

USO DA BIOTA NO MONITORAMENTO DA QUALIDADE DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS CONTAMINADOS POR METAIS

Luciana Fernandes de Oliveira⁽¹⁾

Mestranda do Programa de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL; Pós-graduanda em Análise e educação ambiental em ciências da terra – UEL; Formada em Ciências Biológicas - UEL e Integrante do Laboratório de Ecofisiologia Animal – LEFA - UEL.

Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Professora do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL; Chefe do Laboratório de Ecofisiologia Animal – LEFA; Membro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática – INCT-TA.

Endereço⁽¹⁾: Rod. Celso Garcia Cid, Complemento, PR 445 - Km 380, CP 6001-86051-990, Londrina-Paraná-Brasil. Fone: (43) 3371-4650. e-mail: lu_de_oliveira1609@hotmail.com

RESUMO

A contaminação de ecossistemas aquáticos por metais pode ocorrer por ação antrópica através de fontes, tais como, esgotos industriais e domésticos, escoamento superficial e depósitos de lixo. O monitoramento da qualidade dos ecossistemas aquáticos é essencial na prevenção de danos aos recursos hídricos e à biota. Este pode ser realizado através de parâmetros físicos, químicos e biológicos. Dentre os parâmetros biológicos pode-se verificar desde alterações em nível de comunidades e populações até celulares e moleculares. Os biomarcadores são alterações em parâmetros biológicos medidos em organismos que indicam a presença de contaminantes. Um biomarcador frequentemente relacionado à presença de metais é a metalotioneína. Com isso, os objetivos do presente trabalho são de demonstrar a importância dos biomarcadores e verificar a relação da presença de cobre e cromo no sedimento de um córrego contaminado por chorume, com a bioacumulação destes nas brânquias de bivalves e a concentração do biomarcador metalotioneína. Para tanto, bivalves da espécie *Corbicula fluminea* foram coletados e transferidos para dois pontos em um córrego contaminado com chorume de aterro doméstico, sendo submetidos a testes *in situ* por 15 dias. Após este período, as brânquias dos animais foram retiradas para análise de acúmulo de cromo e cobre e de metalotioneína. No período de experimento foi também coletada uma amostra de sedimento para análises dos metais. Os resultados obtidos mostraram aumento de cobre e cromo no sedimento do córrego contaminado em relação ao ponto de coleta, que corrobora com o aumento de cromo nos dois pontos e uma tendência do aumento de cobre no primeiro ponto, bem como com o aumento da metalotioneína nas brânquias daqueles animais submetidos a testes nos pontos contaminados. Foi observada uma relação direta entre a concentração de metais no sedimento e no tecido com o aumento da metalotioneína, o que mostra o potencial uso destes parâmetros no monitoramento de ecossistemas aquáticos contaminados por metais.

PALAVRAS-CHAVE: Chorume, bivalves, biomarcadores, bioacumulação, metalotioneína.

INTRODUÇÃO

A população mundial duplicou desde a década de 60 e apresenta atualmente aproximadamente sete bilhões de pessoas. O aumento da população acarreta em duas principais causas diretas de poluição, a industrialização e a massiva produção de alimentos, e com isso são geradas, proporcionalmente, maiores quantidades de resíduos, sejam eles domésticos ou industriais. Os resíduos gerados pelas atividades humanas, direta ou indiretamente têm a água como seu receptor final. Esta é a substância mais abundante na atmosfera, porém apenas uma pequena parte está disponível para utilização humana. Dos quase 1,4 milhão de km³ de água 97,2% está na forma de água salgada, 2,1 % está na forma de neve ou gelo, 0,001% vapor atmosférico e 0,6% de água doce líquida disponível. Deste somente 1,2% se apresentam na forma de rios e lagos e 98,8% águas subterrâneas, das quais metade é inviável para utilização humana devido à profundidade (> 800 m). Estes dados alertam para a necessidade de prevenção à contaminação destes recursos.

Na maioria dos municípios brasileiros ainda ocorre o depósito do lixo em lixões ou aterros que são potencialmente causadores de contaminação ambiental (IBGE, 2000). O chorume é o líquido produzido na decomposição do lixo e pode ter uma composição muito variável (SISINNO; MOREIRA, 1996). Os resíduos sólidos de um município consistem principalmente numa mistura de plásticos, metais e alguns materiais orgânicos e, por isso, várias substâncias orgânicas e inorgânicas são encontradas na composição do chorume (OYGARD; MAGE; GJENGEDAL, 2004). CHRISTENSEN et al. (2001) indicam cinco grupos de poluentes que podem ocorrer na pluma de chorume: matéria orgânica dissolvida, macrocomponentes orgânicos (cálcio, magnésio, potássio, amônia e ferro), elemento traço (cádmio, cromo, cobre, chumbo, níquel e zinco) compostos orgânicos xenobióticos (hidrocarbonetos aromáticos, fenóis, compostos alifáticos clorados) e outros componentes em baixas concentrações como boro, arsênio, bário, selênio, ~~Dentário e cômputo~~. Entre os encontrados no chorume, os metais estão entre os mais estudados, devido a sua toxicidade e persistência no ambiente. Eles podem ser subdivididos em duas categorias, metais de transição ou metaloides. Nos primeiros, incluem-se os metais como cobre, ferro e manganês, que são essenciais para o metabolismo dos organismos, porém em altas concentrações podem ser tóxicos, já os metaloides são aqueles que em baixas concentrações podem apresentar toxicidade, como o cádmio e chumbo. Grande parte dos metais encontrados na água provém do intemperismo de rochas e da lixiviação de solos e a concentração destes pode variar de acordo com a ocorrência dos metais na área de drenagem. Entretanto, a entrada de metais no ambiente aquático também ocorre devido às fontes antropogênicas, principalmente em centros urbanos e industriais.

Devido aos fatores de contaminação das águas é adequado que estudos de monitoramento sejam feitos para garantir a qualidade dos recursos hídricos. O monitoramento consiste em realizar sistemáticas de diversos parâmetros durante um determinado período de tempo com objetivo de coletar dados suficientes para acessar a qualidade de determinado ambiente. Estes dados incluem observação e análise de parâmetros físicos, químicos e biológicos. Nos parâmetros biológicos está incluído o uso regular de bioindicadores ou biomonitores, ou seja, espécies que apresentam alterações em parâmetros ao nível de população ou organismo que indicam mudanças ambientais a qualidade da água (RAND et al., 1995), seja pela observação da mortalidade e fecundidade dos organismos, pela bioacumulação ou uso de biomarcadores. Espécies sésseis de mexilhões e outros bivalves são considerados bons biomonitores de contaminação por metais e compostos orgânicos, pois podem acumular uma série de contaminantes em seus tecidos, bem como apresentar várias alterações indicadoras de danos iniciais (O'CONNOR, 2002). Um bivalve que tem sido foco de diversos estudos toxicológicos de contaminação por poluentes é a espécie *Corbicula fluminea* (Muller, 1774), considerada indicadora de contaminação aquática, dada à alta sensibilidade aos diversos contaminantes e à grande quantidade de água que filtra do meio (GOLDBERG et al., *C. fluminea* é uma espécie invasora, nativa do sudeste asiático, que foi introduzida no Brasil,

acidentalmente, na década de 70 no Rio Grande do Sul. Já foi identificada também em estados Paraná, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (INSTITUTO HÓRUS, 2009).

O termo bioacumulação refere-se à absorção de compostos químicos de qualquer fonte do ambiente aquático pelo animal, relacionando-se diretamente com a natureza e biodisponibilidade do composto e dos processos que determinam a taxa, distribuição e magnitude de acúmulo em um organismo. Invertebrados bentônicos são um importante grupo potencialmente exposto aos contaminantes devido ao seu contato direto com o sedimento (RAND, 1995). A bioacumulação de metais em bivalves é bastante estudada, sendo utilizada em projetos de monitoramento por todo mundo através do programa “Mussel Watch” (GOLDBERG et al., 1975).

Além da bioacumulação o monitoramento biológico pode ser feito através de biomarcadores. Estes são alterações em componentes moleculares e/ou celulares, processos, estruturas ou funções, determináveis em sistemas biológicos ou amostras (DEPLEDGE et al., 1995). Alguns biomarcadores podem ser mais específicos, ou seja, as alterações observadas podem ser mais facilmente relacionadas com aumento de determinado composto no meio. A metalotioneína, por exemplo, é um parâmetro comumente relacionado à presença de metais. Estas proteínas de baixo peso molecular são ligantes a metais devido à riqueza de grupos sulfidril (VIARENGO et al, 1997). Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivos demonstrar a importância do uso de parâmetros biológicos no monitoramento da qualidade dos ecossistemas aquáticos, bem como verificar a relação entre a concentração de cobre e cromo no sedimento de um córrego contaminado com chorume e o acúmulo destes nas brânquias de bivalves submetidos a testes *in situ* por 15 dias, bem como a concentração do biomarcador metalotioneína nestes animais.

METODOLOGIA

Local de estudo

O córrego dos Periquitos tem extensão de aproximadamente 3 km, nasce logo à jusante do aterro e deságua no ribeirão Cambé. Faz parte da bacia do Tibagi, principal rio da região. Segundo o Instituto Ambiental do Paraná (IAP), nos anos de 2007 e 2008, este córrego estava classificado de acordo com o Índice de Qualidade de Água (IQA) como “regular”. Esta classificação deve-se ao fato de que este córrego nasce à jusante do antigo aterro controlado de município de Londrina.

Este aterro, ativo até 2010, ocupa uma área de 19 ha e recebia diariamente aproximadamente 350 toneladas de lixo doméstico. O local começou a receber resíduos desde a década de 1970 na forma de lixão, sem nenhum preparo, como impermeabilização do fundo, compactação, cobertura dos resíduos, captação e tratamento do chorume. Na década de 1990 este mesmo local foi readaptado e recebeu o nome de aterro controlado. Este não é impermeabilizado e apenas parte do chorume é canalizada para um tanque no qual ocorre tratamento biológico, que posteriormente é lançada em outro tanque onde não ocorre nenhum tipo de tratamento. O chorume parcialmente tratado é direcionado para o córrego dos Periquitos. Esta canalização não garante a retirada de todo chorume, sendo que uma porção deste infiltra no solo e contamina as águas subterrâneas e a nascente do córrego. O chorume será produzido neste local por, aproximadamente, mais cinquenta anos.

Teste *in situ*

Os testes *in situ* são aqueles nos quais os animais são transferidos e mantidos por determinado no local no qual se pretende estudar. Este teste apresenta como vantagens o fato de que os animais

são expostos à condição real do ambiente e simultaneamente é possível ter controle do tempo de exposição à condição estudada.

Bivalves da espécie *C. fluminea* foram coletados no lago Igapó III (Ponto de coleta) e transferidos para dois pontos do córrego dos Periquitos (P1 e P2). Nestes três pontos foram coletadas amostras de sedimento para análise dos metais cromo e cobre. Os animais foram colocados em redes (Figura 1) em contato com o sedimento durante 15 dias e após este tempo foram retiradas as brânquias para análise dos metais acumulados e análise de metalotioneínas. Também foram amostrados animais recém-coletados do ponto de coleta.

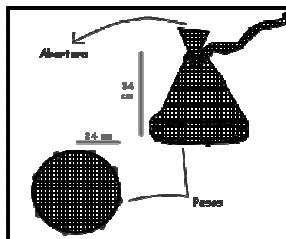


Figura 1: Redes de malha 1 cm utilizadas para manutenção dos bivalves nos testes *in situ*.

Análise de cromo e cobre no sedimento e brânquias de *C. fluminea*

O sedimento dos pontos estudados, bem como dos pontos de coleta e referência foram coletados em campo e armazenados em tubos plásticos com tampa. Para coleta, os tubos abertos foram mergulhados na água e foi retirada a camada mais superficial de sedimento presente no fundo. Os metais chumbo, níquel, alumínio, cobre, cromo, cádmio, manganês foram analisados no sedimento na forma de metais potencialmente biodisponíveis (fracamente ligados), já que é a que encontra a melhor correspondência com os resultados dos testes de toxicidade destes elementos para diferentes organismos. Para isso, 1 g de sedimento seco a 60°C foi submetido à agitação horizontal por 2 horas com ácido clorídrico (HCl) 0,1M. Após este período a suspensão foi filtrada com filtro quantitativo e o filtrado lido em espectrofotômetro de absorção atômica em forno de grafite (MOZEMTO, 2006). As glândulas digestivas dos bivalves foram transferidas para tubos plásticos previamente lavados com solução de ácido nítrico 0,5% por 24 h. Os tecidos secos foram submetidos à digestão ácida com ácido nítrico suprapuro (Merck) em estufa, a temperatura constante de 60° C, até a total evaporação do ácido. Após a digestão, 1 mL de água ultrapura foi adicionada e o material digerido e centrifugado (3.600 g; 10 min). A concentração dos metais (chumbo, níquel, alumínio, cobre, cromo, cádmio, manganês) foi determinada em espectrofotômetro de absorção atômica em forno de grafite eletrotérmica em forno de grafite em espectrofotômetro de absorção atômica.

Determinação da concentração do biomarcador metalotioneína

A concentração de metalotioneína foi avaliada no sobrenadante obtido através da homogeneização das brânquias com tampão fosfato de potássio com posterior centrifugação. Uma fração parcialmente purificada de metaloproteína obtida em várias etapas de uma solução de etanol/clorofórmio foi quantificada em espectrofotômetro a 412 nm. As medidas de concentração de grupamentos-SH foram determinadas segundo a metodologia descrita por VIARENGO et al. (1997) utilizando-se como padrão a glutathiona reduzida (GSH).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os bivalves (n=48) mantidos por 15 dias no córrego dos Periquitos apresentaram aumento de cromo e uma tendência de aumento de cobre acumulado nas brânquias (Figura 2). Este aumento relaciona-se com o aumento destes metais no sedimento dos locais (Figura 3). A análise de metais acumulados em organismos aquáticos é vantajosa em relação à análise da água de um ambiente contaminado, pois muitas vezes a concentração presente na água não é detectável e no tecido de um animal o metal está mais concentrado. Estima-se que bivalves filtradores podem acumular concentrações de 1.000 a 10.000 vezes maiores do que as verificadas nas fontes de exposição (UNEP, 2004). Além disso, a análise da água é pontual, ou seja, não representa a contaminação ao longo do tempo, mas em um momento específico. Em relação ao sedimento, as análises de acúmulo de metais em animais representa melhor a interação da biota com os contaminantes e a integridade do ecossistema. As brânquias são consideradas o principal tecido dos bivalves para se avaliar a bioconcentração relacionada à exposição recente (aguda), pois elas estão em contato direto com o meio e são a maior interface para incorporação dos metais dissolvidos na água. Alguns trabalhos demonstram a relação entre a concentração de cobre e cromo no sedimento e no corpo de *C. flumínea* expostos a um local contaminado, entretanto deve-se ter atenção quanto ao tipo de sedimento que esta sendo considerado (SHOULTS-WILSON et al., 2010)

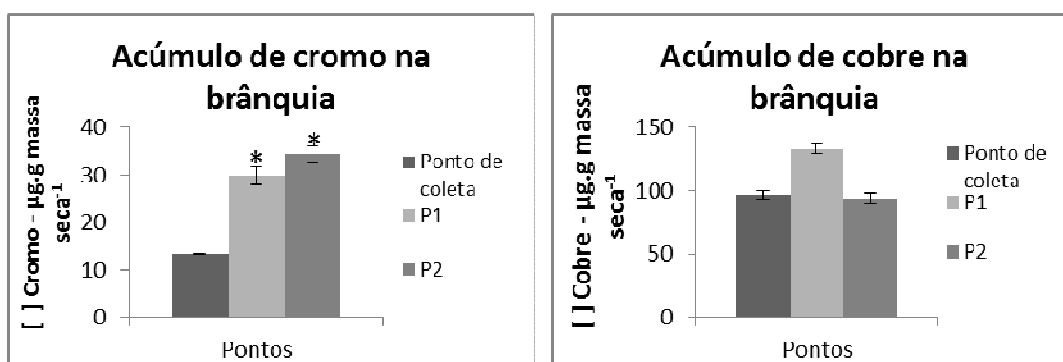


Figura 1: Acúmulo de cromo (à esquerda) e cobre (à direita) ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca) nas brânquias dos bivalves submetidos aos testes in situ no córrego dos Periquitos durante 15 dias comparados com o ponto de coleta.

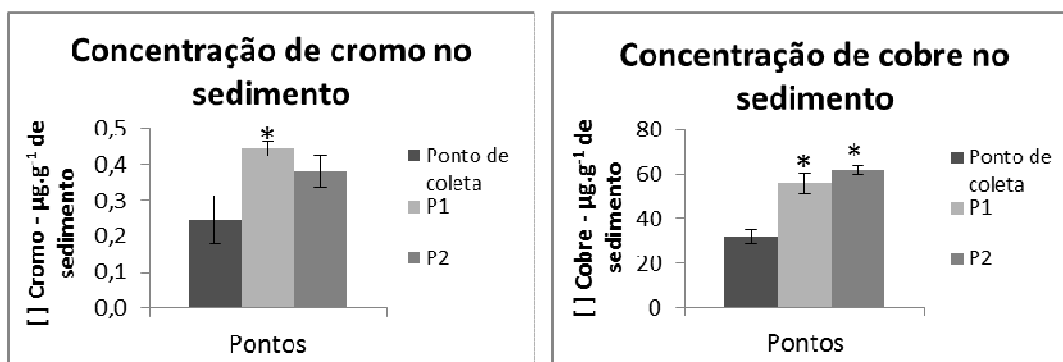


Figura 2: Concentração de cromo e cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no sedimento tanto no ponto de coleta quanto dos dois pontos dos testes in situ (P1 e P2).

Foi observado o aumento do conteúdo de metalotioneínas nas brânquias destes animais (Figura 4). Essas proteínas são biomarcadores geralmente relacionada à presença de metais. Os biomarcadores são alterações biológicas que os organismos expressam diante de um poluente. Eles constituem importantes ferramentas para monitorar o equilíbrio do ecossistema aquático e têm sido empregados em diversos programas de monitoramento em vários países (WALKER, 1996). Alguns biomarcadores são mais específicos para determinados contaminantes, como o caso das metalotioneínas, que são ligantes específicos que mantêm os níveis de metais razoavelmente toleráveis aos processos celulares, controlando a distribuição destes quando presentes em concentrações fora do comum. A relação entre o aumento de metalotioneínas e da bioacumulação de metais em tecidos de bivalves já foi demonstrada em outros trabalhos (DAMIENS et al., 2006; MARIE, BRAUDRIMONT, BOUDOU, 2006; PYTHAROPOULOU et al., 2006)

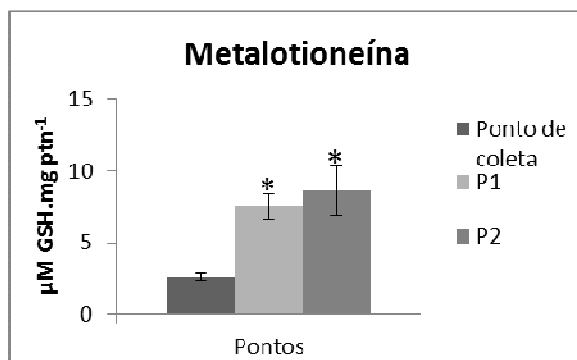


Figura 3: Concentração de metalotioneínas ($\mu\text{M GSH.mg ptn}^{-1}$) nas brânquias dos bivalves submetidos aos testes *in situ* no córrego dos Periquitos durante 15 dias comparados com o ponto de coleta

CONCLUSÕES

Houve relação direta entre o aumento de metais no sedimento, acúmulo destes nas brânquias e no conteúdo de metalotioneínas. Estes resultados demonstram a possibilidade de utilização com eficácia de parâmetros biológicos no monitoramento de ecossistemas aquáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHRISTENSEN, T.H., KJELDSSEN, P., BJERG, P.L., JENSEN, D.L., CHRISTENSEN, J.B., BAUN, A., ALBRECHTSEN, H., HERON, G. Biochemistry of landfill leachate plumes. **Applied Geochemistry**, v.16, n.7-8, p.659-718, 2001.

DAMIENS,G., MOUNEYRAC,C., QUINIOU, F., HIS, E., GNASSIA-BARELLI, M., ROMÈO, M. Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*. **Environmental Pollution**, v.140, p.492-499, 2006.

DEPLEDGE, M.H., AAGAARD, A., GYÖRKÖS, P. Assesment os trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, v.31, n.1-3, p.19-27, 1995.



GOLDBERG, E.D. The mussel watch: a first step in global marine monitoring. **Marine Pollution Bulletin**. v. 6, p.111–132; 1975.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2000. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: setembro/2011.

INSTITUTO HÓRUS DE DESENVOLVIMENTO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL / THE NATURE CONSERVANCY. **Dados sobre a espécie *Corbicula fluminea***.

Disponível em: <http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Corbicula_fluminea.htm>
Acesso: 20 out 2009.

MARIE, V., BAUDRIMONT, M., BOUDOU, A. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. **Chemosphere**, v.65, p.609–617, 2006.

MOZETO, A.A. **Sedimentos e particulados lacustres: amostragens e análises biogeoquímicas**. In: BICUDO, C.E.M., BICUDO, D.C. (eds.) Workshop de Amostragem em Limnologia, Campos do Jordão, 1999. No prelo.

O’CONNOR, T.P. National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. **Marine Environmental Research**, v. 53, p. 117–143, 2002.

OYGARD, J.K.; MAGE, A.; GJENGEDAL, E. Estimation of the mass-balance of selected metals in four sanitary landfills in Western Norway, with emphasis on the heavy metal content of the deposited waste and the leachate. **Water Research**, v.38, p.2851–2858, 2004.

PYTHAROPOULOU, S., KOUVELA, E. C. SAZAKLI, E., LEOTSINIDIS, M., KALPAXIS, D.L. Evaluation of the global protein synthesis in *Mytilus galloprovincialis* in marine pollution monitoring: Seasonal variability and correlations with other biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v.80, p.33–41, 2006.

RAND, G.M., WELLS, P.G., MCCARTY, L.S. **Introduction to aquatic toxicology**. In: RAND, G.M. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. Crc Press, Ed.2, 1995.

SISINNO, C.L.S., MOREIRA, J.C. Avaliação da contaminação e poluição ambiental na área de influência do aterro controlado do Morro do Céu, Niterói, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.12, n.4, p.515-523, out-dez 1996.

UNEP. **Guidance for a global monitoring programme for persistente organic pollutants**. Inter-Organization Programme for the sound management of chemicals. Geneva, Switzerland. 2004.

VIARENGO, A., PONZANO, E., DONDERO, F., FABBRI, F. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: a application to Mediterranean and Antarctic mollusks. **Marine Environmental Research**. v.44, n.1, p.69-84, 1997.



WALKER, C.H. **Principles of ecotoxicology**. London, Taylor & Francis. 1996.