopes, R.M. Paumgartten, F.J.R. (2004), Comparative Study on the Susceptibility of Freshwater Species to Copper-Based Pesticides. *Chemosphere* 56(4):369-374
- PAN (2008) Pesticide database.
http://pesticideinfo.org/List_AquireAll.jsp?Species=5156&Effect='Mortality'&offset=350 e
http://pesticideinfo.org/List_AquireAll.jsp?Species=5156&Effect='Mortality'&offset=250
- Petrauskienė, L (2008) Lethal effects of Zn, Cu and their mixture on the medicinal leech (*Hirudo verbana*) *EKologija*. vol. 54. n 2. pp. 77–80
- Playle R.C., Dixon D. & Burnison K. (1993) Copper and cadmium binding to fish gills: modification by dissolved organic carbon and synthetic ligands. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50, 2667–2677.
- Poon, K., Hon-wah Lam, M., Lam, P. K. S., Wong, B.S. F. (2001) Determination Of Microcystins In Cyanobacterial Blooms By Solid-Phase Microextraction–High-Performance Liquid Chromatography. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20. pp. 1648–1655
- Runes, H. (2000) Remediation of Atrazine in Irrigation Runoff by a Constructed Wetland. Oregon State University PhD Thesis.

- Schamphelaere, KAC, Vasconcelos, FM, Tack, FMG, Allen, HE, Janssen, CR. (2004) Effect of dissolved organic matter source on acute copper toxicity to *Daphnia magna*. Environmental toxicology and chemistry, vol. 23, no. 5, pp. 1248–1255.
- Schecher, W.D., McAvoy, D.C., 1991. MINEQL+: A Chemical Equilibrium Program for Personal Computers, Version 3.01. Environmental Research Software, Hallowell, ME, USA.
- Steinberg, CEW, Sturn, A, Kelbel, J. Lee, SK, Hertkon, N, Freitag, D, Kettrup, A (1992) Changes of acute toxicity of organic chemicals to *Daphnia magnanai* in presence of dissolved humic material (DHM). Acta Hydrochim hydrobiol 20:326-332.
- Steinberg CEW (2003): Ecology of Humic Substances in Freshwaters. Determinants from Geochemistry to Ecological Niches. Springer, Berlin. 440p.
- Syvokienė, J, Mickėnienė, L., Svecevičius, G (2006) Acute toxicity of copper-zinc mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and its impact on the bacterial flora of the digestive tract *Acta Zoologica Lituanica*, 16, N 3 pp. 235-240.
- Steinberg, C. E. W, Saul, N., Pietsch, Meinelt, T., Rienau, S., Menzel, R. (2007) Dissolved humic substances facilitate fish life in extreme aquatic environments and have the potential to extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans* *Annals of Environmental Science* Vol 1, pp. 81-90
- Schwenk, K, Junttila, J., Streit, B (2004) Ecological, morphological, and genetic differentiation of *Daphnia* (*Hyalodaphnia*) from the Finnish and Russian subarctic *Limnol. Oceanogr.*, 49(2), pp. 532–539.
- Tipping E (1994) WHAM—a chemical equilibrium model and computer code for waters, sediments, and soils incorporating a discrete site/electrostatic model of ion-binding by humic substances. *Comp Geosci* 20:973–1023
- USEPA (1991) Methods for Aquatic Toxicity Identifications Evaluations. Phase I Toxicity Characterization Procedures. 2ed. EPA/600/6-91/003. 87p.

USEPA (1993a) Methods for Aquatic Toxicity Identifications Evaluations. Phase II Toxicity Identification Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity. EPA/600/R-92/080. 70p.

USEPA (1993b) Methods for Aquatic Toxicity Identifications Evaluations. Phase III Toxicity Confirmation Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity. EPA/600/R-92/081. 40p.

USEPA (2008) Ecotox database. http://cfpub.epa.gov/ecotox/advanced_query.htm

Welker, M., Steinberg, C.E.W. (2000) Rates of Humic Substance Photosensitized Degradation of Microcystin-LR in Natural Waters Environ. Sci. Technol, 34, 3415-3419

Winner, R.W., (1984) The toxicity and bioaccumulation of cadmium and copper as affected by humic acid *Aquatic Toxicology*, 5 v.267 pp. 274-267.

Capítulo 4

Efeitos da presença de ácidos húmicos na toxicidade de Atrazina em organismos aquáticos e de solo: estudo integrado em microcosmos

Resumo

A atrazina é um herbicida da classe das triazinas que interage com as substâncias húmicas em condições dependentes do meio reacional, como pH e cátions. Contudo, muitos mecanismos de interação, especialmente dos derivados da atrazina, ainda permanecem pouco compreendidos. Em linhas gerais, a toxicidade e destino ambiental da atrazina são influenciados pela presença de SH, podendo promover tanto a redução quanto o aumento da toxicidade. O presente estudo visa avaliar os efeitos da presença de SH na toxicidade da atrazina (Atrazerba) em organismos de solo e aquáticos, por meio de ensaios em microcosmos. A partir dos resultados obtidos, verifica-se que a presença de SH nos experimentos com organismos de solo ocasionou uma redução (não significativa) da Atrazerba aos colêmbolos (*Folsomia candida*), não influenciou na toxicidade para as plantas (*Avena sativa*) e pode ter ocasionado um aumento da toxicidade para os oligoquetos (*Eisenia andrei*). Nos experimentos com organismos aquáticos a presença das SH's, em relação à toxicidade da atrazina, não foi evidenciada para *D. magna*, mas foi positiva, embora não significativa, na redução da toxicidade para as algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*).

Palavras-chave: Atrazina, Atrazerba, Ácidos húmicos, ARE Integrado solo-água, microcosmos

Introdução

Grande parte dos agrotóxicos utilizados em larga escala na agricultura interfere no meio ambiente de forma severa, muito em função de sua natureza química não agir de modo específico contra os organismos indesejáveis nas culturas, também conhecido como *non-target effect*. Estes efeitos são extensivos, em diversos graus de ação, a todos os organismos presentes no sistema, incluindo seres humanos. Devido aos avanços tecnológicos, a tendência é o abandono de certos produtos (ou processos) em função de diversos fatores como avanço tecnológico, riscos ambientais incompatíveis com o benefício, custo de matéria prima, etc.

Em síntese, considerando os atuais cenários, um defensivo agrícola de larga aplicação hoje tende a sair do mercado na escala de anos em função de diversos fatores, incluindo o risco ambiental. No entanto, os seus resíduos podem persistir por muitos anos nos sistemas, fazendo-se necessária, em muitos casos, a tomada de medidas corretivas para descontaminação. Para a atrazina, a “lista holandesa” (como é chamada a lista de valores de referência para proteção do solo do governo holandês), atribui um valor de intervenção de cerca de 6 mg/Kg de solo seco (Holanda, 1987). Esta mesma lista de referência é adotada na União Européia e em países como o Brasil (CETESB, 2005).

Entre vários pesticidas comumente utilizados está a atrazina, que é um herbicida da classe das triazinas registrado em 1958 pela Ciba-Geigy (atualmente Novartis) como herbicida destinado ao controle de pragas para plantações de milho. Atualmente, sua comercialização movimenta um mercado mundial estimado em mais de 400 milhões de dólares, sendo um dos herbicidas mais adotados no mundo (Brown, 2006). Segundo este mesmo autor, a rota de síntese da atrazina desenvolvida por Pearlman e Banks (1948) permanece pouco alterada. Sem dúvida, é um dos insumos agrícolas de maior êxito de mercado e parcialmente responsável por grandes desempenhos de produtividade agrícola em todo o mundo.

No entanto, este herbicida é reportado como *unfriendly* (“não amigável”) e as pesquisas sobre os seus efeitos ambientais continuam no sentido de estabelecer mecanismos de regulação de uso e descontaminação. Cerca de oito países até 2008 baniram ou restringiram o uso da atrazina na União Européia e na África (PAN, 2008). A União Européia possui diretivas para tentar banir o uso deste herbicida em todos os países membros e nos EUA o uso é controlado em diversas regiões do país. Contudo, o uso ainda é permitido em outras partes do mundo.

A atrazina é classificada como moderadamente persistente, com meia-vida estimada para solos de algumas semanas a meses, sendo classificada como inibidor da fotossíntese (RADOSEVICH et al., 1994; MANDELBAUM et al., 1995). Entretanto, seus derivados podem exceder 170 dias em aquíferos (VAN ZWIETEN, 1995). Em ambientes aquáticos a concentração de atrazina não é constante e geralmente os picos coincidem com as estações chuvosas (THURMAN et al, 1996; TASLI et al, 1996). Desta forma, o *run off* é uma das principais causas de contaminação dos corpos de água pela atrazina. Na Tabela I estão sintetizadas algumas informações sobre a molécula da atrazina.

Tabela I: Principais propriedades químicas da Atrazina (Roberts, 1998)

Estrutura	pKa	Solubility (mgL ⁻¹)	Log K _{ow}	Pressão de vapor (mPa)	Constante de Henry (Pa.m ⁻³ mol.L ⁻¹)
1.68	33	2.5	0.039	2.48 X 10 ⁻⁴

A atrazina interage com as substâncias húmicas em condições dependentes do meio reacional como pH (Martin-Neto, 2001). Contudo, muitos processos de interação, especialmente dos derivados da atrazina, ainda permanecem pouco compreendidos. Em linhas gerais, a toxicidade e destino ambiental da atrazina é influenciado pela presença de SH (Khan et al, 1987), podendo o HS promover tanto a redução (Kulikova et al, 2005) quanto o aumento da toxicidade (Isakeit et al, 1989).

Estudos demonstram que a presença de SH e o pH são fatores que influenciam nas taxas de degradação da atrazina e seus derivados. Segundo Martin-Neto (2001) a atrazina e as SH's possuem maior afinidade em uma faixa de pH próxima a 3,0 com tendência de menor interação em faixas acima de 6,0. Provavelmente esta seja uma das possíveis explicações para a persistência de atrazina e simazina por mais de 100 dias em águas contendo 10 mgL⁻¹ de SH em pH na faixa de 7,0 a 9,0 (Comber, 1999) e 43 dias em diferentes águas naturais com cerca de 35 mgL⁻¹ de SH e pH próximo a 8,0 (Noblet et al, 1996).

No entanto, em muitos ambientes aquáticos e terrestres, as melhores condições para a manutenção dos organismos encontram-se na faixa de pH entre 5,0 e 8,0, o que prejudicaria a interação das SH's com a atrazina. Porém, esta mesma faixa pode ser favorável à colonização de microorganismos edáficos e aquáticos envolvidos na biodegradação da atrazina, tais como as espécies de bactérias *Nocardia*, *Pseudomonas* e *Rhodococcus* (Runes, 2000).

Diversos produtos agrícolas com base em substâncias húmicas têm sido comercializados principalmente como fertilizantes foliares e corretivos de solo. Devido a maior estabilidade química e solubilidade, a indústria produz as SH's na forma de humatos (de sódio ou potássio) em diferentes formulações em função da aplicação. Devido à natureza das SH's, as formulações ácidas geralmente tendem a ser pouco solúveis e em fase aquosa precipitam-se.

Os maiores produtores mundiais de produtos húmicos, segundo levantamento da New AG International, são os USA, China, Alemanha e Rússia, com produtos derivados da manufatura

da Leonardita (*Leonardite*). Grande parte destes produtos são estimulantes de crescimento vegetal e fertilizantes. O uso agrícola é uma das grandes apostas da indústria mundial do setor, sendo que existe um esforço para uma melhor classificação e padronização das fontes e dos produtos húmicos. No entanto, o estabelecimento de um mercado globalizado parecer ser uma tendência. Uma das razões para necessidade de uma classificação dos produtos e da origem está na funcionalidade dos mesmos. De acordo com Steinberg (2003) a estrutura e funcionalidade das SH's estão diretamente relacionadas ao ambiente de sua formação, como as condições climáticas, fontes de matéria orgânica, tempo, pressão, litologia, etc. Logo, a origem das SH's podem influenciar na sua reatividade e dinâmica ambiental.

Baseando-se nestas informações, obtém-se o seguinte cenário: a) existe a necessidade de desenvolvimento de tecnologias eficientes e seguras de descontaminação de áreas por atrazina; b) é reconhecido que as SH's podem auxiliar na degradação deste herbicida em condições naturais e laboratoriais; c) grande parte dos produtos húmicos disponíveis no mercado são de origem diversificada e na forma de humatos; d) são necessárias metodologias que avaliem de forma integrada os efeitos da exposição da atrazina e de suas tecnologias de remediação.

Neste sentido, os estudos com microcosmos vêm a agregar complexidade e maior realismo na investigação dos efeitos tóxicos das substâncias, bem como das tecnologias de remediação, mas, apesar de sua importância, poucos estudos são voltados para a compreensão dos processos ecotoxicológicos de forma integrada no sistema solo-água. A metodologia descrita nesta pesquisa visa estimular a adoção de uma técnica simples para a avaliação de risco integrado.

Assim, o presente estudo procurou avaliar os efeitos da presença de SH's, na forma de humato de sódio, na toxicidade de organismos de solo e aquáticos, através de ensaios em microcosmos, procurando-se propor o desenvolvimento de métodos integrados para avaliação da toxicidade como forma de aperfeiçoar a análise de risco.

Material e Métodos

Fontes de substâncias húmicas (SH) e atrazina

A fonte de SH utilizada foi o humic salt, da Sigma-Aldrich, como fonte de SH. Este sal húmico não possui fonte de extração referenciada pelo fabricante e representa uma formulação semelhante a utilizada para fins comerciais.

Como fonte de Atrazina (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) foi utilizada uma formulação comercial (Atrazerba- Sapec Agro em Portugal; no Brasil o semelhante comercial é Gesaprim 500 Ciba-Geigy), com a finalidade de aumentar o realismo dos ensaios. Ressalta-se que ensaios deste tipo necessitam do uso dos formulados comerciais, procurando simular condições semelhantes as que serão encontradas em processos de descontaminação de campo.

Microcosmos de solo

O solo foi obtido de uma área sem atividade agrícola recente da Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC), em Coimbra, Portugal, que segundo a administração da instituição, sem histórico de uso de Atrazina e outros pesticidas no local indicado para amostragem. As amostras foram levadas para o laboratório, peneiradas em malha de 2mm e desfaunada com congelamento a -30°C por 72h (Bruckner, et al 1995). Depois de homogeneizado, foram retiradas amostras para leituras de pH e umidade (ISO 10390:1994). O solo foi então acondicionado dentro dos microcosmos (16 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro), como apresentado na Figura 01. O sistema foi desenvolvido para permitir recolher amostras de água de lixiviação para ensaios ecotoxicológicos e simular um cenário de risco para avaliação integrada solo-água (Figura 02).

Nos microcosmos foram desenvolvidas duas modalidades de ensaios: a) toxicidade da atrazerba e b) redução de toxicidade através de aplicação de Ácidos Húmicos Sigma-Aldrich (SH), cuja eficiência foi estabelecida através de medidas de parâmetros individuais e populacionais. Foram utilizadas duas doses de aplicação de Atrazerba (Atrazina, Atz): 10 vezes a dose recomendada pelo fabricante (20L/ha) e 20 vezes a dose recomendada (40L/ha). Estima-se que estas taxas de aplicação correspondam a valores realísticos de aplicação de herbicidas. A dose de SH adotada foi de 10mg de SH por microcosmo, o que representa uma dose de aplicação de aproximadamente 51 kg/ha. Ensaios iniciais mostram que até esta taxa de aplicação de SH não ocorre mudanças significativas do pH do solo, e portanto, não tenderiam a prejudicar os resultados do ensaio em relação ao controle.

Os organismos utilizados para o ensaio com os microcosmos de solo foram *Folsomia cândida* (Collembola), *Eisenia andrei* (Oligochaeta) e *Avena sativa* (Aveia). O cultivo, teste de

sensibilidade e procedimentos de ensaio foram desenvolvidos segundo as recomendações das normas ISO 11268-1:1993, ISO 11267:1999 e ISO 22030:2005. Os organismos *E. andreei* estavam todos com clíelo bem desenvolvido e antes da exposição permaneceram em potes com areia de cultivo por 48h para eliminação do conteúdo intestinal. As sementes de *A. sativa* foram obtidas comercialmente, sendo selecionadas para os ensaios aquelas que não possuíam deformidades ou fungos. Os indivíduos de *F. cândida* foram selecionados das culturas sincronizadas com cerca de 10 a 12 dias de idade.

Figura 01: Microcosmos utilizados para avaliação integrada da toxicidade e remediação de Atrazina em água e solo. Na figura da direita, notar as bainhas de celofane utilizadas para sustentar o crescimento das plantas.

Figura 2: Esquema conceitual dos microcosmos utilizados para avaliação integrada da toxicidade e remediação de Atrazina em água e solo.

Bioensaios monoespecíficos com organismos aquáticos

Os ensaios monoespecíficos foram realizados com os lixiviados e elutriados a fim de avaliar o risco do processo para os organismos aquáticos. Os organismos-teste selecionados para o experimento foram: *Pseudokirchneriella subcapitata* (fitoplâncton) e *Daphnia magna* (zooplâncton). Os ensaios seguiram as recomendações das normas ISO 8692:2000 e ISO 6341:1996.

Os lixiviados foram obtidos através da coleta direta dos percolados dos microcosmos. As amostras foram preservadas sob refrigeração até o seu uso. Via de regra cerca de 1,5 a 3,5 ml de lixiviado eram coletados por dia de cada microcosmo, geralmente após as regas. O solo foi pesado e elutriado na proporção de 1:10 (m/v), ou seja, 100 g de solo para 1000 ml de meio ASTM. Os elutriados foram preparados com meio ASTM hard water (ISO 8692:1969) para os ensaios com *D. magna* ou água ultrapurificada, através de um sistema de ultrapurificação Mili-Q (Millipore®) para os ensaios com *Pseudokirchneriella subcapitata* e mantidos sob agitação constante por 12h. Após a agitação, todos foram centrifugados duas vezes a 1500 rpm.

As algas unicelulares de *Pseudokirchneriella subcapitata* (clorofícea) foram mantidas em meio de cultura semi-sólido (ISO 8692:2000), sendo que na ocasião da realização dos testes, uma parcela foi transferida para erlenmeyers contendo meio de cultura em solução (meio ISSO 8692: 2000), onde permaneceram em sala sob iluminação constante até atingirem a fase de crescimento exponencial. Nesta fase, as células estão em condições de serem usadas para os testes. Após este período, uma alíquota 10 ml foi centrifugada (1000 rpm) e ressuspensa em meio de cultivo e utilizada para as inoculações. As amostras contendo 3ml de lixiviado ou elutriado foram incubadas em placas (Figura 3), sob iluminação constante (lâmpadas fluorescentes, 60W) por 3 dias. As leituras foram realizadas no início e no fim dos ensaios e os resultados expressos em taxa de crescimento diário.

Os indivíduos de *Daphnia magna* foram mantidos em béqueres com 1L de água de manutenção com dureza de 200 mg/L de CaCO₃ e pH próximo a 8,0 conforme as recomendações da norma ISO 6341:1996.

Figura 3: *Microplate ou plate method* utilizado para avaliação da toxicidade com *Pseudokirchneriella subcapitata*. Cada poço (3,5 ml) representa uma replica.

Desenho experimental

Os microcosmos foram montados todos em um único dia e os 30 indivíduos de *F. cândida* foram inoculados logo em seguida. Cerca de 24h depois foram expostos os indivíduos da espécie *E. andreii* e no dia seguinte foram inoculadas a solução de Atrazerba e de SH, em experimento específico. As sementes de *A. sativa* foram introduzidas cinco dias depois do início dos ensaios. Os tubos selecionados para os ensaios com elutriatos foram retirados seis dias após o início dos testes. Os ensaios com organismos de solo foram encerrados 45 dias após a exposição. Os lixiviados foram recolhidos nos primeiros cinco dias. As perdas diárias de umidade foram ajustadas por pesagens diárias e reposição do volume com solução de chuva artificial (fonte de nitratos). Os microcosmos foram incubados em uma câmara de germinação Climapplus V, com temperatura de 20 ± 0.5 °C, umidade relativa de 70%, CO₂ 0.0 ppm e radiação branca de 60%. Ambas as modalidades de ensaio (toxicidade da Atrazerba e interação com SH) foram desenvolvidas sob as mesmas condições. Como fonte de nutrientes para *E. andreii* foi utilizado esterco seco triturado. A seqüência de procedimentos com o intervalo de dias adotado entre cada evento está exposta na Tabela II.

Tabela II: Seqüência de eventos durante os ensaios com microcosmos

Dias	Atividade
Pré-requisitos	Manutenção de culturas de <i>E. andreii</i> e <i>F. candida</i>
-6	Amostragem, peneiramento e congelamento (desfauna) do solo
-3	Descongelamento do solo; aclimação da <i>E. andreii</i>
-1	Correção de umidade e montagem dos microcosmos. Inoculação dos organismos (<i>E. andreii</i> e <i>F. cândida</i>)
0	Adição da solução de Atrazerba, SH e Atrazerba+SH
3	Ensaio com lixiviados
6	Ensaio com elutriados; alimentação com esterco
6	Plantio de <i>A. sativa</i>
16	Colheita de <i>A. sativa</i> (> 70% de nascimento do controle)
25	Alimentação com esterco
45	Fim do ensaio (pesagem de <i>E. andreii</i> e contagem de <i>F. cândida</i>)

Análise dos dados

Os resultados obtidos sobre a toxicidade da Atrazerba foram comparados com os resultados da interação com SH, como forma de avaliar o efeito da toxicidade da atrazina com os ácidos húmicos. Adicionalmente, o efeito das duas doses de aplicação (10x a DR e 20x a dose recomendada, “DR”) também foi avaliado.

Os dados gerados nos ensaios foram submetidos a análises estatísticas de acordo com as recomendações de Newman (1995) e Hoffman et al (2003). Em linhas gerais, os critérios adotados para a seleção dos testes estatísticos foram o desenho experimental, a existência ou não de normalidade na distribuição dos dados e o número de réplicas entre os tratamentos testados.

Resultados

Organismos de solo

O total de indivíduos de *Folsomia cândida* obtido ao final dos ensaios está apresentado na Figura 4. O tratamento com SH nos sistemas contaminados proporcionou um aumento entre 33 e 35% no número de indivíduos em relação aos tratamentos não remediados. Através do

teste Kruskal-Wallis não foram encontradas diferenças significativas entre o controle e as amostras tratadas com SH.

Figura 4: número de indivíduos de *Folsomia candida* obtidos ao final dos ensaios em microcosmos com diferentes tratamentos. Ctr= Controle, SH= Somente SH; 10x Atz = 10 vezes a dose recomendada do herbicida; 20x Atz = 20 vezes a dose recomendada do herbicida; 10xAtz+SH e 20x Atz+SH = 10 ou 20 vezes a dose recomendada, com aplicação de SH.

O comprimento médio da parte aérea de *Avena sativa* nos tratamentos variou entre 18 e 40 cm (Figura 5), verificando-se um crescimento maior nos indivíduos tratados com SH em relação ao controle, contudo não houve diferença significativa pelo teste Kruskal-Wallis ($P > 0.05$). A aplicação do herbicida mostrou-se significativamente tóxica em todos os tratamentos em relação ao controle (Kruskal-Wallis $p < 0.05$), inclusive nos microcosmos com SH. Desta forma, não foi observado efeito de remediação da atrazina para *A. ativa*, uma vez que, com exceção do controle e do tratamento com SH, as demais não sobreviveram. Como houve morte dos organismos os dados de biomassa seca não foram considerados.

Figura 5: Comprimento médio de *Avena sativa* obtido ao final dos ensaios em microcosmos com diferentes tratamentos. Ctr= Controle, SH= Somente SH; 10x Atz = 10 vezes a dose recomendada do herbicida; 20x Atz = 20 vezes a dose recomendada do herbicida; 10xAtz+SH e 20x Atz+SH = 10 ou 20 vezes a dose recomendada, com aplicação de SH.

As perdas de biomassa (Figura 6) de *E. andrei* evidenciaram a toxicidade ao herbicida, sendo significativa na concentração 20x DR ($p < 0,05$, Wilcoxon test), não sendo observado efeito significativo no tratamento 10xDR. O tratamento com sH isolada demonstrou ser significativamente benéfico aos organismos ($p < 0,05$, Wilcoxon test). Nos tratamentos Atz 10x SH e Atz 20x SH houve uma significativa perda de biomassa em relação ao tratamento somente com SH, evidenciando um possível efeito de aumento da toxicidade ($p < 0,05$, Wilcoxon test). Em relação ao número de casulos e juvenis, não houve relação de dose-reposta e, desta forma, os dados não foram considerados.

FIGURA 5: Perda absoluta de biomassa de *E. andreii* nos microcosmos em diferentes tratamentos. Ctr= Controle, SH= Somente SH; 10x Atz = 10 vezes a dose recomendada do herbicida; 20x Atz = 20 vezes a dose recomendada do herbicida; 10x 10xAtz+SH e 20x Atz+SH = 10 ou 20 vezes a dose recomendada, com aplicação de SH. * = diferença significativa em relação ao controle; ** = diferença significativa em relação ao tratamento com SH (Wilcoxon test, $p < 0,05$).

Em linhas gerais, a presença de SH ocasionou uma redução (porém não significativa) da Atrazerba aos colêmbolos (*F. candida*), não influenciou na toxicidade para as plantas (*Avena sativa*) e pode ter ocasionado um aumento da toxicidade para os oligoquetos (*E. andreii*). A variabilidade das respostas em relação às duas taxas de aplicação da Atrazerba pode estar relacionada a processos dependentes de concentração dos ácidos húmicos na expressão da toxicidade.

Organismos aquáticos

Na Figura 6, estão representadas as taxas de crescimento populacional de *Pseudokirchneriella subcapitata* obtidas a partir dos experimentos com o lixiviado. O crescimento foi afetado significativamente ($p < 0.05$) pela presença do herbicida em ambas as doses de aplicação (10 e 20 vezes a dose recomendada), mas a presença das SH's não promoveram reduções na toxicidade (sem diferenças significativas em relação ao controle). Nos tratamentos contaminados a adição de SH favoreceu o crescimento algal (aumento de 22,1 e 61.5 % nos experimentos com 10 e 20 vezes a dose recomendada, respectivamente), contudo, sem diferença significativa em relação ao controle (ANOVA, $p < 0,05$).

Figura 6: Taxa de crescimento de *Pseudokirchneriella subcapitata* nos lixiviados obtidos dos microcosmos em diferentes tratamentos. Ctr= Controle, SH= Somente SH; 10x Atz = 10 vezes a dose recomendada do herbicida; 20x Atz = 20 vezes a dose recomendada do herbicida; 10xAtz+SH e 20x Atz+SH = 10 ou 20 vezes a dose recomendada, com aplicação de SH. * = diferenças significativas em relação ao controle (ANOVA, $p < 0,05$).

Os resultados dos ensaios com os elutriados utilizando as algas como organismo-teste mostraram tendências semelhantes aos dos lixiviados (Figura 7), verificando-se toxicidade em ambas as doses de aplicação ($p < 0,05$). A aplicação somente de SH promoveu um crescimento significativo ($p < 0,05$) das algas em relação ao controle e um aumento de 16,3 e 55,3% foi registrado nos ensaios com 10 e 20 vezes a dose recomendada, contudo, sem diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

A Atrazina, por ser um herbicida, manifesta-se de forma bastante acentuada em organismos aquáticos. Em ambos os ensaios (lixiviados e elutriados) a toxicidade foi significativa, porém não foi verificada a redução da toxicidade na presença da SH. Este fato pode estar relacionado a fatores que envolvem as condições da interação Atrazina *versus* Substância Húmica, bem como a concentração de HS no meio de teste, que pode ter interferido nos resultados, uma vez que foi testada apenas uma única concentração de SH.

Figura 7: Taxa de crescimento de *Pseudokercheneriella subcapitata* nos elutriados obtidos dos microcosmos em diferentes tratamentos. Ctr= Controle, SH= Somente SH; 10x Atz = 10 vezes a dose recomendada do herbicida; 20x Atz = 20 vezes a dose recomendada do herbicida; 10xAtz+SH e 20x Atz+SH = 10 ou 20 vezes a dose recomendada, com aplicação de SH. * = diferenças significativas em relação ao controle (ANOVA, $p < 0,05$).

Os ensaios com *Daphnia magna* foram realizados com elutriados recolhidos com 5 e 10 dias de incubação. Na Figura 08, estão representados os dados para os ensaios com 5 dias de incubação. Não foi detectada toxicidade da atrazina (Atrazerva) para ambas as doses aplicadas, em relação ao controle (teste Kruskal-Wallis). Por este motivo, também não pode ser avaliado com acurácia os efeitos das SH'S na toxicidade da atrazina.

Figura 8: Número médio de juvenis no 1º dia de reprodução de *Daphnia magna* nos elutrios de 5 dias obtidos Nos microcosmos em diferentes tratamentos. Ctr= Controle, SH= Somente SH; 10x Atz = 10 vezes a dose recomendada do herbicida; 20x Atz = 20 vezes a dose recomendada do herbicida; 10x e 20x Atz+SH = 10 ou 20 vezes a dose recomendada, com aplicação de SH.

Discussão

Efeito da adição das substâncias húmicas (humato de sódio Aldrich) sobre os organismos

De acordo com Ponge et al. (2002) a combinação de solos húmicos e herbicidas pode, em alguns casos, aumentar a diversidade de colêmbolos. Este processo pode estar relacionado à afinidade com solos húmicos de algumas espécies de colêmbolos ou por processo de detoxificação. Desta forma, seria possível afirmar que a presença das SH's não influi ou tende a favorecer o crescimento destes organismos. Uma das possíveis explicações é o seqüestro de toxinas e excretas dos colêmbolos pelas SH's. A espécie utilizada nos ensaios (*F. candida*) é cultivada em placas de gesso que contém carvão ativado em sua composição, com o intuito de auxiliar na detoxificação do meio.

Contudo, alguns problemas experimentais foram observados, como a perda de indivíduos. O microcosmo utilizado foi desenhado para permitir a lixiviação do solo e o recolhimento do respectivo percolado. No entanto, provavelmente, o efeito físico causado pelos oligoquetos associado a porosidade do solo, possibilitaram a fuga de alguns indivíduos, dificultando a sua contagem. Por este motivo, recomenda-se o uso de espécies de oligoquetos de menor porte físico, como *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae).

As plantas, em geral, tendem a aumentar o seu crescimento e germinação com a presença das SH's (Kulikova et al, 2005), uma vez que estas desempenham diversas funções no ambiente favoráveis as plantas. Os dados mostram que a presença das SH's estimulou (não estatisticamente significativo) o crescimento de *A. sativa*, indicando a não toxicidade do composto de humato ao desenvolvimento das plantas.

O mesmo efeito benéfico foi observado para *E. andreii*, pois as perdas médias de biomassa nos tratamentos com SH (humato) foram cerca de 30% menores em relação ao controle. É reconhecido em literatura que os oligoquetos auxiliam na humificação e apesar das menores perdas de biomassa, não foram observadas diferenças significativas na reprodução, expressa pelo número médio de juvenis por microcosmo (Ctr= 2,4 ind. 3 Ctr+SH= 1,8 ind.). No entanto, estes dados não comprovam que a aplicação de humato traz benefícios à população de oligoquetos, pois o efeito na reprodução dos organismos não foi conclusivo.

Para os organismos aquáticos, nos ensaios com as algas, como demonstrado no Capítulo 2 do presente estudo, a presença isolada de HS pode acarretar toxicidade. Contudo, os resultados mostram que a dose de SH utilizada não interferiu significativamente no crescimento dos organismos. Nos ensaios com elutriatos, a taxa de crescimento celular foi 15% maior em relação ao controle, indicando uma tendência de favorecimento ao crescimento celular. No entanto, não foi possível mensurar a concentração de SH remanescente nos lixiviados e nos elutriatos, o que limita as possibilidades de explicação dos efeitos em função da concentração de SH.

Em relação à metodologia adotada, o uso de lixiviados nos estudos implica na dificuldade prática da sua coleta em função do *design* do microcosmo utilizado. No presente estudo, a dinâmica do microsistema favorecia a percolação e o lixiviado era recolhido em um recipiente externo, onde permanecia estocado até a coleta. A produção de lixiviados era variável em cada réplica, devido às perdas por evaporação e retenção no solo. A maior lixiviação ocorria durante as regas com chuva artificial para correção de umidade, onde cerca de 3,5 ml de chuva era aplicada nos microcosmos a cada dois dias. O baixo volume produzido dificultava a coleta de amostras homogêneas e sincronizadas no tempo para todos os tratamentos e impossibilitava a tomada de amostras para análises da concentração de atrazina. Recomenda-se a adoção de sistemas de coleta de lixiviado em seringas, caso este tipo de amostra seja desejável para os estudos.

Em relação a *D. magna* a presença das SH's resultou em uma fecundidade 40% superior ao controle. Este processo pode estar relacionado à ação protetora das SH's contra os toxicantes. Este mecanismo protetor pode ocorrer externamente com a complexação de íons metálicos (DI TORO, 2001) e outras substâncias, ou internamente, pelo favorecimento do influxo de sódio para o interior dos organismos e conseqüente aumento da capacidade osmoregulatória dos mesmos. Segundo Glover (2005), as SH's podem, dependendo da origem, associar-se as membranas de *D. magna* e favorecer a entrada de íons sódio para o interior do organismo. Esta assimilação possibilitaria uma menor toxicidade dos íons metálicos dentro dos organismos, considerando uma assimilação de metais não competitiva.

Efeitos na toxicidade da atrazina (Atrazerba®)

Anisimova et al (1998) avaliaram a redução da toxicidade da atrazina (doses de 0.5 a 2.0 mg/Kg) em diferentes tipos de solo e constataram que as plantas e algas são menos afetadas quando a concentração de SH for maior e o pH for menor. No referido estudo, a maior taxa de detoxificação da atrazina encontrada variou entre 10 e 60% e os solos com maior percentual de detoxificação apresentavam pH (em KCl) da ordem de 7,2 e 5,5, porém em alto teor de SH.

Este estudo mostra que a variabilidade de respostas toxicológicas da interação da atrazina com SH depende de fatores relacionados ao meio reacional do solo. Uma das possíveis causas talvez possa ser o pH dos solos utilizados nos ensaios, cuja leituras, mesmo com as doses de SH's, ficaram em torno de 6,8. De acordo com Matin-Neto et al (2001), as substâncias húmicas tendem a aumentar a interação com a atrazina na faixa de pH em torno de 3 a 4. Desta forma, nas condições de ensaio, as condições do meio reacional tornam o processo de detoxificação limitado.

De acordo com Nikkila (2001) a atrazina tende, ao contrário de outros compostos como o BAP (Benzo (A) pireno), a não apresentar para *D. magna* uma relação clara entre a presença de SH e a toxicidade da atrazina. Este processo também poderia ser explicado pela dificuldade de interação entre a Atz e as SH's no meio reacional utilizado (meio ASTM *hard water*). Steinberg (2003) menciona que existe uma tendência para as SH's favorecerem a sobrevivência de *D. magna*, sendo este mecanismo positivamente relacionado com a concentração. No entanto, maiores conclusões só serão possíveis com estudos mais específicos e com diferentes tipos de SH.

Em oposição aos resultados com redução da toxicidade, estudos têm mostrado efeitos negativos da combinação de triazinas e SH sobre os organismos. De acordo com Lorenz et al. (1996), a presença das SH's aumentou o efeito tóxico da Terbutilazina (TBA, 2-chlor-4-tert-butylamino-6-ethylamino-s-triazine) em *D. rerio*. O TBA isolado ocasionou uma resposta comportamental menos estressante que a combinação entre TBA+SH. No entanto, para o parâmetro mortalidade as SH's promoveram um efeito reparador.

Esta pode ser uma possível explicação para os efeitos sinérgicos da presença das SH's na toxicidade da atrazina sobre *E. andrei*. Provavelmente, a presença da SH e da atrazina podem ser irritantes para as membranas animais, ocasionando mudanças no comportamento de peixes e perdas de biomassa em oligoquetos.

Segundo Prosen e Zupancic-Kralj (2005) as reações que envolvem a degradação da atrazina e seus derivados na presença das SH's, podem ter contornos bastante complexos. Em linhas gerais, a degradação da atrazina na presença da SH é dependente do pH e da relação das concentrações das substâncias, como descrito anteriormente. Em meios sob radiação solar, as SH's podem reduzir a taxa de degradação da atrazina devido ao efeito protetor contra a radiação UV, envolvida no processo de fotodegradação.

Uma das variáveis envolvidas no processo de degradação da atrazina é a mobilidade deste herbicida no solo, que depende da interação de processos abióticos e bióticos. Estudos desenvolvidos por Correia et al (2007) mostram que cerca de 75% da atrazina aplicada em microcosmos com pouca perturbação permanece na superfície após 60 dias. Em condições de campo, a atrazina pode penetrar até 50cm abaixo da superfície do solo e grande parte pode ser lixiviada pelo *runoff*.

No entanto, a presença dos oligoquetos também é um fator importante na mobilidade da atrazina. De acordo com Farenhorst et al (2000), a presença deles promovem alterações na distribuição e na formação de resíduos não extrateis de atrazina. Três mecanismos importantes estão envolvidos neste processo: a) a formação dos túneis, b) a translocação de matéria orgânica da superfície para as camadas internas do solo, aumentando a mobilidade do pesticida e c) a formação de resíduos não extrateis na camada de revestimento dos túneis, o que aumenta a biodisponibilidade da substância. Contudo, segundo estes autores, o mecanismo exato pelo qual estes organismos aumentam a formação de resíduos não extrateis é difícil de ser identificado, mas uma das hipóteses é que a ação física da alimentação, combinada a processos fisiológicos do trato intestinal, promovam um aumento da captura da atrazina pelas argilas e substâncias húmicas.

As alternativas tecnológicas e os modos de interação das formas de carbono orgânico com a atrazina permanecem ainda pouco compreendidas. Estudos demonstram que a presença de sacarose aumenta a resistência das plantas à toxicidade da atrazina, facilitando as possibilidades da fitorremediação. De acordo com Sulmon et al (2004) a presença de sacarose pode aumentar a resistência de *Arabidopsis* sp devido ao mecanismo de sinalização celular promovido pelo açúcar. A presença simultânea de sacarose e atrazina podem modular a expressão da *psbA* mRNA e proteína D1 aumentando a tolerância da planta contra o pesticida, possibilitando ao vegetal bioacumular a atrazina e seus derivados em maior quantidade.

Este mecanismo pode ser utilizado como ferramenta em estratégias de recuperação de áreas contaminadas por atrazina, visando à remoção deste composto do solo. De acordo com Sulmon (2007), em ensaios com microcosmos contaminados com atrazina, a presença de sacarose potencializa a transferência do herbicida as partes aéreas das plantas. No entanto, a presença de oligoquetos promove uma redução na capacidade de absorção da atrazina devido à homogeneização da distribuição do pesticida e redução na disponibilidade de sacarose ao sistema radicular.

Neste exemplo, obteve-se uma constatação semelhante ao encontrado no presente estudo: que processos abióticos e bióticos podem dificultar a implementação de tecnologias de remediação da atrazina. Desta forma, mesmo com as limitações, os estudos em microcosmos são importantes por simular algumas condições de campo.

Mesmo com as atuais limitações, tecnologias como a do uso de sacarose e SH devem ser mais bem avaliadas por duas razões: a) não envolvem manipulação de organismos vivos e b) são produtos de origem natural. O tratamento com sacarose envolve a fitorremediação e a necessidade de remoção das plantas contaminadas e o uso de tecnologias *off-site*, mas a sacarose possui baixo custo. As SH's podem envolver custos de produção maiores e de fontes não-renováveis em certos casos, porém podem ser direcionadas para tratamentos *in situ*.

Desta forma, com base nos dados de literatura, pode-se inferir que as SH's promovem a degradação da atrazina sob condições restritas, dependentes do pH e das concentrações de SH presentes. Em sistemas ambientais, a degradação está condicionada ainda a fatores como radiação, presença de outras formas de matéria orgânica e flora microbiana. Parte dos resultados obtidos corrobora com a literatura, inclusive com as controvérsias, onde, em síntese, a presença das SH's não foi efetiva para detoxificar os efeitos da atrazina em relação à *A. sativa*; possível efeito sinérgico em relação a *E. andreii*; efeito positivo com *F. Cândida*; positivos para *P. subcaptata* e efeitos não observados para *D. magna*.

Apesar das limitações e controvérsias do uso das SH's como tecnologia de remediação da atrazina, o estudo do potencial uso de SH's para a descontaminação de solos e água contaminados permanece como de grande potencial. De acordo com Conte et al (2005) as SH's podem ser usadas com êxito como surfactantes naturais na lavagem de solos contaminados por resíduos industriais. Em alguns projetos de recuperação de solo a mobilização dos poluentes é desejada, sendo que surfactantes sintéticos com o SDS e Triton-X podem causar efeitos negativos a flora microbiana necessária para a reestruturação das funções do solo. As SH's podem ser mais vantajosas em relação aos surfactantes sintéticos devido a sua menor toxicidade e origem natural.

Considerações finais

- A presença de SH nos organismos de solo ocasionou uma redução (não significativa) da Atrazina aos colêmbolos (*F. candida*), não influenciou na toxicidade para as plantas (*Avena sativa*) e pode ter ocasionado um aumento da toxicidade para os oligoquetos (*E. andreii*).
- Nos organismos aquáticos a presença das SH's em relação a toxicidade da atrazina não foi evidenciada para *D. magna* mas foi positiva, porém não significativa, no sentido de reduzir a toxicidade para as algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*).

Referências

ANISIMOVA, M, KULIKOVA N, LEBEDEVA G, PERMINOVA I. (1998) Detoxifying ability of soils and isolated from them humic acids in relation to atrazine Scientific registration n° : 1860 Symposium n° : 7 Dept. of Soil Science; Dept. of Chemistry /Lomonosov Moscow State University.

Brown, S (2006). Synthesis and Activity of Commercially Available Herbicides. Fonte: www.bama.ua.edu/~chem/seminars/student_seminars/spring06/papers-s06/brown-sem.pdf acessado em: 24 set. 2008.

- Bruckner, A, Wright, J, Kampichler, C, Bauer, R, Kandeler, E. (1995) A method of preparing mesocosms for assessing complex biotic processes in soils. V.19, N. 2-3. PP 257-262.
- CETESB (2005) Decisão de Diretoria Nº 195-2005- E. Valores Orientadores para Solos e Águas subterrâneas no Estado de São Paulo Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br/Solo/publicacoes.asp
- Comber, S.D.W., (1999) . Abiotic persistence of atrazine and simazine in water. *Pestic. Sci.* 55, 696–702.
- Conte, P., Agretto, A, Spaccini, R, Piccolo, A (2005) Soil remediation: humic acids as natural surfactants in the washings of highly contaminated soils *Environmental Pollution* 135 pp 515–522
- Correia, F.V, Macrae, A., Guilherme, L.R.G., Langenbach, T (2007) Atrazine sorption and fate in a Ultisol from humid tropical Brazil. *Chemosphere* 67 pp. 847–854
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., Santore, R.C., 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2382–2396.
- Farenhorst, A. Topp, E. Bowman, B.T. Tomlin A.D. (2000) Earthworms and the dissipation and distribution of atrazine in the soil profile *Soil Biology & Biochemistry* 32 pp 22-33
- Glover, CN, Pane, EF, Wood, CM Humic Substances Influence Sodium Metabolism in the Freshwater Crustacean *Daphnia magna* *Physiological and Biochemical Zoology* 78(3):405–416
- Holanda, (1987) Ministry of Housing, Physical Planning And Environment, Netherlands, 1987, Soil Protection Act.

ISAKEIT, T, LOCKWOOD, J. L. (1989) Abiotic soil factors influencing the deleterious effect of atrazine on ungerminated conidia of *Cochliobolus satwus* Soil Bid. Biorhem. Vol. 22, No. 1, pp. X-41.

ISO 8692:1989 Water quality. Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. The International Organization for Standardization, Genève.

ISO 11268-1:1993 Soil quality. Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. The International Organization for Standardization, Genève,

ISO 10390. (1994). Soil quality, Determination of pH. The International Organization for Standardization, Genève, pp. 5.

ISO 6341:1996 Water quality. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Acute toxicity test. The International Organization for Standardization, Genève.

ISO 11267:1999 Soil quality -- Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. The International Organization for Standardization, Genève.

ISO 22030:2005 Soil quality -- Biological methods -- Chronic toxicity in higher plants. The International Organization for Standardization, Genève.

ISO 8692 (2000) Water quality—freshwater algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. The International Organization for Standardization, Genève.

- KHAN, S. U. J.; DUPONT, S.(1987) *Pesticide Science and Biotechnology, Proceedings of the Sixth International Congress of Pesticide Chemistry*; pp 417-424.
- KULIKOVA N.A, STEPANOVA E.V,. KOROLEVA O.V (2005) Mitigating activity of humic substances: direct influence on biota *In: I. V. Perminova et al. (eds.) 2005 Springer. Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice*, 285–309.
- LORENZ, R, BRTIGGEMANN, R, STEINBERG, C.E.W, SPIESER , O. H. (1996) Humic material changes effects of terbutylazine on behavior of zebrafish (*Brachydanio rerio*) *Chemosphere*, vol. 33, no. 11, pp. 2145-2158
- Martin-Neto,L.; Traghetta, DG, Vaz, CMP, Crestana S. Sposito, G. (2001) On the Interaction Mechanisms of Atrazine and Hydroxyatrazine with Humic Substances *J. Environ. Qual.*, vol. 30, march–april, 520-525p.
- Mandelbaum, R. T., Allan, D. L., and Wackett, L. P. 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1451-1457.
- Nikkila, A., Kukkonen, J.V.K., (2001). Effects of dissolved organic material on binding and toxicokinetics of pyrene in the water flea *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam Toxicol.* V. 40, pp. 333-338.
- Noblet, J.A., Smith, L.A., Suffet, I.H. (1996). Influence of natural dissolved organic matter, temperature, and mixing on the abiotic hydrolysis of triazine and organophosphate pesticides. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3685–3693.
- PAN Pesticide Database, 2008 PAN Pesticide Database—Pesticide Registration Status, 2008. Local: http://www.pesticideinfo.org/Detail_ChemReg.jsp?Rec_Id=PC35042

- Ponge, J, Bandyopadhyaya, I, Marchetti, V (2002) Interaction between humus form and herbicide toxicity to Collembola (Hexapoda) *Applied Soil Ecology* 20, 239–253
- PEARLMAN, W.& BANKS, C. K (1948) Substituted Chloro diamino-s-triazines. *J. Am. Chem. Soc* 70, PP. 3726-3728
- Prosen, H, Zupancic-Kralj, L (2005) Evaluation of photolysis and hydrolysis of atrazine and its first degradation products in the presence of humic acids *Environmental Pollution* 133 pp 517–529
- Radosevich, M., Traina, S. J., Hao, Y.-L., and Tuovinen, O. H. (1994). Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 297-302.
- Roberts, T. (1998). Metabolic pathways of agrochemicals, The Royal Society of Chemistry ed, Cambridge.
- Runes, H. (2000) Remediation of Atrazine in Irrigation Runoff by a Constructed Wetland. Oregon State University PhD Thesis.
- Steinberg CEW (2003): Ecology of Humic Substances in Freshwaters. Determinants from Geochemistry to Ecological Niches. Springer, Berlin. 440p.
- Sulmon, C, Gouesbet, G., Couée, I., El Amrani, A (2004) Sugar-induced tolerance to atrazine in *Arabidopsis* seedlings: interacting effects of atrazine and soluble sugars on *psbA* mRNA and D1 protein levels. *Plant Science* 167 pp. 913–923

- Sulmon, C., Gouesbet, G., Binet, F., Martin-Laurent, F., El Amrani, A., Couée, I. (2007) Sucrose amendment enhances phytoaccumulation of the herbicide atrazine in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Pollution* 145 pp. 507-515
- Tasli, S., Boetti, H., Vachaud, G., Scharff, C., Favre-Bonvin, J., Kaouadjii, M., and Tissut, M. 1996. Persistence and leaching of atrazine in corn culture in the experimental site of la Côte Saint André (Isère, France). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **30**: 203-212
- Thurman, E., and Meyer, M. (1996). Herbicide metabolites in surface water and groundwater: introduction and overview. In *Herbicide metabolites in surface water and groundwater* (E. Thurman, Ed., pp. 1-15. American Chemical Society Washington DC.
- Van Zwieten, L., and Kennedy, I. R. (1995). Rapid degradation of atrazine by *Rhodococcus* sp. NI86/21 and by an atrazine-perfused soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* n. 43: pp 1377-1382.

Considerações finais e recomendações para políticas públicas

As principais constatações e recomendações do presente estudo são:

- As substâncias húmicas podem agir de forma direta nos organismos, produzindo respostas ecológicas no sentido de favorecer ou não o desenvolvimento das espécies;
- A interação das SH's com compostos tóxicos tem sido amplamente utilizadas como medida de recuperação/remediação ambiental para uma variedade de substâncias. Contudo, a variabilidade funcional das SH's em função de suas origens pode gerar efeitos diferentes da mesma substância;
- Uma das linhas de pesquisa mais promissoras no campo da aplicação da tecnologia de SH como remediadora de toxicidade é o *design* funcional das SH's, através da manipulação laboratorial de suas propriedades em função do efeito desejado;
- As SH's podem tanto estimular quanto suprimir o desenvolvimento das algas, conforme observado para a espécie *Pseudochirchineriella subcaptata*. A metodologia de superfície de resposta apresenta diversas vantagens para os estudos ecotoxicológicos, por possibilitarem a geração de modelos com as variáveis testadas, sendo extremamente útil para o desenvolvimento de tecnológico;
- A resposta dos organismos estudados a toxicidade do cobre pode ser modelada através dos modelos existentes como BLM, permitindo inferir com maior grau de certeza quanto ao risco deste metal no ambiente;
- Para o organismo *C. xanthus*, no entanto, a interação entre os metais Cd e Cu apresentou um incremento da toxicidade com a presença das SH's em relação aos metais separados. Este fato pode ser explicado pela menor afinidade do íon Cd as SH's e ao efeito competitivo do Cu na presença das SH's;
- A resposta das substâncias orgânicas pode ocorrer em condições muito específicas, como o caso da atrazina. Algumas medidas de detoxificação só podem ser implementadas após a identificação das possíveis fontes de toxicidade pelo TIE;
- As SH's estudadas apresentaram efeitos diretos em alguns dos organismos estudados, como por exemplo a taxa de emergência em *C. xanthus*. Os efeitos diretos podem se apresentar como uma forma de estresse, porém a literatura questiona muitos dos efeitos negativos das SH's.
- A presença de SH nos organismos de solo ocasionou uma redução (não significativa) da Atrazina aos colêmbolos (*F. candida*), não influiu na toxicidade para as plantas (*Avena*

sativa) e pode ter ocasionado um aumento da toxicidade para os oligochaetas (*E. andreii*);

- Em organismos aquáticos a presença das SH's, em relação à toxicidade da atrazina, não foi evidenciada para *D. magna* mas foi positiva, porém não significativa, no sentido de reduzir a toxicidade para as algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*).
- Uma síntese, dos cenários de risco para a presença das SH isoladas ou na mistura com xenobióticos, com base nos dados obtidos neste estudo, está apresentada na tabela I.

Tabela I: Avaliação de risco qualitativa da tecnologia de remediação com SH. Os dados referem-se às primeiras estimativas a partir do presente estudo. += benéfico, - = prejudicial; ?= indica dúvidas sobre os efeitos (possível).

Comunidades/Populações	SH (isolada)	SH+metais	SH+Atrazina
Plantas superiores	+		- ?
Insetos terrestres	+		+
Oligoquetos terrestres	+ ?		- ?
Algas	+ ou -	+ ?	+ ?
Zooplâncton	+	+	?
Insetos aquáticos	+	+ ou -	