

## **Influência de diferentes frações de substâncias húmicas na sensibilidade ao cobre em invertebrados aquáticos da Amazônia**

Camilla Avelino DEMÉTRIO<sup>1</sup>; Rafael Mendonça DUARTE<sup>2</sup>, Adalberto luís VAL<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq; <sup>2</sup>Co-orientador INPA/CPEC; <sup>3</sup>Orientador INPA/CPEC.

### **1. Introdução**

Grande parte das substâncias orgânicas contidas em águas naturais encontra-se como substâncias húmicas aquáticas (SHA). As SHA são formadas pela decomposição biológica e enzimática de resíduos vegetais e animais presentes no solo, sendo transportadas às águas naturais por processos de lixiviação. Também podem ser formadas diretamente no meio aquático por decomposição de plantas e organismos aquáticos. Nos últimos anos diversos trabalhos têm sido realizados para determinar a sua estrutura e comportamento químico nos corpos d'água. Além da grande variedade, geralmente as SHA compreendem uma mistura complexa de moléculas com alto peso molecular semelhantes entre si, apresentando alto teor de grupos oxigenados, como por exemplo, grupamentos alcoólicos, fenólicos, carbonílicos e carboxílicos. No ambiente, as SHA são de especial relevância devido à variedade de trocas que são capazes de fazer com traços orgânicos e inorgânicos. Devido às suas características estruturais, as SHA têm grande influência no comportamento de metais no ambiente, sendo o transporte, armazenamento e ação de metais no ambiente dependentes da estabilidade do complexo metal-SHA. Nestas condições, significativas quantidades de íons metálicos podem se ligar às SH, e dessa forma, estariam passíveis de dissociação no meio aquático. As consequências são águas de lixiviação com baixos valores de pH e altos teores de metais livres, o que por sua vez, tende a aumentar a toxicidade dos metais na biota aquática (Grande, 2008). Diversas características das substâncias húmicas, como capacidade de complexação, transporte, influência na biodisponibilidade de metais, conservação do solo e interações com pesticidas têm sido estudadas (Toscano, 1999; Rocha *et al.*, 1999; Sargentini Jr. *et al.*, 2001). Devido às complexas associações intermoleculares das SHA, é difícil obter frações com tamanhos moleculares específicos. No entanto é possível realizar o fracionamento em intervalos de tamanhos moleculares, o que permite avaliar o comportamento das substâncias húmicas no ambiente (Rocha *et al.*, 2001, Sargentini Jr. *et al.*, 2001). Rocha e colaboradores (1999) conseguiram obter 6 frações de SHA, com tamanhos moleculares diferentes (F1 >100, F2 50-100, F3 10-50, F4 5-10, F5 1-5 e F6 <1KDa, a partir de amostras de água do Rio Negro – Amazonas, por meio de ultra-filtração. A especiação de metais em águas naturais consiste em um dos aspectos chave no subsídio à previsão do seu comportamento geoquímico e, conseqüentemente, de sua biodisponibilidade, fornecendo informações importantes para avaliação do real impacto associado à presença dos metais em ambientes aquáticos. Em sua maioria, as análises de especiação de metais em águas naturais buscam um maior entendimento sobre o comportamento destes elementos em ambientes naturais, identificando e quantificando os agentes que regulam a distribuição e a biodisponibilidade de metais na coluna d'água. No caso específico do cobre, sua especiação em águas naturais é influenciada por fenômenos físico-químicos, tais como a complexação por ligantes orgânicos e inorgânicos, a adsorção por oxi-hidróxidos metálicos e argilominerais e as reações de troca que ocorrem na interface água-sedimento. A interação do cobre com a matéria orgânica dissolvida, ou com o material particulado em suspensão, por exemplo, levam à formação de espécies ditas não biodisponíveis do metal. Diversos estudos evidenciam que a especiação de metais é, portanto, uma questão relevante, uma vez que seu conhecimento pode ter implicações diretas sobre aspectos ecotoxicológicos (Tonietto, 2006).

A especiação do cobre no ambiente aquático interfere diretamente nos processos de bioacumulação e biomagnificação do metal. Por meio dos processos de bioacumulação e biomagnificação, os metais podem se apresentar em concentrações mais elevadas em organismos de níveis tróficos mais altos, podendo, neste caso, estar de 2 a 1000 vezes mais concentrados nos organismos do que na água e no ar. Dessa forma, o estudo de acumulação de metais em organismos aquáticos vem do interesse em se conhecer o destino e os caminhos traçados pelos metais até o topo das cadeias tróficas (Santos, 2004), avaliando assim a toxicidade dessas substâncias aos organismos. Testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou

sedimentos). Nesses ensaios, organismos-testes são expostos a diferentes concentrações da substância a ser avaliada, determinando assim os efeitos tóxicos letais e subletais produzidos sobre os mesmos. Um dos principais parâmetros para a avaliação da toxicidade das substâncias químicas sobre os organismos é a determinação dos valores de  $CL_{50}$ , que é a estimativa da concentração letal de uma substância tóxica que promove a mortalidade de 50% dos animais expostos, durante um intervalo de tempo (Sprague, 1990). Diversos estudos recentes têm demonstrado que a toxicidade das substâncias químicas nos organismos depende da concentração e das características ambientais, que tem papel importante na especiação do cobre. Seguindo essa premissa, esforços têm sido despendidos no desenvolvimento de modelo geoquímicos para a predição da toxicidade dos metais nos ambientes. O modelo do ligante biótico (BLM) prediz a quantidade de íons disponíveis que pode causar toxicidade aos organismos aquáticos, considerando a biodisponibilidade dos metais e a interação com a biota (Di Toro *et al.*, 1999). O BLM foi desenvolvido primeiramente para peixes e em seguida para invertebrados, em águas de região temperada. O modelo utiliza uma base quantitativa para avaliar a interação competitiva entre o ligante biótico e os ligantes abióticos (DOC,  $Ca^{+2}$ , SHA,  $OH^-$ ,  $Cl^-$ , entre outros) na água. Dessa forma, este trabalho visa investigar o efeito de diferentes frações de SHA do Rio Negro na toxicidade do cobre em microcrustáceos, verificando a aplicabilidade do BLM em prever a o efeito tóxico do cobre em ambientes de água preta da Amazônia.

## 2. Material e Métodos

As coletas de microcrustáceos foram realizadas com o auxílio de rede de plâncton com malha de 100  $\mu m$ , nos tanques de piscicultura da CPAQ/INPA. Os exemplares coletados da ordem *Cladocera* e *Copepoda* foram armazenados em recipientes plásticos contendo água dos próprios tanques, e transportados até o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular - LEEM onde passaram pelo processo de triagem e identificação. Os microcrustáceos foram mantidos no laboratório em frascos redondos de vidro com capacidade de 2 L com aeração constante, temperatura de 28°C e foto-período de 12h de luz em câmara de germinação, até a realização dos experimentos. As seguintes características físico-químicas da água foram monitoradas diariamente durante os experimentos: pH, temperatura, dureza, alcalinidade, concentrações de  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  (espectrofotometria de absorção atômica Analyst – 800) e concentração de cloreto (Zall *et al.* 1956). Para obtenção da solução concentrada de COD foram realizadas coletas de água no Rio Negro-AM. As amostras de água foram levadas para o laboratório (LEEM-INPA), e filtradas em uma membrana de osmose reversa para concentrar o COD. A solução concentrada de COD foi fracionada segundo a metodologia descrita por Rocha *et al.*, (2000).

As frações obtidas e utilizadas nos experimentos foram as frações F1 e F2, com os tamanhos de 100 e 100-50 kDa, respectivamente. Os testes de toxicidade foram conduzidos em triplicata, de acordo com o protocolo da EPA (2002). Cada experimento teve a duração de 48hs, e consistiu na exposição de 10 indivíduos a 10 diferentes concentrações de cloreto de cobre, além do grupo controle não exposto ao cobre. O efeito das frações F1 e F2 na toxicidade do cobre foi determinado em três diferentes concentrações nominais de COD: 2,5, 5 e 10  $mgC.L^{-1}$ . A adição de cobre na água foi realizada 24hs antes do início do experimento para possibilitar a estabilização das interações químicas entre o metal e o COD. Após as primeiras 24h de exposição foi realizada a contagem dos animais (sob estereomicroscópio) e a solução experimental foi renovada em cada câmara experimental. O processo de contagem de animais foi realizado novamente após 48hs. Amostras de água dos experimentos foram coletadas a cada 24h, com o intuito de se determinar os parâmetros de qualidade de água necessários para o BLM. Para o cálculo da  $CL_{50}$ -48h foi utilizado o método trimmed Spearman-Kärber (Hamilton, 1977), no programa computacional "LC<sub>50</sub> Programs JS Pear Test", que relaciona a mortalidade dos organismos-teste com a concentração real de cobre utilizada nos ensaios. Os dados obtidos foram inseridos no programa BLM (<http://www.hydroqual.com>) a fim de ajustar o modelo para águas da Amazônia.

## 3. Resultados e discussão

Inicialmente foram realizadas três baterias de experimentos a fim de validar a metodologia utilizando água do Rio Negro-AM diluída em água de poço. Todas as baterias de experimentos realizados com a diluição da água do Rio Negro-AM em água do poço apresentaram altíssimas taxas de mortalidade (nos experimentos com água de poço todos os animais morreram) impossibilitando a determinação da  $CL_{50}$ .

Nos experimentos utilizando as frações F1 e F2 (tamanho molecular de 100kDa e 100-50kDa, respectivamente) foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações de substâncias húmicas aquáticas (SHA) na toxicidade do cobre aos microcrustáceos *Cladocera* e *Copepoda*. Os resultados obtidos nos experimentos com ambas as frações de SHA indicam

que o aumento da concentração de COD promove a redução da sensibilidade dos organismos ao cobre, como visto pelo aumento dos valores de  $CL_{50-48h}$ . Estudos prévios têm demonstrado que o COD aumenta a tolerância dos organismos aquáticos aos efeitos tóxicos do cobre por meio da redução da quantidade de íons cobre livres na solução, reduzindo assim a quantidade de cobre biodisponível para interagir com os sítios de ligação nas brânquias dos organismos (Hollis *et al.*, 1997; Playle, 1998).

Nos testes de toxicidade com ambas as frações de SHA os exemplares de *Cladoceras* foram mais sensíveis aos efeitos tóxicos do cobre, apresentando valores de  $CL_{50-48h}$  menores em relação aos observados para os *Copepodas*, em todas as concentrações de COD testadas. Nos experimentos com a fração F1 as  $CL_{50-48h}$  para os exemplares de *Cladoceras* variam de  $77,46 \pm 4,62$  a  $200,77 \pm 21,84 \mu\text{gCu.L}^{-1}$ , enquanto que para os *Copepodas* as  $CL_{50-48h}$  foram de  $99,16 \pm 8,15$  a  $252,40 \pm 4,90 \mu\text{gCu.L}^{-1}$ . Já nos experimentos com a fração F2 os valores de  $CL_{50-48h}$  para os *Cladoceras* variaram de  $44,94 \pm 9,30$  a  $91,24 \pm 15,05 \mu\text{gCu.L}^{-1}$ , enquanto para os exemplares de *Copepodas* as  $CL_{50-48h}$  foram de  $112,85 \pm 8,52$  a  $302,67 \pm 19,24 \mu\text{gCu.L}^{-1}$  (Fig. 1).

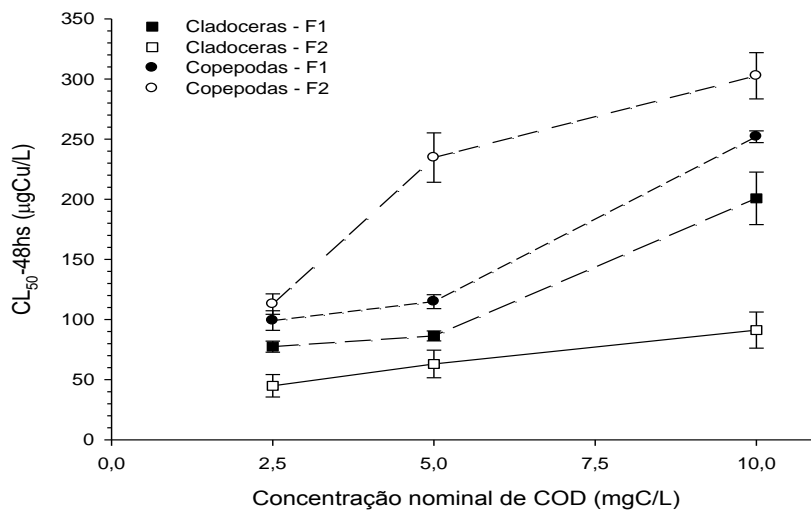


Figura 1: Concentrações letais de cobre ( $CL_{50-48h}$ ) para exemplares de *Cladoceras* e *Copepodas* em diferentes concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD), em diferentes frações de substâncias húmicas aquáticas (SHA).

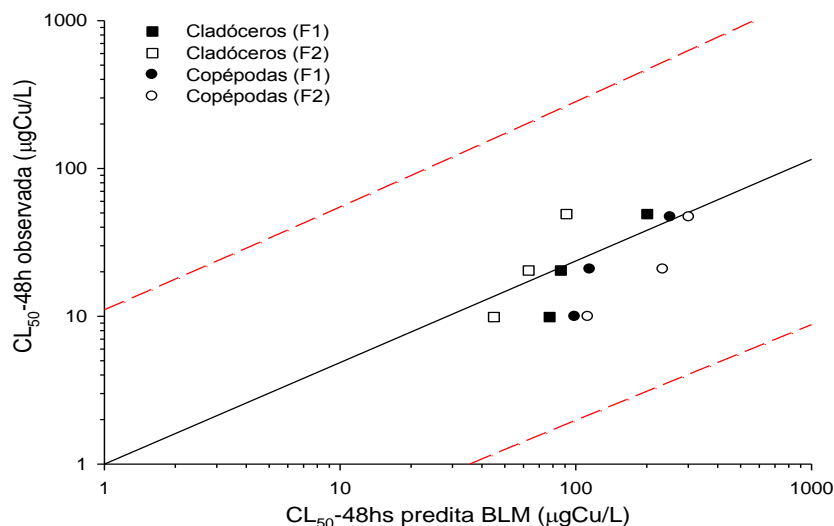


Figura 2: Concentrações letais de cobre ( $CL_{50-48h}$ ) correlacionadas com concentrações predita pelo programa BLM.

Os níveis de toxicidade preditos pelo modelo do ligante biótico (BLM) para os exemplares de *Cladoceras* e *Copepodas*, em ambas as frações e concentrações de COD testadas, apresentaram forte correlação com os valores de  $CL_{50-48h}$  observados experimentalmente

(Fig. 2), indicando que o modelo pode ser utilizado como uma ferramenta robusta para prever a toxicidade do cobre aos organismos aquáticos da Amazônia.

#### 4. Conclusão

Os exemplares de *Cladoceras* foram mais sensíveis ao cobre que os *Copepodas*, sendo dessa forma mais indicados como organismos-teste para a avaliação e monitoramento da qualidade dos ecossistemas aquáticos da Amazônia, em função da contaminação por cobre.

As frações de SHA exercem papéis diferentes na redução da toxicidade do cobre aos invertebrados aquáticos da Amazônia, sendo a fração F1 mais efetiva para os exemplares de *Cladoceras* e a fração F2 para o grupo dos *Copepodas*. Os resultados gerados pelo BLM demonstram que o modelo apresenta grande capacidade para estimar a toxicidade do cobre em micro-invertebrados aquáticos, podendo ser utilizado no monitoramento e avaliação da qualidade dos corpos d'água da Amazônia.

**Palavras-chave:** COD; BLM; Biodisponibilidade.

#### 5. Referências

- Di Toro, D. M.; Allen, H. E.; Bergman, H.L.; Meyer, J.S.; Paquin, P.R.; Santore, R.C. 1999. A biotic ligand model of the acute toxicity of metals. I. Technical bases. Section 3. In Integrated Approach to Assessing the Bioavailability and Toxicity of Metals in Surface Waters and Sediments. USEPA, 99-102 p.
- Grande, M. D., 2008. Da origem dos lagos à formação das substâncias húmicas aquáticas. Universidade De São Paulo - Instituto De Química De São Carlos 16pp.
- Hamilton, M.A.; Russo, R.C. & Thurston, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, 11(7): 714-719.
- Hydroqual, 2009. ([www.hydroqual.com](http://www.hydroqual.com)). Acessado em 28 de novembro de 2009.
- Rocha, J.C.; Sargentini Jr, E.; Toscano, I.A.S.; Rosa, A.H.; Burba, P., 1999. Multi-method Study on Aquatic Humic Substances from the "Rio Negro" - Amazonas State/Brazil. Emphasis on Molecular-Size Classification of their Metal Contents. *J. Braz. Chem. Soc.*, 10(3): 169-175.
- Rocha J. C.; Zara I. F. ; Rosa a. H.; Sargentini Jr. E.; Burba p., 2000. Substâncias húmicas: Sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração com base no tamanho molecular. *Química Nova*, Vol. 23, No. 3, 410-412.
- Santos, M. A. P. F., 2004. Influência das substâncias húmicas nas características bionômicas, toxicidade e bioacumulação de cobre por *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera). São Carlos. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais), Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos 118 p.
- Sprague, J.B., 1990. *Aquatic Toxicology*. In: Schrench, C. B. and Moyle, P. B. (Eds). Methods for Fish Biology. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, USA. p. 491-528.
- Tonietto, A.E., 2006. *Especiação química de cobre e zinco nas águas do reservatório do Irai: Efeitos da matéria orgânica e interação com microalgas*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 164 p.