

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

Roberta de Moura Lisbôa

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE SOLO CONTAMINADO COM
EFLUENTE SANITÁRIO**

Santa Maria, RS
2017

Roberta de Moura Lisbôa

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE SOLO CONTAMINADO COM EFLUENTE
SANITÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Área de Concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Civil.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Delmira Beatriz Wolff
Coorientadora: Prof^a Dr^a Andressa de Oliveira Silveira

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lisbôa, Roberta de Moura
Avaliação toxicológica de solo contaminado com efluente sanitário / Roberta de Moura Lisbôa.- 2017.
93 p.; 30 cm

• Orientadora: Delmira Beatriz Wolff
Coorientadora: Andressa de Oliveira Silveira
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, RS, 2017

1. Toxicologia 2. Efluente sanitário I. Wolff, Delmira Beatriz II. Silveira, Andressa de Oliveira III. Título.

© 2017

Todos os direitos autorais reservados à Roberta de Moura Lisbôa. A reprodução de partes ou o todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: roberta.piardi@gmail.com

Roberta de Moura Lisbôa

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE SOLO CONTAMINADO COM EFLUENTE
SANITÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Área de Concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Civil**.

Aprovado em 24 de outubro de 2017:

**Delmira Beatriz Wolff, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)**

Bárbara Estevão Clasen, Dr^a. (UERGS)

William Gerson Matias, Dr. (UFSC)

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Roberto e Fátima, meus irmãos João Éric e Manuele, por sempre me incentivarem a ser uma pessoa melhor.

Àquela que me aceita, me transborda, me dá forças, me encoraja e me faz acreditar na concretização dos meus sonhos. À Jucele, por tudo.

Ao grupo de pesquisa GHidros que foi minha segunda casa ao longo da graduação e mestrado. Aos colegas do grupo, Bruna, Danrlei, Henrique, Jota, Marielle e Thiago. Aos que já saíram, mas que também fizeram parte desse caminho, Adriano, Cristiane, Mateus, Silvana, Taiane, Vinicius, Siza e Osmar. Obrigada pela amizade, incentivo e momentos de descontração. Em especial a minha grande amiga Glauca, que tive a chance de conhecer e criar um forte laço de amizade o qual levarei para o resto da vida.

Às bolsistas Ana Carolina, Maria Luiza e Michele, pela ajuda e convivência. Sem vocês esse trabalho não sairia.

Às professoras Delmira e Andressa, pela confiança, oportunidade e ensinamentos proporcionados, e por aceitarem embarcarem nessa loucura juntamente comigo.

Aos professores do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, pelos ensinamentos desde a graduação até a pós-graduação.

À Rosa, secretária do PPGEAMB, que não mediu esforços para a compra dos reagentes.

À colega de graduação e mestrado Carine, por dividir inúmeras incertezas e dúvidas em nossas pesquisas.

Aos membros do Laboratório de Toxicologia Aquática, em especial a Doti, por estar sempre disposta em auxiliar nas análises enzimáticas.

À banca examinadora da dissertação, Prof. William, e especialmente Profa. Bárbara Clasen que foi imprescindível para que esse trabalho fosse realizado.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), por essa parceria que se estende desde 2010. Deixo aqui algumas das pessoas mais maravilhosas que tive a oportunidade de conhecer.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

Muito obrigada!

O cosmonauta russo é o primeiro homem que foi ao espaço. Certo? Os russos ganharam dos americanos. Ele sobe naquela enorme espaçonave, mas a única parte habitável é bem pequena. Então o cosmonauta lá dentro vai até a janela, olha para fora, e vê a curvatura da Terra pela primeira vez. O primeiro homem a ver o planeta de onde ele veio. E ele está encantado com este momento. E de repente um estranho barulho – toc... toc... toc... – começa a sair do painel. Ele remove o painel de controle, destrói seus instrumentos tentando encontrar o som, tentando parar o som. Mas não consegue encontrar. Não consegue parar o barulho, que continua. Em poucas horas, começa a sentir o barulho como uma tortura. Alguns dias se passam com este som, e ele sabe que este pequeno ruído irá acabar com ele. Ele irá enlouquecer. O que ele vai fazer? Está lá em cima no espaço, sozinho, em uma cápsula espacial. Ainda lhe restam 25 dias para retornar ao solo, com este som. Então o cosmonauta decide que a única maneira para salvar sua sanidade é se apaixonar por aquele som. Então, ele fecha os olhos, penetra em sua imaginação e depois os abre. Ele não escuta mais aquele barulho. Ele ouve música.

Another Earth (2011)

RESUMO

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE SOLO CONTAMINADO COM EFLUENTE SANITÁRIO

AUTORA: Roberta de Moura Lisbôa

ORIENTADORA: Delmira Beatriz Wolff

COORIENTADORA: Andressa de Oliveira Silveira

O descarte de efluentes sanitários sem tratamento adequado no solo, acarreta inúmeras consequências ambientais e riscos à saúde humana. O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos toxicológicos de solo de área contaminada por efluente sanitário, no comportamento e reprodução de minhocas da espécie *Eisenia andrei*, por meio de testes ecotoxicológicos. Além disso, avaliou-se os efeitos da exposição através dos biomarcadores enzimáticos catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), na peroxidação lipídica da membrana celular (TBARS) e na neurotransmissão por meio da acetilcolinesterase (AChE). Os resultados da coleta de amostras de solo indicaram acúmulos dos metais pesados Cu e Zn em pontos relevantes na área, devido ao lançamento de efluente. Os resultados ecotoxicológicos indicaram que o solo foi tóxico à reprodução e comportamento dos organismos. Os solos contaminados causaram mudanças significativas nos biomarcadores. Foi observado incremento na atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase como mecanismos de defesa antioxidante. O aumento significativo nos níveis de malondialdeído e a inibição da atividade da acetilcolinesterase, indicam a ocorrência da peroxidação lipídica da membrana celular e alterações na neurotransmissão em decorrência dos contaminantes presentes no solo da área contaminada. Os atributos do solo, como pH e matéria orgânica foram elementos chave nas respostas dos organismos, devendo ser considerados em abordagem toxicológicas. Assim, a utilização de minhocas *E. andrei* para analisar o potencial de toxicidade de solo contaminados por efluentes sanitários se mostrou eficiente, indicando a necessidade de remediação da área, visando sanar o risco ao ambiente e a saúde humana.

Palavras-chave: Metais pesados. Ensaio comportamental. Ensaio crônico. Biomarcadores.

ABSTRACT

TOXICOLOGICAL EVALUATION OF SOIL CONTAMINATED WITH SANITARY EFFLUENT

AUTHOR: Roberta de Moura Lisbôa

ADVISOR: Delmira Beatriz Wolff

COADVISOR: Andressa de Oliveira Silveira

The disposal of sanitary effluents without adequate treatment in the soil, entails numerous environmental consequences and risks to human health. The present study aimed to investigate the toxicological effects of soil contaminated by sanitary effluent on the behavior and breeding of earthworms of the *Eisenia andrei* species by means of ecotoxicological tests. In addition, the effects of exposure through enzymatic biomarker catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), cell membrane lipid peroxidation (TBARS) and neurotransmission by acetylcholinesterase (AChE). The results of soil sample collection indicated accumulations of the heavy metals Cu and Zn at relevant points in the area, due to the effluent discharge. Ecotoxicological results indicated that the soil was toxic to reproduction and organism behavior. Contaminated soils caused significant changes in biomarkers. Increased activity of the enzymes superoxide dismutase and catalase as antioxidant defense mechanisms was observed. The significant increase in malondialdehyde levels and the inhibition of acetylcholinesterase activity indicate the occurrence of lipid peroxidation of the cell membrane and changes in neurotransmission due to the contaminants present in the soil of the contaminated area. Soil attributes, such as pH and organic matter were key elements in the responses of organisms, and should be considered in a toxicological approach. Thus, the use of *E. andrei* earthworms to analyze the toxicity potential of soil contaminated by sanitary effluents was efficient, indicating the need for remediation of the area, aiming to remedy the risk to the environment and human health.

Keywords: Heavy metals. Behavior test. Chronic assay. Biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-1 - Fluxograma representativo das diversas etapas de realização do estudo	19
Figura 2-1 - Esquema de defesa antioxidante.....	28
Figura 3-1 – Localização das fontes pontuais de esgoto e pontos de amostragem de solo na área de estudo.....	35
Figura 3-2 - Biplot dos pesos de CP1 e CP2 para os metais analisados	45
Figura 3-3 - Dendograma gerado pelo agrupamento dos pontos amostrados	47
Figura 4-1 - Pontos de amostragem de solo na área de estudo.....	61
Figura 4-2 - Comportamento de evasão de minhocas (<i>Eisenia andrei</i>) em solos coletados em área com dejetos de efluente sanitário. Diferentes letras acima das barras indicam diferenças significativas a $p < 0,05$ entre tratamentos	67
Figura 4-3 - Atividade de catalase em <i>Eisenia andrei</i> expostas as amostras coletas de área contaminada por efluente sanitário.aos 3, 7 dias, 14 e 28 dias de exposição. As barras representam as medianas e as linhas verticais o erro padrão (n = 6). Diferentes letras acima das barras indicam 5% de nível de significância.....	72
Figura 4-4 - Atividade de superóxido dismutase em <i>Eisenia andrei</i> expostas as amostras coletadas de área contaminada por efluente sanitário aos 3, 7, 14 e aos 28 dias de exposição. As barras representam as medianas e as linhas verticais o erro padrão (n = 6). Diferentes letras acima das barras indicam 5% de significância	73
Figura 4-5 - Níveis de malondialdeído em <i>Eisenia andrei</i> expostas as amostras coletas de área contaminada por efluente sanitário aos 3, 7, 14 e 28 dias de exposição. As barras representam as medianas e as linhas verticais o erro padrão (n = 6). Diferentes letras acima das barras indicam 5% de significância	75
Figura 4-6 - Atividade da acetilcolinesterase em <i>Eisenia andrei</i> expostas ao solo contaminado com efluente em diferentes tempos de exposição aos 3, 7, 14 dias e 28 dias de exposição. As barras representam as medianas e as linhas verticais o erro padrão (n = 6). Diferentes letras acima das barras indicam 5% nível de significância	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Análise estatística descritiva dos atributos do solo da área de estudo.	40
Tabela 3.2 - Comparação dos atributos do solo em outros estudos com efluente	43
Tabela 3.3 - Matriz de correlações de Pearson entre os atributos do solo.....	43
Tabela 3.4 - Características da análise de componentes principais.....	45
Tabela 3.5 - Resultados do Índice de Poluição (IP) e Índice de Poluição Integrado (IPI) para Cu e Zn na área de estudo.....	48
Tabela 3.6 - Valores para Índice de Geoacumulação e Fator de Enriquecimento de Cu e Zn na área de estudo	49
Tabela 4.1 - Parâmetros reprodutivos de <i>Eisenia andrei</i> expostas ao solo da área de estudo, após 56 dias em condições controladas.....	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 - Classificação do Índice de Geoacumulação.....	39
Quadro 3.2 - Classificação do Fator de Enriquecimento	40

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Índice de Poluição (IP).....	38
Equação 2 – Índice de Geoacumulação (IGEO).....	39
Equação 3 – Fator de Enriquecimento (FE).....	39
Equação 4 – Percentagem de fuga.....	63

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Temperatura em graus Célsius
AA	Análise de Agrupamento
AChE	Acetilcolinesterase
ACP	Análise de Componentes Principais
ANOVA	Análise de Variância
CAT	Catalase
CDE	Canal de Drenagem
CEU	Casa do Estudante Universitário
cm	Unidade de comprimento centímetro
cmol	Unidade de centimol de carga
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP	Componente Principal
CTC	Capacidade de Troca de Cátions
Cu	Cobre
CV	Coeficiente de Variação
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DP	Desvio Padrão
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FE	Fator de Enriquecimento
Fe	Ferro
FP	Fonte Pontual
g	Unidade de massa grama
h	Unidade de tempo hora
IGEO	Índice de Geoacumulação
IP	Índice de Poluição
IPI	Índice de Poluição Integrado
kg	Unidade de massa kilograma
LEMA	Laboratório de Meio Ambiente
MDA	Malondialdeído
mg	Unidade de massa miligrama
min	Unidade de tempo minuto
mL	Unidade de volume mililitro
Mn	Mangânes
MO	Matéria Orgânica
mol	Unidade de quantidade de substância mol
nm	Unidade de comprimento de onda nanómetro
P	Fósforo
pH	Potencial hidrogeniônico
r	Coeficiente de Correlação de Pearson
rpm	Unidade de velocidade angular rotações por minuto
RU	Restaurante Universitário
SOD	Superóxido dismutase
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UI	Unidades Internacionais
VRQ	Valor de Referência de Qualidade
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	ATIVIDADES ANTRÓPICAS E A GERAÇÃO DE EFLUENTES	20
2.1.1	Contaminação do solo por efluente sanitário	20
2.1.1.1	<i>Metais na contaminação do solo.....</i>	<i>21</i>
2.2	ECOTOXICOLOGIA.....	23
2.2.1	Bioindicadores	23
2.2.1.1	<i>Eisenia sp.</i>	<i>24</i>
2.3	BIOMARCADORES	26
3	ARTIGO 1 – ATRIBUTOS DO SOLO E APLICAÇÃO DE ANÁLISE MULTIVARIADA PARA AVALIAÇÃO DE UMA ÁREA CONTAMINADA POR EFLUENTE SANITÁRIO.....	30
3.1	INTRODUÇÃO	32
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.2.1	Localização e descrição da área de estudo.....	34
3.2.2	Amostragem de solo e análise físico-química.....	35
3.2.3	Análise estatística.....	36
3.2.3.1	<i>Análise de Componentes Principais (ACP).....</i>	<i>37</i>
3.2.3.2	<i>Análise de Agrupamento (AA).....</i>	<i>37</i>
3.2.4	Indicadores de poluição e aporte de metais pesados no solo.....	38
3.2.4.1	<i>Índice de poluição (IP) e Índice de Poluição Integrado (IPI)</i>	<i>38</i>
3.2.4.2	<i>Índice de Geoacumulação (IGEO).....</i>	<i>38</i>
3.2.4.3	<i>Fator de Enriquecimento (FE).....</i>	<i>39</i>
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.3.1	Atributos físico-químicos do solo	40
3.3.2	Correlação de Pearson	43
3.3.3	Análise de Componentes Principais	44
3.3.4	Análise de Agrupamento (AA)	46
3.3.5	Indicadores de poluição e aporte de metais pesados no solo.....	48
3.4	CONCLUSÃO	51
3.5	REFERÊNCIAS.....	52

4	ARTIGO 2 – RESPOSTAS TOXICOLÓGICAS DE EISENIA ANDREI EXPOSTAS AO SOLO DE ÁREA CONTAMINADA POR EFLUENTE SANITÁRIO56	
4.1	INTRODUÇÃO	58
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	60
4.2.1	Localização e descrição da área de estudo.....	60
4.2.2	Amostragem do solo.....	61
4.2.3	Condições experimentais.....	62
4.2.4	Ensaio comportamental.....	63
4.2.5	Ensaio crônico	64
4.2.6	Determinações dos biomarcadores.....	64
4.2.6.1	<i>Atividade da catalase (CAT)</i>	<i>65</i>
4.2.6.2	<i>Superóxido dismutase (SOD)</i>	<i>65</i>
4.2.6.3	<i>Ensaio de Peroxidação Lipídica (TBARS).....</i>	<i>65</i>
4.2.6.4	<i>Acetil-colinesterase (AChE)</i>	<i>66</i>
4.2.6.5	<i>Determinação de proteínas.....</i>	<i>66</i>
4.2.7	Análise estatística	66
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.3.1	Ensaio comportamental.....	67
4.3.2	Ensaio crônico	69
4.3.3	Determinações dos biomarcadores.....	71
4.4	CONCLUSÃO	80
4.5	REFERÊNCIAS.....	81
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
6	RECOMENDAÇÕES.....	88
7	REFERÊNCIAS	89
8	APÊNDICE A – DADOS DOS ATRIBUTOS FÍSICO-QUÍMICOS DO SOLO NAS AMOSTRAS COLETADAS	93

1 APRESENTAÇÃO

Ao longo dos anos, o ambiente tem sido exposto à contaminação por agentes tóxicos diversos devido à ação do homem. Impactos ambientais, como contaminação do solo e das águas superficiais e subterrâneas, ocorrem principalmente por indústrias desativadas, vazamentos de contaminantes, uso de agrotóxicos e disposição inadequada de resíduos sólidos e líquidos. Em relação aos efluentes líquidos, estes transportam elevadas cargas de contaminantes.

O Brasil ainda não apresenta índices adequados de coleta e tratamento de efluentes (BRASIL, 2016). A falta de sistemas de esgotamento sanitário conduz a um destino final inadequado, em sua forma bruta ou com tratamento simplificado, onde o solo acaba sendo o receptor desse resíduo líquido. Em consequência desse lançamento, o ambiente terrestre poderá ser degradado, podendo trazer impactos ao meio ambiente e à saúde pública (ULLAH et al., 2012).

Diante da natureza complexa do solo e dos efluentes, avaliar a extensão e o grau de contaminação, representa um desafio aos pesquisadores. A avaliação da contaminação no solo normalmente é realizada utilizando-se parâmetros físico-químicos, permitindo apenas quantificar as substâncias isoladas presentes numa amostra, sem levar em consideração os efeitos combinados dos diferentes constituintes (CALISI et al., 2011; ZHENG et al., 2013). Além disso, a entrada cada vez maior de contaminantes para os ecossistemas tem levado à necessidade de melhor compreensão e avaliação dos efeitos sobre a biota (RASTETTER e GERHARDT, 2015; BORI et al., 2017).

Nesse sentido, a análise ecotoxicológica visa avaliar os efeitos na biota terrestre por meio de testes com organismos vivos expostos a contaminantes. Esse tipo de abordagem permite detectar a toxicidade da amostra como um todo, avaliando os efeitos combinados dos diferentes constituintes da amostra e, suas implicações nos organismos vivos. Mortalidade, comportamento e reprodução em organismos são algumas das variáveis avaliadas nesse tipo de análise.

Outra técnica atualmente avaliada, é a utilização de biomarcadores. Nesse tipo de análise ocorre a quantificação de parâmetros em nível de organismos, que busca avaliar a influência que os contaminantes podem exercer sobre vias bioquímicas e enzimáticas específicas. Isso permite estabelecer relações de causalidade entre o

agente tóxico e o comprometimento de múltiplos mecanismos de regulação fisiológica (OLIVEIRA, 2014).

Os ensaios ecotoxicológicos padronizados nos Brasil pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), empregam em sua maioria, minhocas como bioindicadores, que avaliam a sobrevivência, reprodução e comportamento de rejeição desses organismos aos contaminantes.

As minhocas são amplamente empregadas pois estão em constante contato com solo; residem em locais contaminados, permitindo validação em campo da disponibilidade química; a epiderme da minhoca é vascularizada, o que permite a absorção de contaminantes diretamente do solo; a minhoca ingere solo, fornecendo um meio dietético de contaminantes (NAHMANI et al., 2007). Além disso, as espécies *Eisenia fetida* (Savigny 1826, Oligochaeta, Lumbricidae) e *Eisenia andrei* (Bouché 1972, Oligochaeta, Lumbricidae) são de fácil cultivo podendo ser mantidas em laboratório, sob condições controladas, são tolerantes a diferentes ambientes e possuem ampla faixa de sensibilidade (CRESPO, et al.; 2012).

Diante disso, é fundamental a identificação e caracterização dos elementos tóxicos que existem no meio (solo), em termos toxicológicos, conhecendo os contaminantes e a respectiva dose-efeito, a qual descreve e quantifica a relação entre a exposição ao contaminante e os efeitos adversos na saúde pública e no ambiente. Estudos com essa ênfase são importantes para auxiliar na elaboração de novos padrões para legislação e para evitar a contaminação do solo e água.

Nesse sentido, buscou-se avaliar uma área receptora de efluente sanitário na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). A ocupação do campus universitário da UFSM é de intensa urbanização que gera uma elevada carga de efluentes líquidos, e como consequência tem-se a utilização de áreas de disposição dos dejetos, sem qualquer preocupação com as características de lançamento e o processo limitado de depuração natural.

Estudos de caráter ecotoxicológicos em ambientes terrestres ainda são relativamente incipientes, quando comparados com ambientes aquáticos, evidenciando a necessidade de se verificar possíveis situações de impactos sobre o solo, principalmente no que se refere a gestão e descarte de efluentes líquidos. Aliado a isso, o solo contaminado coletado do campo, é uma condição ambiental realista da contaminação do solo, sendo possível extrapolar para outros casos. Estudos nesse

sentido são importantes e valiosos pois fornecem materiais de referência originais necessários para esclarecer mecanismos de resposta de minhocas, sendo um trabalho base para aplicação de organismos na avaliação real da contaminação do solo por efluente.

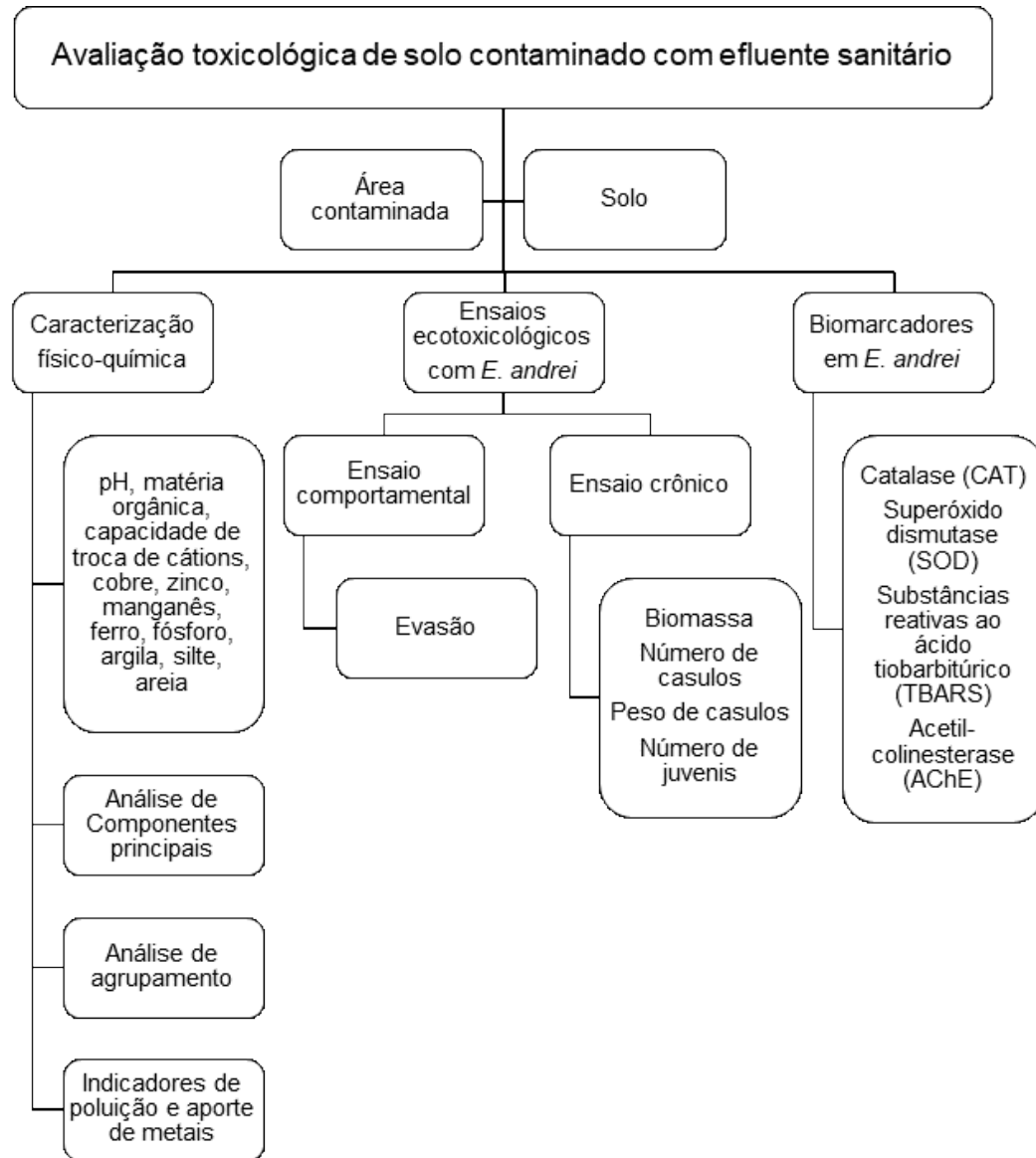
Para atingir os objetivos desta pesquisa, foram, inicialmente, propostos a coleta de solo em pontos estratégicos de uma área contaminada por efluente sanitário. De posse das amostras, o solo foi preparado para a realização dos ensaios ecotoxicológicos e determinação dos biomarcadores em organismos da espécie *Eisenia andrei*. A Figura 1-1 apresenta um fluxograma com as diversas etapas da realização do estudo.

O presente trabalho está constituído de uma breve revisão bibliográfica, apresentando os principais elementos teóricos necessários para o entendimento do assunto abordado. Os temas abordados na Figura 1-1 são discutidos na forma de dois artigos. O primeiro artigo teve como objetivo avaliar as alterações dos atributos do solo, em razão do descarte de efluente sanitário, de forma a complementar a avaliação de áreas que recebem esse tipo de resíduo e, avaliar os padrões de concentração e distribuição das variáveis analisadas no solo por meio de técnicas de estatística multivariada. Aliado a isso, verificou-se o emprego de índices de poluição e enriquecimento, objetivando descrever o aporte de metais na área de estudo.

O segundo artigo objetivou determinar os efeitos toxicológicos de uma área contaminada com efluente sanitário, na evasão, biomassa e reprodução das minhocas *Eisenia andrei* por meio de testes comportamentais e de toxicidade crônica, e de um conjunto de biomarcadores formado pelas enzimas antioxidantes, catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), de peroxidação lipídica da membrana celular (TBARS), e enzima neurotransmissora pela atividade da acetilcolinesterase (AChE).

Após a apresentação dos artigos, são apresentadas considerações finais sobre os assuntos abordados ao longo desse estudo, integrando as temáticas e contemplando os resultados dos dois artigos como um todo.

Figura 1-1 - Fluxograma representativo das diversas etapas de realização do estudo



Fonte: Autora (2017).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ATIVIDADES ANTRÓPICAS E GERAÇÃO DE EFLUENTES

No atual mundo globalizado tem-se observado que o crescimento populacional, aliado ao incremento das atividades humanas, tem acarretado um aumento na demanda por água e, conseqüentemente maior geração de efluentes.

A falta de sistemas de esgotamento sanitário conduz a um destino final inadequado, em sua forma bruta ou com tratamento simplificado, em corpos de água ou no solo. Em consequência desse lançamento, a qualidade da água e do solo poderá ser degradada, podendo trazer impactos ao meio ambiente e à saúde pública.

Os efluentes sanitários urbanos compreendem as águas servidas, utilizadas após o uso humano e, apresentam alterações nas suas características naturais. A caracterização dos efluentes varia em função do clima, situação social e econômica, e hábitos da população. Os efluentes contêm aproximadamente 99,9% de água. A fração restante inclui matéria orgânica carbonácea, nutrientes, podendo conter compostos orgânicos e inorgânicos, metais, fármacos, hormônios, e outros desreguladores endócrinos, protozoários, bactérias e vírus, ovos de helmintos, e outros organismos. (CAMPOS, 1999; von SPERLING, 2005).

Diante disso, tem crescido a necessidade de detecção, conhecimento e controle destes contaminantes, responsáveis por causar prejuízos à saúde humana, já que muitos podem possuir potencial de efeito mutagênico e cancerígeno, bem como, estresse nos ecossistemas, impactando diretamente a biota do local.

2.1.1 CONTAMINAÇÃO DO SOLO POR EFLUENTE SANITÁRIO

O solo é um sistema dinâmico e complexo que atua como habitat para organismos vivos e que presta inúmeros serviços ecológicos, razões pelas quais tem sido reconhecida a necessidade da sua proteção por políticas ambientais. Dentre as atividades que impactam os ecossistemas terrestres, destaca-se o lançamento de efluentes sanitários, causando a contaminação do ambiente terrestre e o conseqüente impacto na biota local e a saúde humana, visto os efluentes carregam inúmeros contaminantes em sua composição.

A disposição de efluentes no solo é umas das formas de tratamento e disposição final. Essa técnica é amplamente utilizada, devido principalmente, a dificuldade na construção de estações de tratamento de efluentes (ETE), possibilidade de reuso do efluente tratado, bem como, a carência de nutrientes nos solos receptores, diminuindo a necessidade de utilização de fertilizantes químicos, obtendo-se uma alta relação custo/benefício (CAMPOS, 1999).

No entanto, o solo apresenta capacidade de atenuação limitada devido ao efeito cumulativo do lançamento de resíduos e, muitos destes podem apresentar em suas composições elevadas concentrações de elementos tóxicos, tais como, metais pesados, contaminantes orgânicos e patógenos.

Além da capacidade de provocar alterações na qualidade do solo, com sua consequente contaminação, pode ocorrer a incorporação de metais pela biota edáfica e plantas, podendo causar sérios danos à saúde dos ecossistemas terrestres. Além disso, o solo sofre processos erosivos e de lixiviação, acarretando a mobilização destes para drenagens vizinhas, comprometendo à saúde da biota aquática (CAMARGO e BERTON, 2006; CESAR et al., 2008).

2.1.1.1 METAIS NA CONTAMINAÇÃO DO SOLO

Os metais são contaminantes inorgânicos que não podem ser biodegradados. A exposição a essas substâncias, mesmo em concentrações baixas, pode representar riscos à saúde humana, devido a sua capacidade de persistência e tendência de acumulação nos níveis tróficos da cadeia alimentar (NGUYEN et al. 2013). Além disso, podem afetar o desenvolvimento dos microrganismos que irão realizar o tratamento destes efluentes, além de serem potencialmente perigosos para o meio ambiente e a saúde pública (CAMARGO et al., 2007).

Diante disso, essas substâncias são responsáveis pela degradação da qualidade da água e do solo, que recebe os efluentes e, portanto, seu conhecimento se revela necessário para o planejamento de sistemas de tratamento de efluentes, conservação dos recursos naturais, e a possibilidade de causar algum dano à saúde pública, quando em contato com essas substâncias.

O Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) através da Resolução nº420/2009, definiu valores orientadores das concentrações de substâncias e elementos químicos, fornecendo orientações sobre as condições da qualidade do

solo. Estes critérios são definidos em função das propriedades químicas, e a qualidade do solo pode ser descrita como a capacidade do solo funcionar dentro dos limites ambientais, garantindo o sustento da produtividade biológica e a saúde animal e vegetal (DORAN e ZEISS, 2000).

No ambiente natural, há um grande número de contaminantes potencialmente tóxicos, sendo que cada um deles pode estar em um nível, em que, por si só, não consegue causar malefícios, mas a interação com outras substâncias pode acarretar um dano. Em razão da complexidade natural do ambiente (condições meteorológicas), é quase impossível prever exatamente o que ocorrerá com um agente químico quando este for liberado no ambiente (AZEVEDO e CHASIN, 2004).

Os metais quando descartadas no ambiente terrestre podem ser absorvidas ou até mesmo bioconcentradas pelos organismos ali presentes. Mudanças tanto na condição biológica, como no número, e até na biodiversidade das espécies refletem a presença de poluentes, fornecendo diagnóstico de qualidade do ambiente terrestre, porque apontam situação de estresse do ecossistema (ANDRÉA, 2010).

As tradicionais análises físico-químicas realizadas apenas quantificam substâncias isoladamente em uma amostra, já os testes de toxicidade permitem detectar a toxicidade da amostra como um todo, avaliando os efeitos combinados dos diferentes constituintes da amostra (ZHENG et al, 2013). Além disso, as implicações das substâncias nos organismos vivos não são avaliadas pelas análises físico-químicas, enquanto que com os ensaios ecotoxicológicos é possível determinar o potencial risco ambiental dos contaminantes nos ecossistemas (COSTA et al., 2008).

Em relação aos efluentes líquidos, com o intuito de evitar os problemas relacionados ao lançamento de efluentes sem tratamento em corpos receptores foi instituída a Resolução 357/2005 do CONAMA, que foi posteriormente complementada e alterada pela Resolução 430/2011 do CONAMA. Estes textos estabelecem os limites de substâncias e contaminantes em corpos d'água e classificam estes meios em função destas concentrações.

A Resolução 357/2005 do CONAMA determina ainda que sejam realizados ensaios ecotoxicológicos para avaliar as possíveis interações entre as substâncias. Estes testes também devem ser utilizados para investigar contaminantes não listados na Resolução, mas que são passíveis de causar danos aos seres vivos.

No entanto, não há exigências da utilização de ensaios ecotoxicológicos para avaliação de solos contaminados. Diante disso, há uma necessidade de se realizar

estudos nesse sentido, para o estabelecimento de novos padrões para a legislação, bem como, definir quais organismo e testes são mais sensíveis para a aplicação em áreas contaminadas.

2.2 ECOTOXICOLOGIA

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos causados por substâncias químicas sobre organismos vivos. A toxicologia tem como principais objetivos identificar os riscos associados a uma determinada substância e determinar em quais condições de exposição esses riscos são induzidos. (KNIE, et al., 2004; COSTA, et al., 2008).

Entre as diversas áreas da toxicologia, destaca-se a toxicologia ambiental. Essa subárea objetiva estudar os agentes químicos de origem antropogênica liberadas no ambiente e seus efeitos deletérios nos organismos, visando estratégias para interromper, reverter e remediar esses impactos (AZEVEDO e CHASIN, 2004).

Já a ecotoxicologia, uma área especializada da toxicologia ambiental, relaciona os efeitos tóxicos das substâncias químicas e dos agentes físicos sobre os organismos vivos, especialmente nas populações e nas comunidades de um ecossistema definido, incluindo os caminhos da transferência desses agentes e sua interação com o ambiente (AZEVEDO e CHASIN, 2004; PAUWELS et al., 2013).

2.2.1 BIOINDICADORES

Para a realização dos ensaios são utilizados organismos indicadores, que em função de suas características, apresentam um limite de tolerância ecológica muito pequena, assim, quando expostos a determinados contaminantes são capazes de apresentar alguma alteração fisiológica, morfológica e/ou comportamental (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

A vantagem do uso de bioindicadores está em seu baixo custo, podendo, inclusive, serem utilizados para a avaliação cumulativa de eventos ocorridos num determinado período de tempo, resgatando um histórico ambiental não passível de detecção ou medição por outros métodos.

A aplicação da ecotoxicologia se dá por meio de ensaios que permitem avaliar a toxicidade de substâncias sobre um ambiente, através da exposição de organismos vivos padronizados (CHASIN e PEDROZO, 2004).

Os ensaios ecotoxicológicos permitem avaliar a contaminação ambiental por diversas fontes de poluição e tem como vantagem, abranger uma grande variedade de substâncias biologicamente disponíveis em uma amostra através de um único ensaio. Possuem a capacidade de detecção inerente de efeitos deletérios produzidos por um agente tóxico ou mistura sobre organismos vivos, permitindo avaliar em que medida essas substâncias são nocivas (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

No entanto, estudos de caráter ecotoxicológicos em ambientes terrestres ainda são relativamente incipientes, quando comparados com ambientes aquáticos, e a maior parte dos estudos concentrando-se nos países nortenhos, evidenciando a necessidade de se verificar possíveis situações de impactos sobre o solo em países tropicais, principalmente no que se refere a gestão e descarte de efluentes líquidos.

Dentre os indicadores de qualidade do solo, estão os organismos edáficos, importantes na decomposição e a ciclagem de nutrientes, bem como, a regularização nos sistemas biológicos. Organismos edáficos mais estudados como bioindicadores destacam-se as minhocas (Oligochaeta). Esses organismos são maiores que 2mm (macrofauna do solo) com capacidade de influenciar diretamente no funcionamento do solo (LAVELLE et al., 2006).

Os organismos utilizados como bioindicadores podem ser coletados nas áreas impactadas (in situ) ou podem ser expostos a diferentes concentrações dos compostos químicos no próprio laboratório (in vitro), sendo posteriormente processado e realizado a análise das respostas bioquímicas (COGO et al., 2009).

2.2.1.1 *Eisenia sp.*

Dentre as espécies da fauna terrestre utilizadas para ensaios de toxicidade, pode-se destacar o gênero *Eisenia sp.* (Oligochaeta, Lumbricidae), vulgarmente conhecida como minhocas californianas ou vermelhas da Califórnia, por apresentar colorações na parte dorsal do corpo que variam de vermelho, vermelho escuro a marrom. Estas espécies de anelídeos são classificadas taxonomicamente no “Reino Animalia, Filo Annelida, Classe Clitellata, Ordem Haplotaxida e Família Lumbricidae” (COSTA, 2010).

As oligoquetas da espécie *Eisenia fetida* apresentam corpo listrado com a área ao redor da ranhura intersegmental sem nenhuma pigmentação aparentando amarelo ou pálido. Já a espécie *Eisenia andrei* apresenta metamorfose uniformemente avermelhada. Além da diferença na pigmentação, as duas oligoquetas são morfologicamente semelhantes, com performances e ciclos de vida não diferindo significativamente, embora a taxa de crescimento e produção de casulos serem ligeiramente mais elevada na *E. andrei* (DOMÍNGUES et al. 2004; LOSADA et al., 2005).

Residem naturalmente na camada superficial do solo, em esterco animal e material de compostagem. São organismos edáficos participantes dos processos de agregação do solo e decomposição de resíduos vegetais, atuando na manutenção da fertilidade e qualidade dos solos de ecossistemas agrícolas e naturais. Quando é ameaçada a minhoca secreta pelos poros, da superfície superior do corpo, uma substância fétida amarela que age em defesa do animal, afastando possíveis predadores (NAHMANI et al., 2007; COSTA, 2010).

As oligoquetas são densamente utilizadas para a avaliação da contaminação do solo, devido à grande quantidade de solo que ingerem, demonstrando capacidade de acumulação de poluentes. Além disso, são simples de serem estudadas e possuem ampla disponibilidade nos solos brasileiros (RAMOS et al., 2007). Possuem capacidade de triturar a matéria orgânica e produzir húmus de excelente qualidade, facilitando a entrada de água e ar no solo, ajudando no combate a erosão e na recuperação de solos degradados (NAHMANI et al., 2007).

Os procedimentos para execução dos testes ecotoxicológicos com minhocas são estabelecidos por normas nacionais e internacionais. Atualmente no Brasil, a NBR 15537 (2014) e NBR ISO 17512-1 (2012) tratam da aplicação de ensaios com minhocas para uma avaliação da toxicidade aguda e do comportamento, respectivamente. Porém, há padrões internacionalmente reconhecidos propostos pela ISO (International Organization for Standardization) e OECD (Organization for Economic Co-operation and Development).

Conforme Sisinno (2006), dentre os testes ecotoxicológicos, o ensaio de comportamento (ensaio de evasão) pode ser aplicado como um método rápido para determinar a biodisponibilidade de substâncias químicas ou de contaminantes no solo em que o evitamento é usado como indicador de qualidade do solo. Embora seja um ensaio simples e rápido, seu significado ecológico é importante, pois a fuga indica

rejeição do local e a diminuição da população por um agente estressor como a contaminação.

Ensaio de toxicidade para efeito agudo (mortalidade) são aqueles que avaliam doses elevadas de contaminantes por um curto período de exposição, que pode variar de 24h a 14 dias. Geralmente, o efeito observado é a letalidade, porém, pode-se observar outras manifestações, como a diminuição da mobilidade (SISINNO, 2006).

Os ensaios de toxicidade crônica (teste de reprodução) avaliam os efeitos de concentrações inferiores de contaminantes por um longo período de exposição, variando de 4-7 semanas. Os efeitos são subletais e observados em situações em que a concentração do agente tóxico, às quais os organismos ficam expostos, permitem sua sobrevivência, entretanto afetam uma ou várias de suas funções biológicas, interferindo por exemplo, na reprodução, desenvolvimento de ovos e no crescimento (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). É o ensaio mais sensível, sendo considerado o de maior relevância para a previsão dos impactos sobre os ecossistemas, uma vez que demonstra a dinâmica da população ao longo do tempo (ŽALTAUSKAITĖ; SODIENĖ, 2010), além de ser padronizados pela OECD 222 (OECD, 2004) e ISO 11268-2 (ISO, 2012).

2.3 BIOMARCADORES

A quantificação de parâmetros em nível de organismos expostos a contaminantes é atualmente uma técnica de avaliação de toxicidade que busca avaliar a influência que as substâncias podem exercer sobre vias bioquímicas e enzimáticas específicas. Isso permite estabelecer relações de causalidade entre o agente tóxico e o comprometimento de múltiplos mecanismos de regulação fisiológica (OLIVEIRA, 2014).

Entre os principais parâmetros utilizados como biomarcadores estão os de estresse oxidativo, através da avaliação da atividade das enzimas antioxidantes. O processo de estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Isso leva a oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (BARBORA et al., 2010).

Os mecanismos de geração de radicais livres, também conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO), ocorrem naturalmente nas células. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres. As ERO incluem íons de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH\cdot$) e oxigênio singuleto (O_2).

O superóxido é gerado continuamente por diversos processos celulares (cadeia de transporte de elétrons e no microsomo), ou pela redução monoelétrica de O_2 , e rapidamente desaparece em solução aquosa por reação de dismutação (VASCONCELOS et al., 2007).

O peróxido de hidrogênio é um intermediário formado pela reação de dismutação de O_2^- catalisada pela enzima superóxido dismutase pela redução de $2e^-$ na molécula de O_2 e pela ação de diversas enzimas oxidases in vivo, localizadas nos peroxissomos. É muito difusível dentro e entre as células in vivo. É um fraco agente oxidante e um fraco agente redutor, reage lentamente com tióis, com sais de ferro e cobre reduzidos, com proteínas heme e peroxidases para iniciar reações radicalares e peroxidações lipídicas. Em presença de metal de transição gera $OH\cdot$, através da reação de Fenton (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS et al., 2007; COGO et al., 2009).

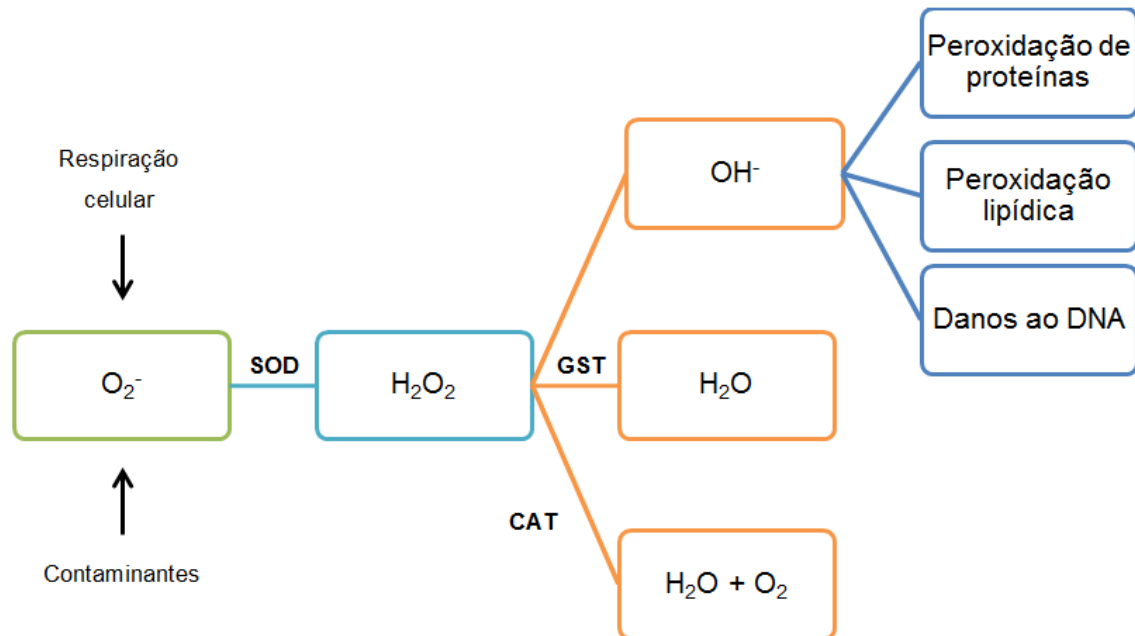
O radical hidroxila é o mais reativo e mais lesivo radical conhecido e para o qual, uma vez formado, os organismos não dispõem de mecanismo de defesa. Reage com uma série de endobióticos, causa modificação no DNA (com modificação das bases e quebras das fitas), danos nas proteínas e inativação enzimática e peroxidação lipídica (VASCONCELOS et al., 2007).

O oxigênio singuleto é o estado eletronicamente excitado do oxigênio, produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações; e reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lipídeos da membrana, iniciando processos de peroxidação (VASCONCELOS et al., 2007).

O sistema de defesa antioxidante, atua através da regulação das defesas, impedindo previamente que as ERO causem danos à célula. Esse sistema inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST). Tais substâncias agem diretamente, prevenindo, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a

ocorrência de danos oxidativos. A Figura 2-1 apresenta um esquema da formação das ERO e a função das enzimas antioxidantes no processo.

Figura 2-1 - Esquema de defesa antioxidante



Fonte: Autora (2017).

A superóxido dismutase (SOD) é uma das principais enzimas utilizadas no combate ao dano oxidativo das espécies reativas de oxigênio (COGO et al., 2009). Esta enzima tem um importante papel antioxidante, já que catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A catalase é uma enzima antioxidante que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). A elevada atividade da catalase geralmente está relacionada com uma alta proliferação de peroxissomos e acredita-se que as espécies reativas de oxigênio não induzam, por si só, altas atividades desta enzima. Assim, a proliferação de peroxissomos aumenta a concentração de espécies reativas de oxigênio (OLIVEIRA, 2014).

Outra enzima largamente utilizada como biomarcador em estudos ecotoxicológicos é a acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima desempenha uma função central no mecanismo de neurotransmissão, uma vez que promove a clivagem do neurotransmissor acetilcolina após sua liberação nas fendas sinápticas durante a transmissão colinérgica (OLIVEIRA, 2014). Quando a atividade de AChE é inibida de

alguma forma, ocorre o bloqueio na transmissão de impulsos nervosos, paralisando as funções vitais devido à sobreposição dos impulsos nervosos, causados pela permanência dos canais de Na⁺ abertos (STENESH, 1998).

Quando ocorre a peroxidação lipídica das membranas celulares devido ao estresse oxidativo, a extensão dessa lesão pode ser medida através dos níveis de espécies reativas de ácido tiobarbitúrio (TBARS), que corresponde ao malondialdeído (MDA), produto da degradação peroxidativa de lipídios das membranas (NUNES et al., 2006). O malondialdeído não só reflete o grau de produção de radicais livres, mas também indica a extensão da peroxidação lipídica. E indiretamente reflete o nível de radicais livres de oxigênio ativo na célula e o grau de dano das células (ZHOU et al., 2016).

3 ARTIGO 1 – ATRIBUTOS DO SOLO E APLICAÇÃO DE ANÁLISE MULTIVARIADA PARA AVALIAÇÃO DE UMA ÁREA CONTAMINADA POR EFLUENTE SANITÁRIO

RESUMO

O descarte de efluentes sanitários não tratados no solo, traz inúmeras consequências ambientais e à saúde humana. O objetivo deste estudo foi investigar o estado atual de contaminação do solo por lançamento de efluente sanitário, em uma área localizada em Santa Maria/RS com auxílio de ferramentas estatísticas (análise de componentes principais e de agrupamento) e índices de poluição e aporte de metais pesados. Foram coletadas seis amostras, e posteriormente foram determinados os atributos físico-químicos do solo. Os resultados revelaram uma notável variação dos atributos dentro da área de estudo. A análise de componentes principais auxiliou na determinação da origem dos metais na área, indicando que as concentrações de Cu e Zn são provenientes de fontes antropogênicas, ligada ao descarte de esgoto, enquanto que os teores de Mn e Fe provem da litologia. A análise de agrupamento permitiu avaliar a similaridade entre os pontos amostrados, sugerindo que a entrada, seção intermediária e saída da área, eram semelhantes, ou seja, os atributos eram semelhantes nesses pontos. Os índices de poluição e aporte de metais pesados, indicou que em alguns pontos da área, ocorre a introdução de Cu e Zn e a consequente acumulação destes metais na área. Por fim, este estudo contribuiu para identificar as fontes de contaminação, visando priorizar ações de recuperação de áreas contaminadas por efluente sanitário.

Palavras-chave: Metais pesados. Análises multivariadas. Avaliação da poluição.

ARTICLE 1 – SOIL ATRIBUTES AND APPLICATION OF MULTIVARIATE ANALYSIS FOR EVALUATION OF A CONTAMINATED AREA BY SEWAGE

ABSTRACT

The disposal of untreated sanitary effluents in the soil brings numerous environmental and human health consequences. The objective of this study was to investigate the current state of soil contamination by sanitary effluent discharge, in an area located in Santa Maria / RS with the aid of statistical tools (analysis of main components and grouping) and indices of pollution and supply of metals heavy. Six samples were collected, and the physical-chemical attributes of the soil were determined. The results revealed a remarkable variation of attributes within the study area. Principal components analysis assisted in the determination of the origin of the metals in the area, indicating that the concentrations of Cu and Zn are derived from anthropogenic sources, linked to the discharge of sewage, while the Mn and Fe contents come from lithology. The cluster analysis allowed to evaluate the similarity between the points sampled, suggesting that the entrance, intermediate section and exit of the area were similar, that is, the attributes were similar in these points. The rates of pollution and heavy metals input indicated that in some points of the area, the introduction of Cu and Zn occurs and the consequent accumulation of these metals in the area. Finally, this study contributed to identify sources of contamination, aiming to prioritize actions to recover areas contaminated by sanitary effluent.

Keywords: Heavy metals. Multivariate analyzes. Pollution assessment.

3.1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, o ambiente tem sido exposto à contaminação por agentes tóxicos diversos devido à ação do homem. Impactos ambientais, como contaminação do solo e das águas superficiais e subterrâneas, ocorrem principalmente por indústrias desativadas, vazamentos de contaminantes, uso de agrotóxicos e disposição inadequada de resíduos sólidos e líquidos. Em relação aos efluentes líquidos, estes transportam elevadas cargas de poluentes (MAPANDA et al., 2005; RATTAN et al., 2005; ULLAH et al., 2012; BECERRA-CASTRO et al., 2015).

Conforme divulgado no relatório do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento de 2014 (BRASIL, 2016), o índice médio de coleta de efluentes é de 57,6% nas áreas urbanas brasileiras. Quanto ao tratamento dos esgotos, o índice do país chega a 40,8% para a estimativa dos esgotos gerados, ou seja, menos da metade dos efluentes não recebe tratamento, indicando que o país ainda não apresenta níveis adequados de tratamento de efluentes. A falta de sistemas de esgotamento sanitário conduz a um destino final inadequado, em sua forma bruta ou com tratamento simplificado, nos recursos hídricos e no solo.

Os efluentes são produzidos como resultado das múltiplas atividades humanas, tais como usos domésticos, comerciais e industriais, e sua composição varia em função do clima, situação social e econômica, e hábitos da população. Os efluentes contêm aproximadamente 99,9% de água. A fração restante inclui matéria orgânica carbonácea, nutrientes, podendo conter compostos orgânicos e inorgânicos, metais, fármacos, hormônios, bactérias e vírus (HENZE e COMEAU, 2008).

O despejo de efluentes sanitários no solo tem sido uma prática comum ao redor do mundo (LIU et al., 2005; MAPANDA et al., 2005; RATTAN et al., 2005). As consequências desses lançamentos podem trazer implicações em dois níveis diferentes: alterar as propriedades físico-químicas e microbiológicas, e por sua vez afetar a produtividade e fertilidade do solo; e introduzir e contribuir para a acumulação de contaminantes químicos, tais como os metais, representando sérios riscos ambientais e à saúde humana (BECERRA-CASTRO et al., 2015).

Embora seja de conhecimento que os metais ficam imobilizados no solo, alguns fatores como as propriedades dos metais, a textura do solo (argila, silte e areia), pH, e as cargas elétricas na solução do solo (CTC) podem influenciar sua mobilidade (UDOM et al., 2004), podendo ocorrer a lixiviação destes metais para águas

subterrâneas e superficiais, alterando seus padrões significativamente (MARION, 2011).

Aliado a isso, metais como Cu e Zn são nutrientes essenciais das plantas e a adição de resíduos de esgoto em solos de baixa fertilidade pode fornecer quantidades benéficas desses metais, que são normalmente escassos. No entanto, com o despejo prolongado, os metais podem se acumular em níveis fitotóxicos e resultar em crescimento reduzido da planta e ainda podem se acumular na cadeia trófica (UDOM et al., 2004).

A abundância de fontes de contaminação resulta em pressões químicas que muitas vezes se manifesta como altas concentrações ou cargas de poluição, o que conseqüentemente tem impactos. Identificar a distribuição espacial e as fontes de contaminação por metais, auxilia para a remediação dos solos, avaliação de risco da contaminação e recomendações efetivas de manejo.

Em função do processo histórico de ocupação do Campus Camobi da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), a degradação de recursos naturais tem chamado atenção de pesquisadores e gestores da instituição. Dentre os problemas observados no Campus, pode-se citar a presença de sistemas de tratamento de efluentes subdimensionados e obsoletos à realidade do consumo de água e da produção de efluentes líquidos.

Atualmente existe no Campus uma área que recebe o lançamento de efluentes sanitários sem tratamento prévio ou com um tratamento simplificado. Esta área já foi objeto de estudos por Marion (2011), e Araújo et al. (2015). Os autores buscaram avaliar as águas superficiais e subterrâneas, despejos de efluente e vulnerabilidade dos aquíferos. No entanto, faz-se necessário avaliações do solo e os impactos sobre esse, devido o lançamento de efluentes sanitários.

Diante da natureza complexa do solo e dos efluentes, avaliar a extensão e o grau de contaminação, representa um desafio aos pesquisadores. Com isso as análises estatísticas multivariadas podem ser ferramentas úteis que auxiliam a compreensão dos inúmeros processos envolvidos, uma vez que este tipo de análise considera o comportamento de três ou mais variáveis ao mesmo tempo.

O objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações dos atributos do solo, em razão do descarte de efluente sanitário, de forma a complementar a avaliação de áreas que recebem esse tipo de resíduo e, avaliar os padrões de concentração e distribuição das variáveis analisadas no solo por meio de técnicas de estatística

multivariada. Aliado a isso, verificou-se o emprego de índices de poluição e enriquecimento, objetivando descrever o aporte de metais na área de estudo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Localização e descrição da área de estudo

O estudo foi conduzido em uma área localizada no Campus Camobi da Universidade Federal de Santa Maria, na Bacia Escola Campus, próximo à Biblioteca Central e aos prédios da Casa do Estudante, em Santa Maria/RS.

Nesta área, de cerca de 1.700 m², ocorre o lançamento contínuo de efluente sanitário diretamente na superfície do solo, que é previamente tratado em tanque séptico seguido de filtro anaeróbico. O efluente escoam por zonas de fluxos preferenciais até atingir um curso d'água, denominado Sanga Lagoão do Ouro.

Na área existem quatro tubulações denominadas fontes pontuais de lançamento de efluentes: FP-31, FP-32, FP-31A e FP-50. O efluente líquido lançado pela fonte pontual FP-31 constitui-se de esgoto doméstico, proveniente da Casa do Estudante (CEU) e, industrial, gerado pelo Restaurante Universitário (RU). O efluente é tratado, logo após, é lançado, por meio de uma tubulação de 30m até a área de estudo.

Na Figura 3-1 apresenta-se os pontos de lançamento do efluentes líquidos no solo, de efluentes diluídos no solo, do efluente do canal de drenagem até a Sanga Lagoão do Ouro. A porção delimitada representa a área que está sobre influência direta dos efluentes líquidos que escoam pelo solo.

O efluente da fonte FP-32 é proveniente de alguns prédios da UFSM e da reitoria. O efluente assim como o da fonte FP-31, recebe tratamento antes de ser lançado no solo. Além disso, pode ter eventuais contribuições de efluentes de laboratórios de ensino e pesquisa da instituição

A fonte pontual FP-31A está localizada próxima à FP-31 e apresenta-se “afogada”, formando um canal de escoamento do efluente. Conforme estudo realizado por Araújo et al. (2015), não se sabe a origem desse efluente, no entanto, apresenta as maiores vazões com características de esgoto sanitário sem tratamento.

Figura 3-1 – Localização das fontes pontuais de esgoto e pontos de amostragem de solo na área de estudo



Fonte: Autora (2017).

A fonte FP-50 é composta por duas tubulações, dispostas em paralelo, e este efluente tem origem nos prédios da CEU e tem características de esgoto doméstico.

O efluente das fontes pontuais escoam até alcançar uma área de acúmulo no solo. Logo após, ocorre à saída de esgoto da zona saturada por um canal de drenagem (CDE) que é um canal que escoam até encontrar a Sanga Lagoão do Ouro, tributário do rio Vacacaí Mirim.

3.2.2 Amostragem de solo e análise físico-química

A amostragem do solo foi realizada no mês de agosto de 2016, e buscou-se coletar amostras visando avaliar o local onde os efluentes são despejados, infiltram e acumulam-se no solo, e na região onde forma um fluxo de descarte para o canal de drenagem.

Na coleta de solo, foram amostrados seis pontos na área de estudo por meio de coletas simples deformadas, na profundidade de 0-15 cm. O primeiro ponto de coleta, denominado P4, foi retirado logo após o lançamento de efluentes pelas pontes

pontuais FP31, FP31A e FP32. Esse ponto é totalmente assoreado e ocorre o desprendimento de gases malcheirosos, com vegetação em seu entorno. O segundo ponto (P2) foi retirado próximo à fonte FP50. O terceiro ponto, denominado P3, foi retirado ao leste da fonte FP-50 e nesse local também ocorre a presença da macrófita aquática. O quarto ponto (P1) foi retirado ao norte da fonte FP-50, no centro da área de estudo. Esse ponto apresentou-se saturado de esgoto, com coloração preta, desprendimento de gases malcheirosos, e presença da *T. domingensis*. O quinto ponto (P5) amostrado na área localizou-se na saída do canal de drenagem (CDE), a jusante dos pontos de lançamento. O último ponto (P6) foi retirado próximo a área de estudo, ao sul da fonte FP-50, porém sem a influência das fontes pontuais de efluentes (Figura 3-1).

Foram coletados aproximadamente 5 kg de solo em cada ponto, e logo após a coleta, as amostras seguiram para o Laboratório de Meio Ambiente (LEMA), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). As amostras foram secas ao ar, peneiradas em malha de 2mm, e posteriormente seguiram para caracterização físico-química.

Foram determinados pH (potencial hidrogeniônico), matéria orgânica (MO), capacidade de troca de cátions (CTC) e fósforo (P), conforme metodologias propostas por Tedesco et al. (1995), além das porcentagens de argila, silte e areia (EMBRAPA, 1997). Os teores disponíveis de cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe) foram extraídos com EDTA, conforme Chaignon et al. (2009). As análises foram determinadas em triplicatas.

3.2.3 Análise estatística

Após a obtenção dos resultados dos atributos, os dados foram submetidos a análise estatística descritiva e multivariada utilizando a linguagem e ambiente *R Core Team* – Versão 3.3.1 (AUSTRIA, 2016). Foram determinados os mínimos, máximos, médias, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV) e assimetria. Além disso, verificou se os dados seguiram distribuição normal pela aplicação do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnoff a 5% de significância.

Além da estatística descritiva, empregou-se análise bivariada por meio da determinação da correlação de Pearson. O resultado do coeficiente de Pearson foi

apresentado por meio de matriz de correlações e foram considerados correlacionados os atributos que apresentaram valor maior que 0,50.

A estatística multivariada foi realizada pela análise de componentes principais (ACP) e análise de agrupamento (AA) para identificar a relação entre os atributos do solo.

3.2.3.1 Análise de Componentes Principais (ACP)

A ACP pode ser usada para reduzir dados e extrair um número menor de fatores independentes (componentes principais) para analisar relações entre os atributos do solo.

Para uma ACP eficiente, o número de observações deve ser maior que o número de variáveis utilizadas na análise. Em função disso, selecionou-se apenas os metais pesados (Cu, Zn, Mn e Fe), visando avaliar a origem destes na área de estudo.

Inicialmente, os dados dos atributos foram padronizados em escala Z, para diminuir a influência das diferentes unidades de medida, tornando os dados adimensionais. A ACP foi realizada com rotação varimax e normalização Kaiser, e a seleção do número de componentes principais foi baseada no critério de análise da qualidade de aproximação da matriz de correlações, utilizando-se os componentes associados a autovalores superiores a 1 (CAI, et al., 2013; LI et al., 2013).

De acordo com Liu et al. (2003), os pesos dos fatores foram classificados em forte, médio e fraco, correspondendo aos valores absolutos iguais a $>0,75$; $0,50-0,75$ e $0,50-0,30$, respectivamente. Com isso, foram consideradas as variáveis que possuísem valores de peso maiores que 0,75, sendo consideradas as mais importantes na variância dos metais encontrados.

3.2.3.2 Análise de Agrupamento (AA)

A análise de agrupamento permite o agrupamento das populações com características similares e permitem a obtenção de um melhor entendimento das variações dos processos que ocorrem no solo (HU et al, 2013).

A AA, frequentemente acoplada a ACP, auxilia na verificação dos resultados e no agrupamento de variáveis individuais. Neste trabalho, utilizou-se a AA para agrupar os pontos de amostragem semelhantes, buscando avaliar a semelhantes entre esses

locais. Para tanto, utilizou-se os atributos que mais explicassem as variações orgânicas e de metais na área. Esse grupo foi composto pelo pH, e teores de MO, P, Cu, Zn e Mn do solo.

Inicialmente, os dados foram padronizados em escores z, logo após foi calculada a distância euclidiana para medir a extensão entre aglomerados, e o método de Ward foi utilizado para agrupar os grupos semelhantes.

3.2.4 Indicadores de poluição e aporte de metais pesados no solo

O estado da poluição e a influência das atividades humanas sobre o acúmulo de metais pesados podem ser avaliados por meio de índice de poluição, índice de poluição integrado, índice de geoacumulação e fator de enriquecimento.

3.2.4.1 Índice de poluição (IP) e Índice de Poluição Integrado (IPI)

O nível de poluição de um metal pesado pode ser avaliado pelo IP, em que é dado pela Equação 1:

$$IP = C_i/C_{ref} \quad (1)$$

sendo: IP = Índice de poluição; C_i = concentração do metal medida (mg/kg); C_{ref} = valor de referência (mg/kg).

O IP é classificado como baixo ($IP < 1$), médio ($1 < IP < 3$) e alto ($IP > 3$). Já o IPI é a média dos IP para os metais analisados, e seus valores são classificados como baixo ($IPI < 1$), médio ($1 < IPI < 2$) ou alto ($IPI > 2$) (CAI et al., 2013).

Para esse trabalho foram utilizados os teores de Cu e Zn para determinação do IP e IPI em cada ponto de amostragem, buscando analisar como se dá a dinâmica de poluição na área avaliada. Além disso, utilizou-se como concentração de referência, os valores do ponto de amostragem P6, sem influência do lançamento de efluentes.

3.2.4.2 Índice de Geoacumulação (IGEO)

O IGEO é um método para avaliar a contaminação do ambiente por metais pesados (MULLER, 1969). Este índice é calculado da seguinte forma, conforme a Equação 2:

$$IGEO = \log_2(C_i/1,5 \times C_{ref}) \quad (2)$$

sendo: *IGEO* = Índice de Geoacumulação; C_i = concentração do metal medida (mg/kg); C_{ref} = valor de referência (mg/kg).

Muller (1969) elaborou sete classes descritivas para os valores crescentes de IGEO, conforme apresentado no Quadro 3.1:

Quadro 3.1 - Classificação do Índice de Geoacumulação

Classes	IGEO	Qualidade do solo
0	$IGEO \leq 0$	Não poluído
1	$0 < IGEO \leq 1$	Não poluído a moderadamente poluído
2	$1 < IGEO \leq 2$	Moderadamente poluído
3	$2 < IGEO \leq 3$	Moderadamente poluído a poluído
4	$3 < IGEO \leq 4$	Muito poluído
5	$4 < IGEO \leq 5$	Muito poluído a altamente poluído
6	$IGEO > 5$	Altamente poluído

Fonte: Adaptado de Muller (1969).

Os valores de IGEO foram calculados para Cu e Zn em cada amostra do solo em relação ao valor de referência encontrado para P6, sem a presença de esgoto.

3.2.4.3 Fator de Enriquecimento (FE)

O Fator de Enriquecimento é outra estimativa para diferenciar elementos provenientes de atividades humanas e de origem natural e, avaliar o grau de influência antropogênica no ambiente (LU et al., 2014). É calculado pela Equação 3:

$$FE = \frac{\left(\frac{C_i}{C_{ref}}\right)_{amostra}}{\left(\frac{C_i}{C_{ref}}\right)_{local}} \quad (3)$$

sendo: FE = Fator de Enriquecimento; C_i = concentração do metal em estudo no solo (mg/kg); C_{ref} = concentração do metal de referência (mg/kg).

Para este estudo, escolheu-se como metal de referência o manganês devido a sua grande disponibilidade e baixa mobilidade natural no solo (CHEN et al., 2015). Os valores de FE foram calculados para Cu e Zn em cada amostra do solo em relação ao valor de referência encontrado para P6, sem a presença de esgoto. Geralmente, os solos podem ser classificados de acordo com os valores do FE conforme apresentado no Quadro 3.2:

Quadro 3.2 - Classificação do Fator de Enriquecimento

Classes	Qualidade do solo
$FE < 2$	Enriquecimento mínimo
$2 \leq FE < 5$	Enriquecimento moderado
$5 \leq FE < 20$	Enriquecimento significativo
$20 \leq FE < 40$	Enriquecimento alto
$FE \geq 40$	Enriquecimento extremamente alto

Fonte: LU et al. (2014).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Atributos físico-químicos do solo

A determinação dos atributos do solo é de fundamental importância para a caracterização, avaliação e entendimento de como o solo se comporta com o lançamento de efluente.

A Tabela 3.1 apresenta os resultados obtidos a partir da análise estatística descritiva dos atributos físico-químicos do solo na área contaminada de estudo. As variáveis analisadas na área de estudo foram normalmente distribuídas conforme teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnoff. Além disso, os valores numéricos dessas variáveis estão detalhados no Apêndice A.

Tabela 3.1 – Análise estatística descritiva dos atributos do solo da área de estudo

Variáveis	Mínimo	Máximo	Média	DP	CV (%)	Assimetria	Teste K-S*
pH _{H2O}	4,09	5,27	4,55	0,45	9,76	0,26	0,9381

MO (%)	1,95	6,67	3,69	2,14	57,87	0,57	0,6699
CTC (cmolc)	6,98	22,06	13,51	5,15	38,12	0,56	0,9429
Cu (mg kg⁻¹)	2,01	7,96	4,23	2,48	58,67	0,46	0,6136
Zn (mg kg⁻¹)	4,13	37,62	19,62	16,32	83,17	0,03	0,5122
Fe (mg kg⁻¹)	208,20	498,80	366,9	104,78	28,56	-0,15	0,9525
Mn (mg kg⁻¹)	6,10	43,50	29,86	14,34	48,02	-0,79	0,7065
P (mg kg⁻¹)	7,45	95,19	36,64	31,61	86,28	1,16	0,7708
Argila (%)	4,60	30,00	21,15	9,04	42,77	-1,03	0,7240
Silte (%)	12,80	60,60	35,90	17,02	47,41	0,18	0,9607
Areia (%)	9,40	82,60	42,97	25,61	59,60	0,22	0,9919

* Teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnoff à nível de significância de 5%. Obs: DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Fonte: Autora (2017).

O pH não variou muito entre as amostras de solo, mantendo-se ácido entre 4,09 e 5,27, com média de 4,55. As mudanças que ocorrem no pH do solo após a aplicação de esgoto estão relacionadas com a quantidade de carbonato de cálcio existente no esgoto e a produção de ácidos durante a decomposição do efluente rico em matéria orgânica, como é o caso do efluente doméstico (SINGH et al., 2011).

Os teores de MO dos solos variaram de 1,95% a 6,67%, com concentração média de 3,39%. A adição de matéria orgânica, pelo esgoto doméstico melhora várias propriedades, tais como a densidade aparente, porosidade e capacidade de retenção de água. Além disso, ela pode complexar contaminantes, tais como metais pesados, tornando-os indisponíveis para serem assimilados pelos organismos vivos ou carregados para os recursos hídricos (RATTAN et al., 2005; SINGH et al., 2011).

A CTC apresentou valores médios, variando de 6,98 a 22,06 cmol kg⁻¹, com média de 13, cmol kg⁻¹. A CTC tem um importante papel nas funções do solo., sendo responsável pelas trocas elétricas na superfície das partículas do solo, podendo ser influenciada pelo pH, matéria orgânica e pelos tipos de argilominerais que compõem o solo. Aliado a isso, a CTC auxilia na retenção de nutrientes essenciais as plantas, devido a criação de sítios catiônicos (FERRAREZI, 2009; SINGH et al., 2011).

Em relação aos metais, o teor de Cu variou de 2,01 a 7,96 mg kg⁻¹ com média de 4,23 mg kg⁻¹. O Zn apresentou teor médio de 19,62 mg kg⁻¹, variando de 4,13 à 37,62 mg kg⁻¹. O Fe foi o metal que apresentou os maiores valores, variando de 208,2 a 498,80 mg kg⁻¹ e média de 366,90 mg kg⁻¹. Enquanto o Mn variou de 6,10 a 43,50 mg kg⁻¹, com teor médio de 29,86 mg kg⁻¹. Os valores de Mn e Fe são provenientes

principalmente das formações compostas por materiais silto argilosas e arenosas da rocha mãe (RECKZIEGEL, 2012). O valor médio do conteúdo total de metais nos solos seguiu uma ordem decrescente com $Fe > Mn > Zn > Cu$.

Os teores de Zn e Cu foram comparados com os valores orientadores da Portaria N° 85/2014, que dispõe sobre os valores de referência de qualidade (VRQ), para as diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul. O valor máximo de Cu ficou abaixo do preconizado para região da depressão periférica. No entanto, para o Zn que apresentou valor máximo de 37,62 mg/kg, ficou acima da normativa que estabelece 29 mg/kg, porém abaixo do valor de prevenção de 300 mg/kg da Resolução N° 420/2009. É importante destacar que os metais foram avaliados por suas formas biodisponíveis, sendo possível maiores concentrações para frações totais.

O fósforo apresentou valor médio de 36,64 mg/kg e os maiores valores foram encontrados na entrada, seção intermediária e final da área de estudo. O fósforo é um importante macronutriente para as plantas, mas por outro lado, em grandes quantidades pode trazer problemas de eutrofização dos corpos d'água.

Os teores de argila, silte e areia nas amostras de solo apresentaram valores médios de 21,15%, 35,90% e 42,97%, respectivamente. A grande variabilidade da textura do solo na área é devido a característica particular de planícies de inundação de um canal fluvial. As bordas da área apresentam as maiores porcentagens de areia, enquanto no centro onde o solo está saturado (planície de inundação), encontram-se as frações mais finas, composto por argila e silte, depositadas pela influência antropogênica e pelo canal de drenagem (RECKZIEGEL, 2012).

Em todas as variáveis, com exceção do pH, apresentaram altos coeficientes de variação, indicando a variabilidade das concentrações desses elementos na área. O pH, MO, CTC, P, silte, areia, Cu e Zn apresentaram assimetria à direita (positiva), o que significa que esses elementos se inclinam positivamente para concentrações mais baixas.

Para fins de comparação, na Tabela 3.2 está apresentada a caracterização físico-química de alguns solos receptores de efluente em estudos realizados por outros autores. Observa-se que na área do presente estudo, a MO e a CTC foram superiores aos valores dos outros trabalhos, evidenciando que o esgoto lançado na área é rico em matéria orgânica. Em contrapartida, os metais foram encontrados em menor quantidade, com exceção de Mn e Fe provenientes da rocha mãe.

Tabela 3.2 - Comparação dos atributos do solo em outros estudos com efluente

Variáveis	Estudo	Udom et al., (2004)	Mapanda et al., (2005)	Rattal et al., (2005)	Ullah et al. (2012)
pH _{H2O}	4,55	5,2	5,1-8,2	7,5	7,9
MO (%)	3,69	2,89	1,1	0,65	-
CTC (cmolc)	13,51	9,0	10,4	-	-
Cu (mg kg ⁻¹)	4,23	42	7-44	7,04	51,42
Zn (mg kg ⁻¹)	19,62	112	14-58	9,28	55,87
Fe (mg kg ⁻¹)	366,9	-	-	43,1	-
Mn (mg kg ⁻¹)	29,86	-	-	4,19	-
Argila (%)	21,15	28	13	18	-
Silte (%)	35,90	12	7	8-28	-
Areia (%)	42,97	60	80	56-86	-

Fonte: Autora (2017).

3.3.2 Correlação de Pearson

O pH teve forte correlação com quase todos os atributos, com exceção da CTC, Cu e Zn. Já as correlações negativas com os metais, indica que o aumento do pH implica uma redução das frações de metais pesados disponíveis, que por sua vez, reduz a toxicidade em microrganismos e plantas (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Matriz de correlações de Pearson entre os atributos do solo

	pH	MO	CTC	Cu	Zn	Fe	Mn	P	Argila	Silte	Areia
pH	1,000										
MO	-0,609	1,000									
CTC	-0,259	0,666	1,000								
Cu	-0,033	0,304	-0,258	1,000							
Zn	-0,204	0,532	0,037	0,948	1,000						
Fe	-0,568	-0,300	-0,327	-0,270	-0,278	1,000					
Mn	-0,809	0,324	0,292	-0,510	-0,344	0,638	1,000				
P	-0,537	0,724	0,657	0,397	0,660	-0,031	0,189	1,000			
Argila	-0,752	0,703	0,738	-0,397	-0,130	0,189	0,834	0,500	1,000		
Silte	-0,786	0,828	0,778	-0,076	0,224	0,127	0,687	0,787	0,923	1,000	
Areia	0,788	-0,799	-0,778	0,190	-0,103	-0,151	-0,750	-0,700	-0,967	-0,991	1,000

Fonte: Autora (2017).

Os metais pesados geralmente são menos móveis em $\text{pH} > 7$ do que $\text{pH} < 5,5$. Assim o risco de absorção de metais é maior onde o pH do solo é baixo (MAPANDA et al., 2005). A absorção do metal pesado geralmente aumenta com a diminuição do pH , dentre outras razões, devido à dissolução dos complexos metal-carbonato, liberando íons metálicos livres na solução do solo (SINGH et al.; 2011).

A MO obteve altas correlações positivas com a CTC (0,666), teor de Zn (0,532), argila (0,703) e silte (0,828) e, negativa com a areia (-0,799) (Tabela 3). A MO possui a capacidade de reter e disponibilizar nutrientes.

A CTC apresentou altas correlações apenas com argila (0,738), silte (0,778) e areia (0,778), decorrente das cargas elétricas presentes na superfície das partículas do solo (Tabela 3).

O Cu correlacionou-se positivamente com Zn (0,948) e negativamente com o Mn (-0,510). O Zn apresentou baixas correlações com Mn (-0,278), Fe (-0,344), e com as partículas de argila (-0,130), silte (0,224) e areia (-0,103) (Tabela 3). As altas correlações entre estes dois metais pesados no solo podem refletir que as concentrações acumuladas destes, provêm de fontes de poluição semelhantes. Enquanto, as baixas correlações os metais provem de fontes diferentes de poluição. Logo, as fontes de Cu e Zn foram diferentes que as fontes de Mn e Fe.

Resultados semelhantes foram obtidos por Hu et al. (2013) em uma área urbanizada na China. Os autores encontraram alta correlação entre Cu e Zn (0,82), sugerindo fontes iguais para esses metais. Além disso, houve correlação positiva entre Mn e Fe (0,50), ambos os metais provenientes de fonte natural de decorrência de seus níveis abundantes e, portanto, não afetados por atividades humanas.

Ullah et al. (2012) também encontraram correlações negativas entre pH e metais pesados em uma área irrigada com efluentes. Além disso, a CTC apresentou correlações positivas com o Cu e Zn.

3.3.3 Análise de Componentes Principais

Na extração das componentes principais da área contaminada, buscando entender as diferentes fontes de metais no solo, selecionou-se os teores de Cu, Zn, Fe e Mn para comporem a ACP.

A primeira e a segunda componente principal foram responsáveis para explicar a variância total, devido apresentarem elevados autovalores com perda de menos de

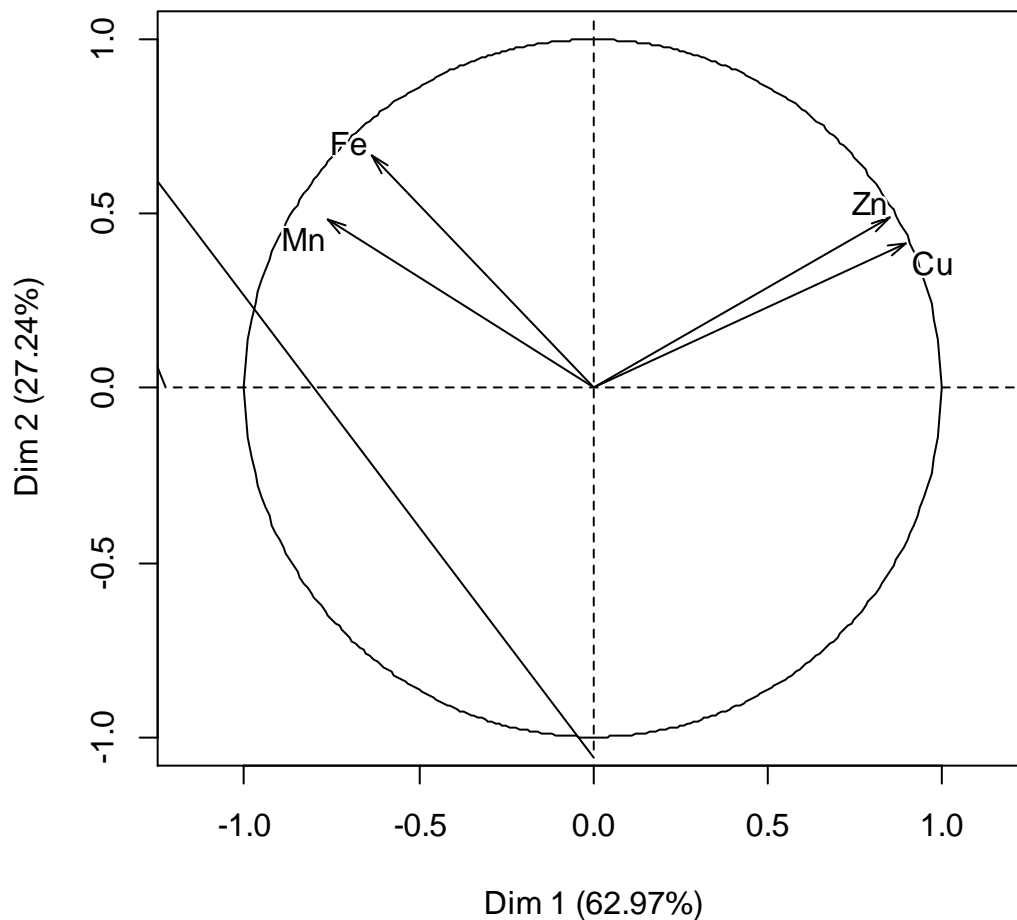
10% da variância dos atributos (Tabela 3.4). O gráfico dos pesos das variáveis que compõem os componentes 1 e 2 está apresentado na Figura 3-2.

Tabela 3.4 - Características da análise de componentes principais

Componente	Autovalores Iniciais			Matriz dos componentes rotacionados		
	Total	% de variância explicada	% acumulada da variância	Atributos	PC1	PC2
CP1	2,519	62,97	62,97	Cu	0,964	-0,235
CP2	1,089	27,24	90,21	Zn	0,970	-0,147
CP3	0,369	9,22	99,43	Fe	-0,083	0,917
CP4	0,023	0,57	100,00	Mn	-0,295	0,853

Fonte: Autora (2017).

Figura 3-2 - Biplot dos pesos de CP1 e CP2 para os metais analisados



Fonte: Autora (2017).

Dos quatro componentes gerados, dois CP explicaram 90,21% da variância total. A matriz dos componentes principais indicou que Cu e Zn estão intimamente associados ao CP1, que explicou 62,98% da variância total, enquanto Fe e Mn são principalmente distribuídos no CP2 com variância explicada de 27,24%. Todas as variáveis ficaram bem distribuídas em seus componentes, indicando que o Mn e Fe estão fortemente correlacionados e claramente separados de Cu e Zn, indicando fontes distintas destes dois grupos de metais no solo. O Mn e o Zn devem ter influências principalmente pelos fatores intrínsecos do solo, enquanto que os teores Cu e Zn, com altas contribuições na PC1, provavelmente provem principalmente de fontes antropogênicas, neste caso o efluente, uma vez que estes últimos apresentaram uma baixa correlação entre as propriedades do solo (pH, MO, CTC e textura).

Li et al. (2013) avaliando metais pesados em uma área industrial da China, encontraram associações de Cu e Zn com chumbo, cádmio, arsênio e mercúrio, na ACP indicando fontes antropogênicas, como a produção industrial e atividades de trânsito, enquanto Cr e Mn foram fortemente correlacionados a outra componente principal, sugerindo fontes naturais desses elementos.

Hu et al. (2013) encontraram componentes distintos para Cu, Zn, Mg e Fe em uma área urbanizada na China. O primeiro grupo foi composto por Mn, Fe e cobalto (Co), e a grande variabilidade nesta componente foi principalmente controlada pelos materiais de origem do solo. O outro grupo teve contribuição de Cu e Zn, indicando fontes antropogênicas.

Chabukdhara e Nema (2013) estudaram a distribuição de metais pesados em uma cidade indiana. Os autores encontraram forte associação entre o par Cu-Zn em uma área industrial, indicando fonte antropogênica para esses elementos. Além disso, os autores identificaram risco à saúde humana devido a possível exposição via ingestão e contato dermal, por esses elementos.

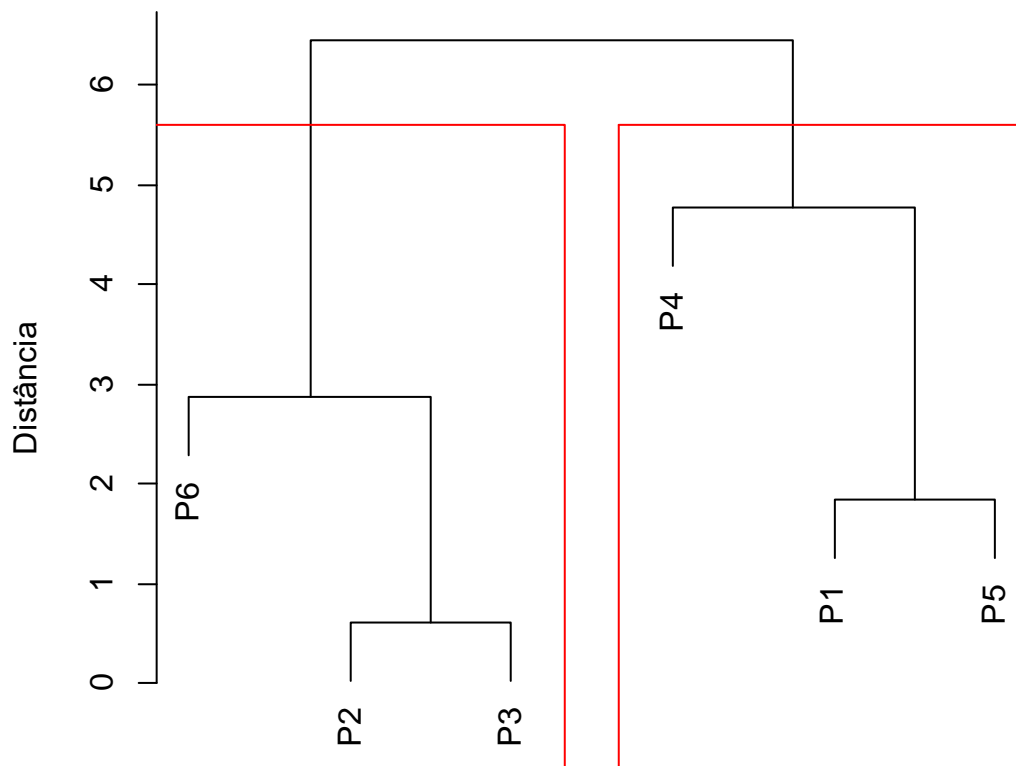
3.3.4 Análise de Agrupamento (AA)

A AA objetiva reunir objetos semelhantes, torna-se necessário alguma medida para avaliar o quão semelhante, ou diferente são os objetos. Geralmente, costuma-se avaliar a semelhança em termos de distância entre pares de objetos. Os objetos que possuem a menor distância entre si são mais semelhantes, um do outro, do que os

objetos com a maior distância. Essa medida de semelhança é fornecida pela distância euclidiana.

Os atributos do solo selecionados foram padronizados por escores antes da análise, em seguida as distâncias euclidianas foram calculadas, para determinar as semelhanças entre as variáveis. Logo após, foi aplicado método de Ward para o agrupamento hierárquico. Os resultados da AA para as variáveis estão apresentados no dendograma da Figura 3-3.

Figura 3-3 - Dendograma gerado pelo agrupamento dos pontos amostrados



Fonte: Autora (2017).

A AA permitiu identificar a distância entre os grupos e, conseqüentemente identificar a similaridade entre os pontos amostrados. Conforme análise do dendograma, as similaridades entre os grupos, formaram dois grupos. O grupo I foi formado pelos pontos P6, que é o solo controle, e pelos pontos P2, P3, nos quais ocorreu uma menor contribuição dos efluentes, e conseqüentemente, menor aporte de nutrientes e metais. Já o grupo II foi formado pelos pontos P5, P1 e P4, onde ocorre o lançamento do efluente, acúmulo no solo e desague no canal de drenagem,

respectivamente. Nestes pontos foram onde ocorreram os maiores valores de Cu, Zn e P.

Com a AA foi possível identificar a similaridade entre os pontos P1, P5, e P4 e concluir que a área não retém mais os contaminantes, visto o P1 e P5 ser entrada e saída de efluente, respectivamente. O lançamento contínuo por um longo período de tempo, satura o solo com os contaminantes, inviabilizando a retenção destes e consequentemente ocorrendo a liberação e movimentação.

As fontes de metais pesados para o meio ambiente podem ser naturais ou ter relação com a atividade humana (antropogênica). Os teores de um determinado elemento químico nos sedimentos de uma área podem depender da composição da rocha mãe, estando associados à litologia local.

3.3.5 Indicadores de poluição e aporte de metais pesados no solo

O IP calculado para os metais em cada ponto analisado apresenta-se na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Resultados do Índice de Poluição (IP) e Índice de Poluição Integrado (IPI) para Cu e Zn na área de estudo

Ponto	IP		IPI
	Cu	Zn	
P1	2.73	6.26	4.49
P2	0.89	0.95	0.92
P3	0.98	0.78	0.88
P4	3.52	7.12	5.32
P5	2.11	6.18	4.14
Média	2.04	4.26	3.15

Fonte: Autora (2017).

Os pontos P2 e P3 apresentaram os valores mais baixos de IP, de 0,89 e 0,98 para Cu e 0,95, e 0,78 para Zn, respectivamente. Esses valores demonstraram que as concentrações de Cu e Zn nesses pontos estavam compatíveis com os valores de referência do P6 e, não houve poluição nesses pontos devido aos metais.

Os maiores valores de IP foram encontrados para os pontos P4, P1 e P5, onde ocorre o lançamento de efluentes no solo, acumulando-se na parte central da área e onde ocorre o desague por meio de canal de drenagem, respectivamente. O IP para

os pontos P1 e P5 foram considerados de poluição média, enquanto o P4 apresentou valor superior a 3, sugerindo uma alta poluição. Para o Zn, o IP foi superior ao do Cu, indicando uma alta poluição por esse metal. Os valores do Índice de Poluição Integrada foram considerados de alta poluição ($IPI > 2$) para os pontos P1, P4 e P5.

Cai et al. (2013) encontraram valores médios de IP para Cu de 2,2, enquanto que para Zn de 4,2 para solos provenientes de rodovias. Apesar dos valores serem semelhante aos do presente trabalho, o IP do Zn foi aproximadamente 70% superior aos dos autores.

Os resultados das estimativas do IGEO e FE para Cu e Zn estão apresentados na Tabela 3.6. Os teores encontrados para o ponto P6 foram utilizados como referência para os cálculos dos índices.

Tabela 3.6 - Valores para Índice de Geoacumulação e Fator de Enriquecimento de Cu e Zn na área de estudo

Ponto	IGEO		FE	
	Cu	Zn	Cu	Zn
P1	0,86	2,06	1,31	3,01
P2	-0,76	-0,66	0,39	0,42
P3	-0,61	-0,94	0,51	0,41
P4	1,23	2,25	11,09	22,47
P5	0,49	2,04	1,21	3,55
Média	-	-	2,90	5,97

Fonte: Autora (2017).

Para o IGEO apenas o metal Zn apresentou nos pontos P1, P4 e P5 valores da classe 3, de moderadamente poluído a poluído. Os pontos são centro, entrada e saída da área, respectivamente.

Já para o FE, o Cu apresentou valor alto para o P5, de enriquecimento significativo. O FE do Zn apresentou enriquecimento significativo para os pontos P1, P4 e P5. No entanto, os valores foram maiores na entrada do efluente (22,47), seguido da saída do efluente no canal de drenagem (3,55), e por último no centro da área (3,01).

De acordo com Zhang e Liu (2000), os valores de FE entre 0,05 e 1,5 indicam que o metal é proveniente da rocha mãe ou processos naturais, enquanto os valores

de FE superiores a 1,5 sugerem que as fontes são mais propensas a serem antropogênicas.

Em termos médios, o FE do Cu foi semelhante ao encontrado por Liu et al. (2005) (FE = 2,3), em uma área irrigada por esgoto na China. No entanto, o FE do Zn foi superior em quase 200% ao valor estimado pelo mesmo autor (FE = 2,0).

Os resultados encontrados para os índices de poluição estão de acordo com o que foi observado com a ACP e a AA, do ponto de vista que ocorre o aporte de metais por ação antropogênica, e ocorre a acumulação principalmente do Zn principalmente na entrada da área por meio do descarte de esgoto.

Hu et al. (2013) também encontraram enriquecimento moderado à significativo para Cu e Zn, com FE máximo de 261,7 e 59,5, respectivamente. Estes autores sugeriram que os níveis de Cu e Zn no solo, foram resultados principalmente de ação antropogênica, proveniente de emissões industriais, irrigação com efluentes e aplicação de pesticidas e fertilizantes em solos agrícolas.

O Cu e Zn no efluente doméstico tem origem principalmente de tubulações antigas produzidas com esses materiais, bem como, provêm de válvulas, ligas e revestimentos. A exposição a esses metais pode representar riscos à saúde humana, devido a sua capacidade de persistência e tendência de acumulação nos níveis tróficos da cadeia alimentar (NGUYEN et al. 2013). Além disso, podem afetar o desenvolvimento dos microrganismos que irão realizar o tratamento destes efluentes (BECERRA-CASTRO et al., 2015).

Udom et al. (2004) avaliaram uma área na Nigéria que recebia esgoto doméstico por mais de 40 anos. Os autores puderam concluir a acumulação de Zn, Cu, Pb e Cd nas camadas superiores do solo. Além disso, a grande quantidade de MO presente no esgoto, auxilia a complexar os metais tornando-os indisponíveis para serem assimilados. No entanto, o uso prolongado pode trazer problemas de acumulação desses metais, sendo insustentável a disposição desse resíduo em áreas diversas.

Mapanda et al. (2005) também concluíram que o aumento das concentrações de metais pesados no solo, devido a longos períodos de lançamento de efluente, implica na acumulação destes, trazendo consequências produtivas, devido a toxicidade. A acumulação de metais pesados, particularmente Zn, Cu e Ni em solos irrigados por esgoto, deve ser monitorada periodicamente em vista de sua acumulação.

Os solos são filtros naturais de contaminantes, podendo absorver e reter os metais pesados. No entanto, quando essa capacidade é reduzida, devido ao carregamento contínuo, e/ou a alteração de pH, os solos podem liberar os metais na solução e estes irem parar na água subterrânea ou se tornarem disponíveis para serem assimilados por plantas e organismos (MAPANDA et al., 2005).

Ullah et al. (2012) estudaram as alterações na qualidade da água subterrânea, vegetais e solo em uma área irrigada por efluente sem tratamento prévio no Paquistão. Os autores observaram a contaminação do solo por metais pesados. Além disso, ocorreu a transferência de metais para a água subterrânea e as culturas cultivadas. Aliado a isso, os autores constataram que as camadas superfícies do solo funcionam como filtro para a passagem os contaminantes, no entanto, a prática, se continuada pode representar uma ameaça de toxicidade para a população local.

Mondal et al. (2015) examinaram o efeito a curto prazo (um ano) da aplicação de lodo de esgoto nas propriedades físicas, químicas e biológicas de um argissolo. Os autores constataram uma melhora considerável na atividade microbiana e na matéria orgânica associada aos agregados do solo, especialmente quando foi aplicada uma maior quantidade de lodo (15 t/ha) do que uma menor (5 t/ha). Aliado a isso, a quantidade de Cu e Zn, foram de 2,07 mg/kg e 3,76 mg/kg, respectivamente, indicando que essas baixas concentrações, não influenciaram a atividades dos organismos.

Rattan et al. (2005) avaliaram o efeito a longo prazo (40 anos) da aplicação de esgoto no solo, água subterrânea e plantas. Observaram o aumento na produtividade agrícola, devido o lançamento de lodo de esgoto, sendo tal fato em virtude do aumento na alcalinidade. O estudo indicou acumulação de Zn, Cu, Fe e Mn.

3.4 CONCLUSÃO

Identificar as fontes dos contaminantes em uma área contaminada, é fundamental para prever quais técnicas de remediação serão utilizadas, bem como, a eficiência em que estas devem ter. Nesse sentido, esse trabalho, buscou identificar os contaminantes e suas respectivas fontes para o gerenciamento de áreas contaminadas por efluente doméstico. Lançou-se mão do uso de ferramentas estatísticas, que permitiram o melhor entendimento da fonte e variabilidade dos contaminantes na área de estudo.

A ACP foi útil para verificar quais os metais que tem maior contribuição para a variabilidade na área contaminada. Por meio deste tipo de análise, juntamente com a matriz de correlação de Pearson, foi possível identificar que os teores de Cu e Zn não forem influenciados pelas características intrínsecas do solo, tais como, CTC, pH e MO, indicando uma forte ação antropogênica, a julgar pelas altas correlações encontradas.

A AA foi responsável por identificar a similaridade entre os pontos amostrados, e com isso, foi possível concluir, que devido ao lançamento contínuo de efluentes, ocorreu a saturação, em que os contaminantes não são mais retidos pelas partículas do solo, e acabam por serem carregados para um curso d' água próximo. Além disso, os índices de poluição e aporte de metais no solo (IP, IPI, IGEO e FE) complementaram os resultados da ACP e AA, indicando que há introdução de metais no meio devido a ação antrópica e sua consequente acumulação e poluição.

O estudo concluiu que o descarte de efluente na área, mesmo que parcialmente tratado, aumentou a contaminação por Cu e Zn, podendo vir a causar risco potencial para a saúde ambiental e humana a longo prazo.

Dado o estado atual de contaminação da área, é urgente e necessário avaliar a ecotoxicidade para organismos do solo e propor técnicas de remediação eficiente, objetivando eliminar o possível risco para a saúde humana e ecológica. As técnicas utilizadas no presente trabalho, contribuíram para entender a variabilidade das diferentes fontes de aporte de esgoto na área, tornando-se fundamental para aperfeiçoar as aplicações de remediação para cada fonte em separado, reduzindo a degradação ambiental provocada pelo excesso de descarte, melhorando o ambiente e colaborando para a redução do risco à saúde humana.

3.5 REFERÊNCIAS

ARAÚJO, R. K.; WOLFF, D. B.; CRUZ, J. C.; BAGGIOTTO, C.; FRIEDRICH, M. Soil and groundwater contaminations by sanitary effluent in permanent preservation area with macrophytes and grasses. *Science & Engineering Journal*, v. 24, n. 1, p. 115-123, 2015.

BECERRA-CASTRO, C.; LOPES, A. R.; MOREIRA, I. V.; SILVA, E. F.; MANAIA, C. M.; NUNES, O. C.; Wastewater reuse in irrigation: A microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health. *Environment International*, v. 75, p. 117–135, 2015.

BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2014. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2016.

CAI, Q. Y.; MO, C. H.; LI, H. Q.; LU, H.; ZENG, Q. Y.; LI, Y. W.; WU, X. L. Heavy metal contamination of urban soils and dusts in Guangzhou, South China. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 185, p. 1095–1106, 2013.

CHABUKDHARA, M.; NEMA, A. Heavy metals assessment in urban soil around industrial clusters in Ghaziabad, India: Probabilistic health risk approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 87, p. 57–64, 2013.

CHAIGNON, V.; QUESNOIT, M.; HINSINGER, P. Copper availability and bioavailability are controlled by rhizosphere pH in rape grown in an acidic Cu-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 157, n. 12, p. 3363–3369, 2009.

CHEN, H.; TENG, Y.; LU, S.; WANG, Y.; WANG, J. Contamination features and health risk of soil heavy metals in China. *Science of the Total Environment* v. 512–513, p. 143–153, 2015.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual of soil chemical analysis. 2nd ed. (In Portuguese.) EMBRAPA, Natl. Ctr. of Soil Res., Rio de Janeiro, 1997.

FEPAM. Fundação Estadual de Proteção Ambiental do Rio Grande do Sul. Portaria n. 85/2014. Dispõe sobre o estabelecimento de Valores de Referência de Qualidade (VRQ) dos solos para 09 (nove) elementos químicos naturalmente presentes nas diferentes províncias geomorfológicas/geológicas do Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014.

FERRAREZI, R. S. Uso, ocupação e conservação do solo. Campinas: Conplant, 2009, 82 p.

HENZE, M.; COMEAU, Y. Wastewater Characterization. In: HENZE, M. (Coord.). *Biological Wastewater Treatment: Principles Modelling and Design*. Londres: IWA Publishing, 2008, cap. 3, p. 33–52.

HU, Y.; LIU, X.; BAI, J.; SHIH, K.; ZENG, E. Y.; CHENG, H. Assessing heavy metal pollution in the surface soils of a region that had undergone three decades of industrialization and urbanization. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 20, p. 6150–6159, 2013.

LI, X.; LIU, L.; WANG, Y.; LUO, G.; CHEN, X.; YANG, X.; HALL, M. H. P.; GUO, R.; WANG, H.; CUI, J.; HE, X. Heavy metal contamination of urban soil in an old industrial city (Shenyang) in Northeast China. *Geoderma*, v. 192, p. 50-58, 2013.

LIU, C.; LIN, K.; KUO, Y. Application of factor analysis in the assessment of groundwater quality in a blackfoot disease area in Taiwan. *Science Of The Total Environment*, v. 313, n. 1 -3, p.77-89, set. 2003.

LIU, W.; ZHAO, J.; OUYANG, Z.; SODERLUND, L.; LIU, G. Impacts of sewage irrigation on heavy metal distribution and contamination in Beijing, China. *Environment International*, v. 31, n. 6, p. 805-812, 2005.

LU, X.W., ZHANG, X.L., LI, L.Y., CHEN, H. Assessment of metals pollution and health risk in dust from nursery schools in Xi'an, China. *Environmental Research*, v. 128, p. 27–34, 2014.

MAPANDA, F.; MANGWAYANAA, E. N.; NYAMANGARAA, J.; GILLERA, K.E. The effect of long-term irrigation using wastewater on heavy metal contents of soils under vegetables in Harare, Zimbabwe. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 107, p. 151–165, 2005.

MARION, F. A. Águas subterrâneas, atividades potencialmente contaminantes e o aporte do geoprocessamento na definição de conflitos. *Geoambiente On-line*, n. 17, jul-dez, 2011.

MONDAL, S.; SINGH, R. D.; PATRA, A. K.; DWIVEDI, B. S. Changes in soil quality in response to short-term application of municipal sewage sludge in a typic haplustept under cowpea-wheat cropping system. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, v. 4, p. 37–41, 2015.

MULLER, G. Index of geoaccumulation in sediments of the Rhine River. *GeoJournal*, v. 2, p. 108–118, 1969.

NGUYEN, T. A. H. et al. Applicability of agricultural waste and by-products for adsorptive removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, v.148, p. 574-585, 2013.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

RATTAN, R. K.; DATTA, S. P.; CHHONKAR, P. K.; SURIBABU, K.; SINGH, A. K. Long-term impact of irrigation with sewage effluents on heavy metal content in soils, crops and groundwater—a case study. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 109, n. 3–4, p. 310-322, 2005.

RECKZIEGEL, T. Modelo conceitual de contaminação por emissão de efluente no solo: Bacia Escola Campus/UFSM. 2012. 168 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2012.

SINGH, R. P.; SINGH, P.; IBRAHIM, M. H.; HASHIM, R. Land Application of Sewage Sludge: Physicochemical and Microbial Response. In: WHITACRE, D. M. (Coord.). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. New York: Springer, v. 214, p. 41-60, 2011.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. *Análise de solo, plantas e outros materiais*. 2. ed. rev. ampl. (In Portuguese.): UFRGS/FA/DS, Porto Alegre. (Boletim técnico, 5), 1995.

UDOM, B. E.; MBAGWU, J. S. C.; ADESODUN, J. K.; AGBIM, N. N. Distributions of zinc, copper, cadmium and lead in a tropical ultisol after long-term disposal of sewage sludge. *Environment International*, v. 30, p. 467– 470, 2004.

ULLAH, H.; KHAN, I.; ULLAH, I. Impact of sewage contaminated water on soil, vegetables, and underground water of peri-urban Peshawar, Pakistan. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 184, n. 10, p. 6411–6421, 2012.

ZHANG, J.; LIU, C.L., Riverine composition and estuarine geochemistry of particulate metals in China-weathering features, anthropogenic impact and chemical fluxes. *Estuar. Coast. Shelf Sci*, v. 54, p.1051–1070, 2000.

4 ARTIGO 2 – RESPOSTAS TOXICOLÓGICAS DE *EISENIA ANDREI* EXPOSTAS AO SOLO DE ÁREA CONTAMINADA POR EFLUENTE SANITÁRIO

RESUMO

O descarte de efluentes sanitários no solo traz inúmeros benefícios, entre eles, a redução do uso de fertilizantes químicos. No entanto, seus efeitos à saúde humana e à biota, incluindo fauna edáfica, resultam na necessidade de investigação, monitoramento e remediação dessas áreas. Considerando a importância ecológica e o potencial indicador das minhocas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do lançamento de efluente sanitário no solo de uma área, em oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*. Comportamento de evasão, reprodução, atividade de acetilcolinesterase (AChE), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidação lipídica através dos níveis de malondialdeído (TBARS), foram avaliados para se determinar os efeitos toxicológicos nos organismos causados pela disposição de efluente no solo. Os solos contaminados causaram mudanças significativas nos parâmetros avaliados. Os resultados indicaram que o descarte de efluente sanitário sem tratamento no solo foi tóxico à reprodução e comportamento dos organismos. Foi observado incremento na atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase como mecanismos de defesa antioxidante. O aumento significativo nos níveis de malondialdeído e a inibição da atividade da acetilcolinesterase, indicam a ocorrência da peroxidação lipídica da membrana celular e alterações na neurotransmissão em decorrência dos contaminantes presentes no solo da área contaminada. Não foi possível atribuir o efeito tóxico especificadamente a um contaminante, visto os efluentes sanitários constituírem-se por misturas complexas de substâncias. No entanto, a aplicação dos ensaios ecotoxicológicos é eficiente para analisar o potencial tóxico de solo contaminado por efluente sanitário.

Palavras-chave: Metais pesados. Ensaio comportamental. Sucesso reprodutivo. Enzimas. Estresse oxidativo.

ARTICLE 2 – ECOTOXICOLOGICAL RESPONSES OF *EISENIA ANDREI* EXPOSED TO THE SOIL OF CONTAMINATED AREA BY SEWAGE

ABSTRACT

The disposal of sanitary effluents in the soil brings numerous benefits, among them, the reduction of the use of chemical fertilizers. However, their effects on human health and biota, including edaphic fauna, result in the need for research, monitoring and remediation of these areas. Considering the ecological importance and the potential indicator of earthworms, the objective of this work was to evaluate the toxicity of the sanitary effluent discharge in the soil of an area, in oligochaetes of *Eisenia andrei* species. Acetylcholinesterase activity (AChE), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and lipid peroxidation through malondialdehyde levels (TBARS) were evaluated to determine the toxicological effects on organisms caused by the effluent disposal not alone. Contaminated soils caused significant changes in the evaluated parameters. The results indicated that the disposal of untreated sanitary effluent in the soil was toxic to reproduction and behavior of the organisms. Increased activity of the enzymes superoxide dismutase and catalase as antioxidant defense mechanisms was observed. The significant increase in malondialdehyde levels and the inhibition of acetylcholinesterase activity indicate the occurrence of lipid peroxidation of the cell membrane and changes in neurotransmission due to the contaminants present in the soil of the contaminated area. It was not possible to attribute the toxic effect specifically to a contaminate, since the sanitary effluents constituted by complex mixtures of substances. However, the application of the ecotoxicological tests is efficient to analyze the toxic potential of soil contaminated by sanitary effluent.

Key words: Heavy metals. Behavior test. Reproductive success. Enzymes. Oxidative stress.

4.1 INTRODUÇÃO

Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, a disposição inadequada e indiscriminada de efluentes se torna um desafio a ser resolvido pelo governo e sociedade. O principal agravante da disposição inadequada dos efluentes, é devido a presença de metais pesados e patógenos (CRESPO, et al.; 2012). Os riscos ambientais da introdução de metais em áreas contaminadas, usualmente foram avaliados através de análises químicas. No entanto, o uso dessa abordagem não fornece informações suficientes sobre a disponibilidade dos metais e não é possível avaliar a toxicidade de todas as substâncias no solo, os efeitos dos contaminantes e suas interações com a matriz do solo e os organismos de teste (RASTETTER e GERHARDT, 2015; BORI et al., 2017).

Nesse sentido, os ensaios de ecotoxicidade terrestre ganharam relevância em metodologias de avaliação de risco como ferramentas complementares capazes de relatar os efeitos realistas e não superestimados dos sites contaminados aos organismos do solo (CESAR et al., 2012; BORI et al., 2017), visando integrar as diversas informações para o planejamento ou tomada de decisão em medidas de saúde pública e de controle ambiental, definição de técnicas de remediação e hierarquização de áreas a serem priorizadas em programas de recuperação ambiental.

A toxicidade dos solos contaminados foi largamente avaliada com ensaios padrões, concentrando principalmente nos efeitos sobre a mortalidade e reprodução dos organismos. No entanto, esses ensaios não fornecem informações das respostas bioquímicas que ocorrem em nível subcelular, o que auxilia no entendimento dos mecanismos envolvidos na toxicidade dos metais pesados (GASTALDI et al. 2007; CALISI et al., 2011; NOVAIS et al., 2011).

Uma abordagem complementar aos ensaios de toxicidade padrão seria a utilização dos biomarcadores. O biomarcador é considerado uma variação bioquímica, fisiológica, histológica ou comportamental, em nível individual, em que evidencia o efeito dos contaminantes. Devido a sua sensibilidade ao estresse da poluição, o biomarcador tem sido amplamente utilizado como ferramenta potencial para avaliação de áreas contaminada, podendo também ser utilizado como um alerta precoce devido as alterações serem provocadas em subníveis nos organismos (PAUWELS, et al., 2013; SHI et al., 2017).

Entre os principais parâmetros utilizados como biomarcadores estão os de estresse oxidativo, através da avaliação da atividade das enzimas antioxidantes. Este processo decorre de um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres (Espécies Reativas de Oxigênio – ERO) ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Isso leva a oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (BARBORA et al., 2010).

O sistema de defesa antioxidante, atua através da regulação das defesas, impedindo previamente que as ERO causem danos à célula. Esse sistema inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A SOD metaboliza o ânion superóxido (O_2^-) em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é então desativado pelo CAT, evitando assim dano oxidativo (NOVAIS et al., 2011).

Quando ocorre a peroxidação lipídica das membranas celulares devido ao estresse oxidativo, a extensão dessa lesão pode ser medida através dos níveis de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), que corresponde ao malondialdeído (MDA), produto da degradação peroxidativa de lipídios das membranas (NUNES et al., 2006).

Outra enzima largamente utilizada como biomarcador em estudos ecotoxicológicos é a acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima desempenha uma função central no mecanismo de neurotransmissão, uma vez que promove a clivagem do neurotransmissor acetilcolina após sua liberação nas fendas sinápticas durante a transmissão colinérgica (OLIVEIRA, 2014).

As minhocas são amplamente empregadas pois estão em constante contato com solo; residem em locais contaminados, permitindo validação em campo da disponibilidade química; a epiderme da minhoca é vascularizada, o que permite a absorção de contaminantes diretamente do solo; a minhoca ingere solo, fornecendo um meio dietético de contaminantes (NAHMANI et al., 2007). A espécie *Eisenia andrei* é frequentemente utilizada em estudos ecotoxicológicos pois tem alta taxa de reprodução, ciclo de vida curto, fácil manutenção em laboratório, além da boa sensibilidade a uma ampla gama de substância tóxicas (NAHMANI et al.; 2007; SHI et al., 2017), sendo indicadas como organismo padrão em testes de toxicidade em protocolos internacionais (OECD, 2004; ISO, 2012).

O objetivo do presente estudo foi determinar os efeitos toxicológicos de uma área contaminada com efluente sanitário. Para tanto avaliou-se alterações no

comportamento e reprodução das minhocas *Eisenia andrei* através de testes comportamentais e de toxicidade crônica, respectivamente. Além disso, buscou-se analisar alterações em subnível por meio dos biomarcadores de estresse oxidativo, catalase e superóxido dismutase, danos a membrana celular por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e neurotransmissão por acetilcolinesterase (AChE), buscando avaliar os mecanismos de ação dos contaminantes nos organismos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Localização e descrição da área de estudo

O estudo foi conduzido em uma área localizada no Campus Camobi da Universidade Federal de Santa Maria, na Bacia Escola Campus, próximo à Biblioteca Central e aos prédios da Casa do Estudante, em Santa Maria/RS.

Na área, de cerca de 1.700 m², ocorre o lançamento contínuo de efluente sanitário diretamente na superfície do solo, que é previamente tratado em tanque séptico seguido de filtro anaeróbico. O efluente escoava por zonas de fluxos preferenciais até atingir um curso d'água, denominado Sanga Lagoão do Ouro.

Nesta área existem quatro tubulações denominadas fontes pontuais de lançamento de efluentes: FP-31, FP-32, FP-31A e FP-50. O efluente líquido lançado pela fonte pontual FP-31 constitui-se de esgoto sanitário, proveniente da Casa do Estudante (CEU) e, industrial, gerado pelo Restaurante Universitário (RU). O efluente é tratado anteriormente por tanque séptico e filtro anaeróbico, logo após, é lançado, por meio de uma tubulação de 30m até a área de estudo.

O efluente da fonte FP-32 é proveniente de alguns prédios da UFSM e da reitoria. O efluente assim como o da fonte FP-31, recebe tratamento por tanque séptico e filtro anaeróbico, até ser lançado no solo. Além disso, pode ter eventuais contribuições de efluentes de laboratórios de ensino e pesquisa da instituição

A fonte pontual FP-31A está localizada próxima à FP-31 e apresenta-se “afogada”, formando um canal de escoamento do efluente. Conforme estudo realizado por Reckziegel (2012), não se sabe a origem desse efluente, no entanto, apresenta as maiores vazões com características de esgoto sem tratamento.

O efluente da fonte FP-50 é composto por duas tubulações, dispostas em paralelo, e tem como origem os prédios da CEU e tem características de esgoto sanitário.

O efluente das fontes pontuais escoam até alcançar uma área de acúmulo no solo. Logo após, ocorre à saída de esgoto da zona saturada por um canal de drenagem (CDE) que é um canal que escoam até encontrar a Sanga Lagoão do Ouro, tributário do rio Vacacaí Mirim.

Na Figura 4-1 apresenta-se os pontos de lançamento do efluentes líquidos no solo, de efluentes diluídos no solo, do efluente do canal de drenagem até a Sanga Lagoão do Ouro. A porção delimitada representa a área que está sobre influência direta dos efluentes líquidos que escoam pelo solo.

Figura 4-1 - Pontos de amostragem de solo na área de estudo



Fonte: Autora (2017).

4.2.2 Amostragem do solo

A amostragem do solo foi realizada no mês de agosto de 2016, e buscou-se coletar amostras visando avaliar o local onde os efluentes são despejados, onde

sofrem infiltração e acumulam-se no solo, e na região onde forma um fluxo de descarte para o canal de drenagem.

Na coleta de solo, foram amostrados seis pontos na área de estudo por meio de coletas simples deformadas, na profundidade de 0-15 cm. O primeiro ponto de coleta, denominado P4, foi retirado logo após o lançamento de efluentes pelas pontes pontuais FP31, FP31A e FP32. Esse ponto é totalmente assoreado e ocorre o desprendimento de gases mal odores, com vegetação em seu entorno. O segundo ponto (P2) foi retirado próximo à fonte FP50, com presença da macrófita aquática *Typha domingensis*. O terceiro ponto, denominado P3, foi retirado ao leste da fonte FP-50 e nesse local também ocorre a presença da macrófita aquática. O quarto ponto (P1) foi retirado ao norte da fonte FP-50, no centro da área de estudo. Esse ponto apresentou-se saturado de esgoto, com coloração preta, desprendimento de gases mal odores, e presença da *Typha*. O quinto ponto (P5) amostrado na área localizou-se na saída do canal de drenagem (CDE), a jusante dos pontos de lançamento. O último ponto (P6) foi retirado próximo a área de estudo, ao sul da fonte FP-50, porém sem a influência das fontes pontuais de efluentes.

Após a coleta e identificação, as amostras seguiram para o Laboratório de Meio Ambiente (LEMA), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

4.2.3 Condições experimentais

Organismos adultos de *E. andrei* (Oligochaeta, Lumbricidae) foram obtidas do minhocário do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). No laboratório as minhocas foram mantidas sob condições padrões com temperatura e umidade controladas, e adição semanalmente de esterco bovino como fonte de alimento.

As montagens dos ensaios utilizaram 500 gramas de solo coletado de cada ponto de amostragem, dispostos em recipientes com capacidade de 2L, formando uma lâmina de solo de 5 cm, e em cada unidade experimental utilizou-se 10 minhocas com peso entre 400 a 600 mg. A umidade do solo foi mantida em 30-35% da capacidade máxima de retenção de água e fotoperíodo natural.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Engenharia do Meio Ambiente (LEMA) da UFSM e foram compostos por seis tratamentos, respectivamente as amostras de solo coletadas na área de estudo, com três repetições. Antes de serem

adicionadas nos experimentos, as minhocas foram colocadas em recipiente com papel filtro durante 24h para depuração de seus conteúdos estomacais. Durante os ensaios (crônico e biomarcadores), os organismos foram alimentados com 5 g de esterco bovino.

4.2.4 Ensaio comportamental

No experimento avaliou-se as amostras de solo quanto ao potencial de rejeição ao local e a diminuição da população das minhocas, por algum contaminante.

A realização do ensaio comportamental (teste de fuga) utilizou minhocas da espécie *Eisenia andrei* como indicadores da contaminação do solo.

O ensaio foi realizado de acordo com as especificações da NBR ISO 17512-1/2011 (ABNT, 2011). Nesse ensaio as minhocas foram expostas simultaneamente às amostras de solo com presença e ausência de efluente.

De acordo com a NBR ISO 17512-1/2011, a montagem do ensaio consistiu em adicionar uma divisória na unidade experimental com capacidade de 2L, formando dois compartimentos. Em uma das seções do recipiente foi adicionado solo coletado da área de estudo (P1, P2, P3, P4 e P5), enquanto que na outra, solo proveniente da área, porém sem a influência de esgoto (P6). Em seguida, removeu-se a divisória, originando uma linha entre as amostras, onde foram colocados dez indivíduos de *E. andrei*.

As unidades experimentais foram fechadas e as tampas perfuradas para permitir as trocas gasosas, além de evitar a fuga dos organismos. O ensaio foi conduzido por 48h em sala com temperatura e fotoperíodo natural. Durante esse período as minhocas foram mantidas sem alimentação.

Ao final do tempo de exposição, a divisória foi reintroduzida nas unidades experimentais, separando o solo contaminado e o solo controle permitindo assim a contagem do número de organismos em cada seção. Após a contagem dos organismos em cada unidade experimental, foi determinado a percentagem de fuga conforme a Equação 4:

$$Evasão = \left(\frac{C - T}{N} \right) \times 100 \quad (4)$$

sendo: Evasão = percentagem de fuga dos organismos (%); C = número de minhocas encontradas no solo controle; T = número de minhocas encontradas no solo teste; N número total de minhocas utilizadas por tratamento.

Um resultado positivo foi indicativo de evasão e negativo de atração pelo solo testado. A amostra foi considerada tóxica (com função de habitat do solo limitada) quando foram encontrados mais de 80% do total de organismos exposto na amostra do solo controle (evasão > 60%).

4.2.5 Ensaio crônico

No experimento avaliou-se as amostras de solo com potencial para interferir na reprodução das minhocas. O ensaio foi realizado de acordo com as especificações da ISO 11268-2 (ISO, 2012) e OECD 222 (OECD, 2004).

Inicialmente os organismos foram sincronizados, o que consistiu em minhocas juvenis, sem clitelo desenvolvido, colocadas individualmente em placas de Petri contendo uma porção de solo não contaminado e esterco bovino como fonte alimentar. As placas sofreram perfurações que permitiram as trocas gasosas. Posteriormente as placas foram acondicionadas em sala com temperatura e fotoperíodo natural, onde permaneceram até os organismos atingissem a fase adulta (clitelo desenvolvido). Semanalmente, os organismos eram retirados da placa para troca de substrato e alimento. O processo de sincronização levou aproximadamente oito semanas até que os organismos estivessem na fase adulta.

A montagem do ensaio consistiu em adicionar o solo coletado de cada ponto de amostragem e a inclusão dos organismos em cada unidade experimental. Os recipientes foram fechados com tecido não tecido, para limitar a perda de umidade do substrato e evitar a fuga das minhocas. Ao final de 28 dias, as minhocas foram removidas, e os casulos deixados nos solos contaminados durante um período de 56 dias. Após este período, o número de casulos, bem como os juvenis foram contados para determinar o sucesso reprodutivo, sendo a razão entre essas duas variáveis.

4.2.6 Determinações dos biomarcadores

Para a determinação dos biomarcadores, os organismos foram expostos às amostras de solo por 28 dias. De duas a três minhocas foram coletadas de cada

unidade no 3^o, 7^o, 14^o e 28^o dia de experimento, posteriormente foram lavadas com água destilada, e armazenadas em placas de petri sobre filtro de papel úmido por 24 horas. Posteriormente, as minhocas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até realização das determinações enzimáticas.

Para os ensaios foram preparados homogeneizados do corpo da minhoca com tampões tampão fosfato de sódio (TFNa⁺, 50 mM, pH 7,2) para determinação da AChE e tampão fosfato de potássio (TFK, 20 mM, pH 7,5) para SOD CAT e TBARS. As amostras foram mantidas em gelo ao longo de todo o procedimento. Os homogeneizados foram centrifugados a 4000 rpm durante 15 min. O sobrenadante resultante foi armazenado a ~20°C para as determinações bioquímicas.

4.2.6.1 Atividade da catalase (CAT)

A atividade do CAT foi ensaiada espectrofotometricamente (NELSON E KIESOW, 1972). A mistura de ensaio consistiu em 2,0 mL de TFK (50 mM, pH 7,0), 50 mL de H₂O₂ (0,3 M) e 50 mL de homogeneizado. A alteração da absorvência de H₂O₂ em 60 s foi medida à 240 nm. A atividade CAT foi calculada e expressa em $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ de proteína.

4.2.6.2 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi realizada nos organismos com base na inibição da reação de superóxido radical com adrenalina, conforme descrito por Misra e Fridovich (1972). Neste método, a SOD presente na amostra compete com o sistema de detecção do radical superóxido. A oxidação da adrenalina leva à formação do produto colorido, adrenocromo. A atividade de SOD foi determinada medindo a taxa de formação de adrenocromo à 480 nm, num meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM, pH 10) e epinefrina (1 mM). A atividade SOD foi expressa em UI / mg de proteína. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe a taxa de oxidação da adrenalina em 50%.

4.2.6.3 Ensaio de Peroxidação Lipídica (TBARS)

A peroxidação lipídica foi estimada pelo ensaio TBARS, interpretada por uma reação de malondialdeído (MDA) com ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), e medida por espectrofotometria de acordo com Buege e Aust (1978). Nos 100 μ L de amostra foram adicionadas 10% de ácido tricloroacético (TCA) e ácido tiobarbitúrico 0,67% para volume final de 1,0 mL. A mistura da reação foi colocada num tubo de microcentrifugadora e incubada durante 15 minutos a 95° C. Após arrefecimento, foi centrifugado a 4000 rpm durante 15 minutos e a densidade óptica medida por espectrofotometria à 535 nm. Os níveis de TBARS foram expressos como nmol MDA / mg proteína.

4.2.6.4 *Acetil-colinesterase (AChE)*

A atividade de AChE foi medida como descrito por Ellman et al. (1961). Alíquotas de 50 μ L do homogeneizado foram incubadas a 30 °C durante 2 minutos com 800 μ L de TFK (0,1 M, pH 7,5), 750 μ L de H₂O e 200 μ L de DTNB 10 mM como cromógeno. Após 2 minutos, a reação foi iniciada pela adição de 200 μ L de acetiltiocolina (AChE; 0,5 mM), como substrato para a mistura reacional até atingir volume final de 2,0 mL. Foram determinadas absorbâncias à 412 nm durante 2 minutos. A atividade da enzima foi expressa como μ mol de AChE hidrolisado / min / mg de proteína.

4.2.6.5 *Determinação de proteínas*

A proteína das amostras foi determinada por espectrofotometria utilizando a albumina de soro bovino como padrão. A absorbância das amostras foi medida à 595 nm de acordo com Bradford et al. (1976).

4.2.7 **Análise estatística**

Após a obtenção dos resultados das variáveis toxicológicas, os dados foram submetidos a análise utilizando a linguagem e ambiente *R Core Team* – Versão 3.3.1 (AUSTRIA, 2016).

Os dados foram verificados quanto a normalidade e homogeneidade, pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Após confirmação, os resultados

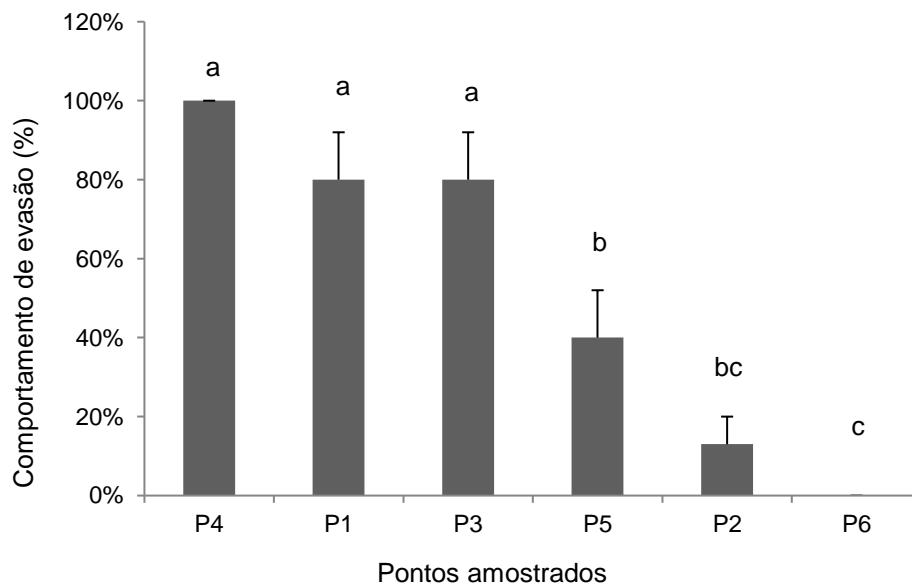
quando paramétricos seguiram para análise de variância (ANOVA) e teste post hoc de Scott-Knott para comparações múltiplas entre as amostras. Quando os dados foram confirmados não paramétricos estes seguiram para o teste de Kruskal-Wallis. Os testes foram realizados a nível de 5% de significância.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Ensaio comportamental

Os critérios de validação do ensaio de evasão foram atendidos, uma vez que não foi observada mortalidade ou perda de organismos e, ocorreu distribuição equitativa em ambas as seções das unidades experimentais com o solo sem contaminação. A Figura 4-2 apresenta os resultados da percentagem de evasão das minhocas expostas ao solo na área contaminada de estudo.

Figura 4-2 - Comportamento de evasão de minhocas (*Eisenia andrei*) em solos coletados em área com dejetos de efluente sanitário. Diferentes letras acima das barras indicam diferenças significativas a $p < 0,05$ entre tratamentos



* Letras iguais não diferem entre si, a 5% de nível de significância.
Fonte: Autora (2017).

No ensaio de evasão de dois dias, os pontos P4, P1 e P3 apresentaram-se tóxicos aos organismos, e considerados limitantes para a função do habitat dos solos,

pois causaram cerca de 80% ou mais de evasão. O P4 apresentou fuga de 100% dos organismos, enquanto os pontos P1 e P3 apresentaram evasão de 80%. Esses pontos foram estatisticamente semelhantes e identificados pelo grupo a, conforme Figura 4-2. Já os solos dos pontos P5 e P2 não foram tóxicos aos organismos, apresentando evasão < 60%, sendo semelhantes estatisticamente. No ponto P6 a distribuição das minhocas se deu de forma igual, conforme requerido pela normativa para o ponto controle.

Os pontos que apresentaram função limitada, P4, P1 e P3, estão sob grande influência do esgoto. P4 localiza-se logo na entrada da área e está sob influência de três fontes pontuais de esgoto. Conforme análise dos atributos do solo, esse ponto é caracterizado por possuir o menor teor de MO e maiores concentrações de metais pesados, além de ser arenoso (82,6%). A combinação de grande porcentagem de areia, baixa matéria orgânica e altos teores de metais, foram primordiais para a evasão dos organismos para o solo controle. Esse fato corrobora com estudo realizado por Cesar et al. (2012) que avaliaram porcentagem de lodos de esgoto e o efeito tóxico em minhocas da espécie *E. fetida*, e concluíram que a textura e matéria orgânica, juntamente com pH, foram responsáveis pelos efeitos comportamentais dos organismos.

O ponto P1 localiza-se estrategicamente na área central de análise e não está sob influência de fontes pontuais. Nesse local, ocorre moderada porcentagem de MO e concentração de P, e elevadas concentrações de todos os metais avaliados (Cu, Zn, Fe e Mn). Apesar do local estar distante das fontes pontuais, esperava-se que a área conseguiria reter os contaminantes a montante, no entanto, isso não ocorreu. O fato desse solo ser tóxico aos organismos, pode estar ligada os metais pesados e a outros contaminantes não avaliados, visto a área receber efluentes dos laboratórios de ensino e pesquisa da instituição.

Baixos teores de matéria orgânica e moderada porcentagem de areia, inviabilizaram a permanência dos organismos do ponto P3, em que apresentou 80% de fuga das minhocas.

As condições do ensaio comportamental são reduzidas pelas dimensões das unidades experimentais e a avaliação do ensaio se dá em um curto espaço de tempo (48h). Esses fatos, impedem tolerâncias aos contaminantes, sendo suas alterações provenientes de regulação induzida pelo organismo para lidar rapidamente com um ambiente em mudança (MORGAN et al., 2007).

Cesar et al. (2012) confirmaram a toxicidade de misturas de solo e lodo de esgoto. Os autores encontraram evasão de *Eisenia andrei* para pequenas doses de lodo (13,32%). Além disso, a maior taxa de esgoto (32,9%) não causou efeitos letais, no entanto, foi capaz de limitar a função de habitat do solo e causar efeitos comportamentais significativos nos organismos testados. As propriedades do solo (textura, pH e matéria orgânica) foram fator primordial para as respostas ecotoxicológicas, que envolve o comportamento futuro de substâncias no meio.

Rastetter e Gerhardt (2015) analisaram o comportamento do organismo *E. fetida* frente a misturas de solo e lodo proveniente de três estações de tratamento de efluentes sanitário na Alemanha. Os resultados indicaram que todos os lodos foram considerados tóxicos a partir de 9 g lodo/kg solo. A evasão de 100% do solo contaminado foi obtida em 45 g/kg.

4.3.2 Ensaio crônico

A Tabela 4.1 apresenta os resultados reprodutivos dos organismos após o tempo de exposição. A variação de peso dos casulos não foi significativa a 5% de nível de significância.

Tabela 4.1 - Parâmetros reprodutivos de *Eisenia andrei* expostas ao solo da área de estudo, após 56 dias em condições controladas

Ponto	Número de casulos	Número de juvenis	Sucesso reprodutivo	Peso de casulos (mg)
P6	36 a	90 a	2,5 ab	9,85 ns
P1	28 a	10 c	0,4 bc	10,25
P2	21 b	69 ab	3,2 a	9,80
P4	16 b	42 b	3,82 a	9,90
P3	14 b	38 b	4,33 a	10,55
P5	11 b	1 c	0,11 c	9,75

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si a 5% de nível de significância.

Fonte: Autora (2017).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.1, o maior número de casulos foi observado no ponto controle, P6, com 36 casulos ao final dos 28 dias e 2,5 organismos para cada ovo.

O P1 foi estatisticamente semelhante ao P6, com 28 casulos, no entanto, esse ponto teve baixo sucesso reprodutivo, com 0,4 juvenis para cada ovo encontrado. O peso médio dos casulos foi maior que P6. É possível que esse aumento esteja relacionado ao sucesso reprodutivo. Bengtsson et al. (1986) demonstraram que uma proporção da concentração de Cu do tecido da geração original de minhocas foi transferida para seus casulos, e isso pode ter gerado um aumento de peso, fazendo com que os casulos tenham desenvolvido paredes ou membranas mais espesas (contribuindo assim para a sua massa maior) para prevenir ou reduzir a difusão de Cu no casulo (SPURGEON e HOPKIN, 1996; ARNOLD et al., 2008).

O P1 localiza-se no centro da área de estudo, sendo um local alagado com presença da macrofita *Typha domingensis*, e conforme análise química, alto valor de matéria orgânica e metais pesados. Num primeiro momento, houve uma grande produção de ovos, mas a sobrevivência dos organismos não foi viável nesse solo.

O P2 apresentou 22 casulos com sucesso reprodutivo de 3,18 organismos para cada ovo, sendo estatisticamente semelhantes aos pontos P4 e P3, em todas as variáveis ecotoxicológicas analisadas. P2 e P3 estão próximos e sob influência da mesma fonte pontual (FP-50). Já o ponto P4, apesar de estar sob grande influência das fontes pontuais, e conseqüentemente de contaminantes, os resultados apresentam elevado sucesso reprodutivo quando comparado ao solo controle, sendo que a introdução de matéria orgânica, presente no esgoto, favoreceu a reprodução dos organismos nesse ponto analisado.

O ponto P5 foi estatisticamente semelhante aos pontos P2, P3 e P4 em termos de produção de ovos, porém apresentou baixo sucesso reprodutivo, com 0,11 indivíduos para cada ovo, ou seja, de cada dez ovos produzidos, apenas um organismo foi viável nesse solo. A reduzida produção de casulos e viabilidade da população pode ser considerada um possível custo da tolerância aos contaminantes (ARNOLD, et al., 2008). A produção de casulo é uma das respostas mais sensíveis nos ensaios de toxicidade crônica com forte diminuição de ovos com aumento das concentrações de metais (NAHMANI et al. 2007). O custo da reprodução é dispendioso e, portanto, o investimento na reprodução atual deve ser negociado contra o futuro potencial reprodutivo ou a própria sobrevivência do organismo (DOWLING e SIMMONS, 2009). Apesar de não ocorrer mortalidade dos organismos no ponto P5, foi encontrado poucos casulos em relação ao solo controle. Esse fato

destaca, a escolha dos organismos em sobreviver do que gerar novos indivíduos para a população.

Além da baixa produção de casulos no ponto P5, os ovos apresentaram coloração preta, sugerindo que pode ser indicativo de uma infecção, conforme relatado por Arnold et al. (2008), e pode ser considerado um custo metabólico do desenvolvimento da tolerância aos contaminantes, isto é, a energia gasta para permitir a sobrevivência das minhocas ou dos casulos resultou em uma susceptibilidade aumentada dos casulos à infecção.

Žaltauskait e Sodien (2014), também verificaram diminuída produção de casulos quando em contato com solo contaminado por metais. Os autores verificaram que esse fato foi devido pelo tempo de maturação prolongado desmostrando que essa resposta toxicológica é de alta relevância ecológica.

Cesar et al. (2010) verificaram que o lodo de esgoto sanitário não foi capaz de provocar mortalidade significativa sob exposição aguda em *Eisenia andrei*, porém causou efeitos letais sob exposição crônica. Além disso, os autores confirmaram a elevada toxicidade crônica pela ausência de casulos, sugerindo que os contaminantes presentes no lodo de esgoto provocaram efeitos adversos à reprodução das minhocas.

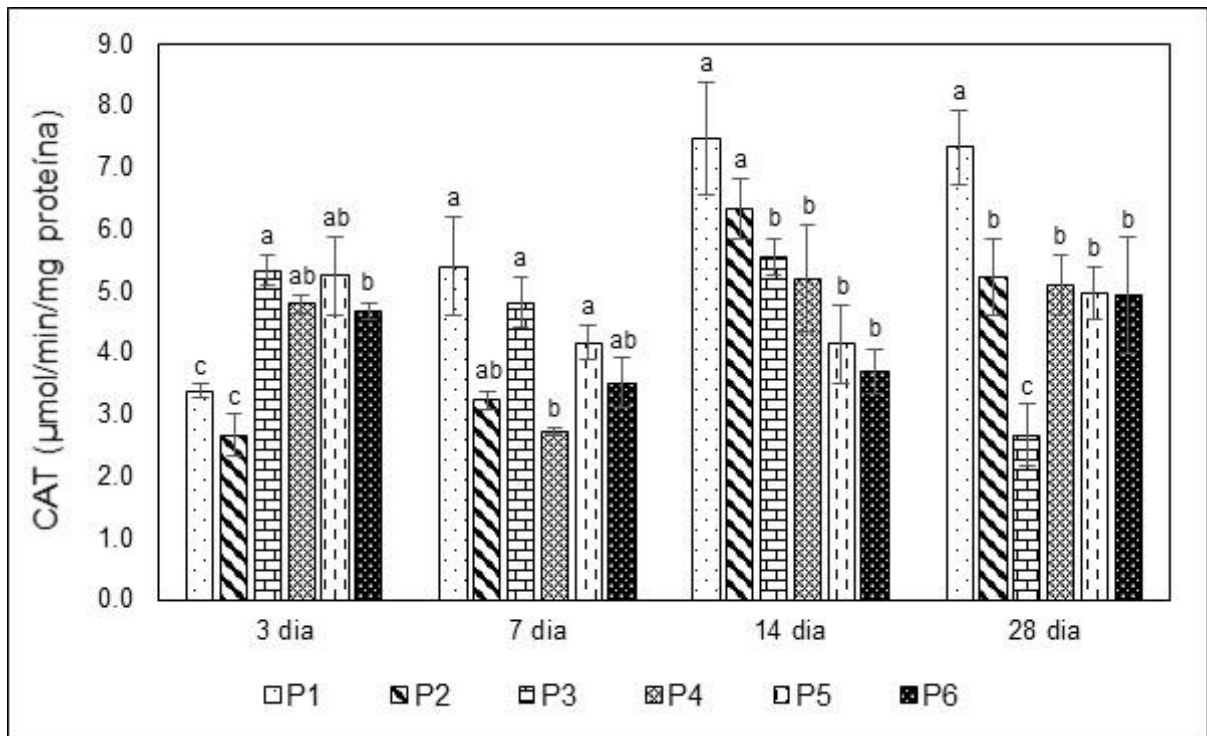
Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2013). Os autores verificaram que o lodo de esgoto sanitário, em exposição crônica, não ocorreu reprodução em nenhum tratamento envolvendo adição do resíduo, no qual não foram observados casulos nem organismos jovens.

4.3.3 Determinações dos biomarcadores

A atividade da enzima catalase no tempo de exposição analisado, é apresentado na Figura 4-3. No 3º dia de exposição, foi observado baixa atividade da enzima nos pontos P1 e P2, enquanto P3 apresentou mediana de 5,34, sendo estatisticamente maior que o solo controle (P6). Aos 7 dias de exposição, a atividade da CAT nas minhocas foi bastante variável, as maiores medianas apresentadas foram nos pontos P1, P3 e P5, no entanto, foram semelhantes ao do controle (P6), não diferindo estatisticamente. Aos quatorze dias de exposição, a atividade de CAT foi significativamente superior ao do solo controle nos pontos P1 e P2. Já no dia 28 os

pontos P1 e P3 apresentaram maior e menor atividade de CAT quando comparados ao solo controle.

Figura 4-3 - Atividade de catalase em *Eisenia andrei* expostas as amostras coletas de área contaminada por efluente sanitário aos 3, 7 dias, 14 e 28 dias de exposição. As barras representam as medianas e as linhas verticais o erro padrão (n = 6). Diferentes letras acima das barras indicam 5% de nível de significância



Fonte: Autora (2017).

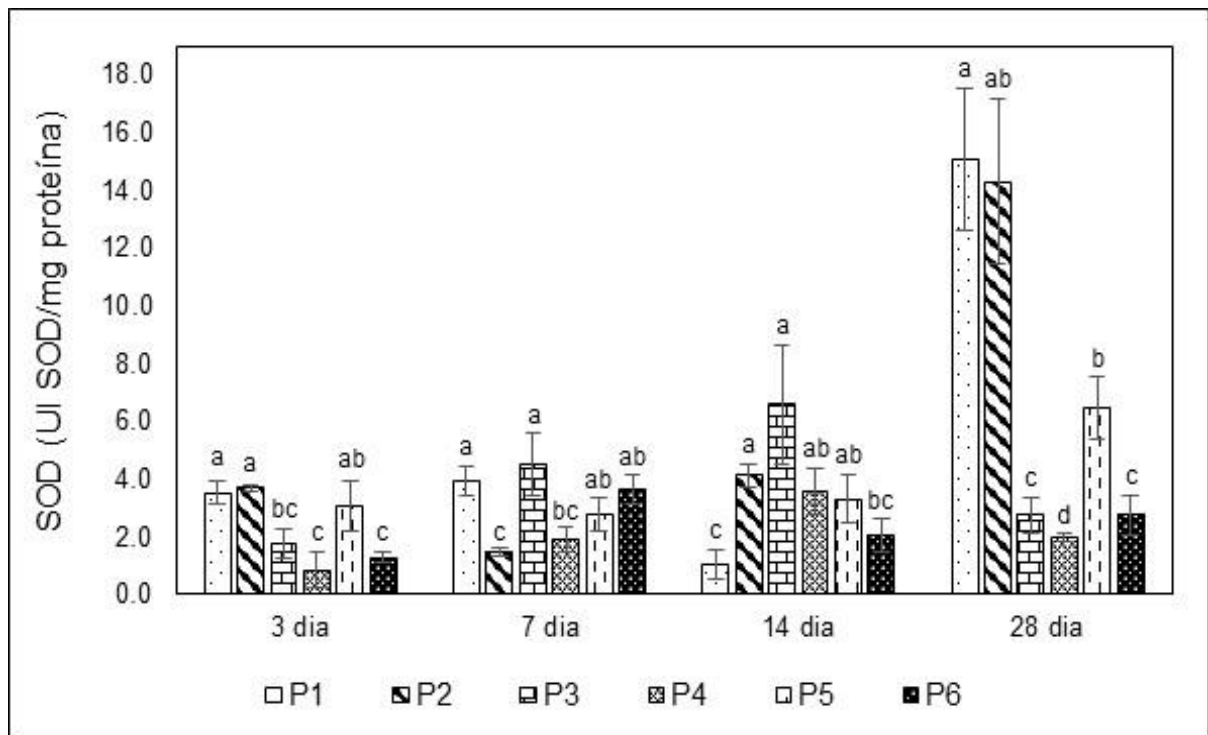
Inicialmente, os pontos P1 e P2, registraram valores baixos da atividade da CAT em comparação ao controle. Após o 7º dia houve uma recuperação até o 28º dia. O efeito mais comum de CAT contra uma situação tóxica é a indução de atividade que é considerada benéfica para lidar com uma condição de estresse, ou seja, é uma adaptação metabólica à exposição contínua ao solo contaminado e uma resposta de defesa contra danos oxidativos (WANG et al., 2012)

A atividade da catalase nos pontos P3, P4 e P5 foi diminuindo gradualmente seus valores até o dia 28º. A explicação para esse resultado pode ser que a defesa natural antioxidante foi saturada, devido a quantidade gerada de espécies reativas de oxigênio excedeu a capacidade de defesa do organismo, ocasionando a redução gradual na atividade da enzima (WANG et al., 2012; ZHOU et al., 2013).

Nota-se que de maneira geral ocorreu um aumento significativo dos níveis das enzimas analisadas no pontos P1 e P2, indicando respostas adaptativas dos organismos para neutralizar o efeito oxidativo das ERO geradas (NOVAIS et al., 2011), o qual sugere mecanismo de desintoxicação (ABHIJITH et al., 2016). Kiliç (2011) também encontrou alterações na atividade da CAT em áreas contaminadas por metais na Turquia, o que conforme o autor, constitui de um aviso prévio de mudança ecológica nas regiões avaliadas.

O efeito do solo contaminado sobre a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase pode ser visualizado na Figura 4-4. Os pontos P1, P2 e P5 apresentaram elevada atividade quando comparadas ao solo controle, aos três dias de exposição. No dia 7, apenas o solo do P2 diferiu estatisticamente do solo controle, apresentando baixa atividade da SOD. No 14º dia de exposição, a SOD foi estatisticamente maior no solo dos pontos P2 e P3. No dia 28, todos os pontos analisados, com excessão do P3, foram diferentes do solo controle. Os pontos P1, P2 e P5 apresentaram valores superiores, enquanto P4 foi estatisticamente inferior.

Figura 4-4 - Atividade de superóxido dismutase em *Eisenia andrei* expostas as amostras coletadas de área contaminada por efluente sanitário aos 3, 7, 14 e aos 28 dias de exposição. As barras representam as medianas e as linhas verticais o erro padrão (n = 6). Diferentes letras acima das barras indicam 5% de significância



Fonte: Autora (2017).

A SOD é uma enzima essencial do sistema de defesa antioxidante da minhoca e desempenha um papel importante na dismutação de radicais hidróxido pela formação de peróxido de hidrogênio. Conforme apresentado na Figura 4-4, a SOD foi significativamente induzida nos pontos P1, P2 e P5, em relação ao controle ao final dos 28 dias de incubação ($p < 0,05$). Isso pode estar ligado ao fato dos contaminantes provocarem elevação das quantidades de O_2 , o que culminou na estimulação da atividade da SOD nesses pontos de amostragem. O P3 obteve inicialmente uma indução, no entanto ao final do experimento, a atividade da SOD neste ponto foi inibida em relação ao controle. O ponto P4 apresentou valores baixos em relação com solo controle, com baixa atividade da SOD. A diminuição da atividade da superóxido dismutase pode resultar da eliminação do oxigênio singuleto altamente reativo, que foi convertido para peróxido de hidrogênio pela SOD.

Wang et al. (2012) avaliaram os efeitos das enzimas SOD e CAT em minhocas da espécie *Eisenia fetida* sob exposição de dois pesticidas organofosforados. Os resultados mostraram que os pesticidas afetaram a atividade das enzimas e induziram efeitos adversos nas minhocas, demonstrando que o estresse bioquímico nos organismos dessa espécie pode ser importantes mecanismos de toxicidade.

Estudo de Zheng et al. (2013) em uma área contaminada por metais pesados na China, avaliaram SOD em minhocas da espécie *Eisenia fetida*. As enzimas avaliadas foram inibidas durante o período de exposição. Os autores sugeriram que os atributos do solo, tais como pH e MO, são importantes fatores para a biodisponibilidade dos metais, aliado, ao fato das enzimas analisadas, não serem adequadas para o referido caso.

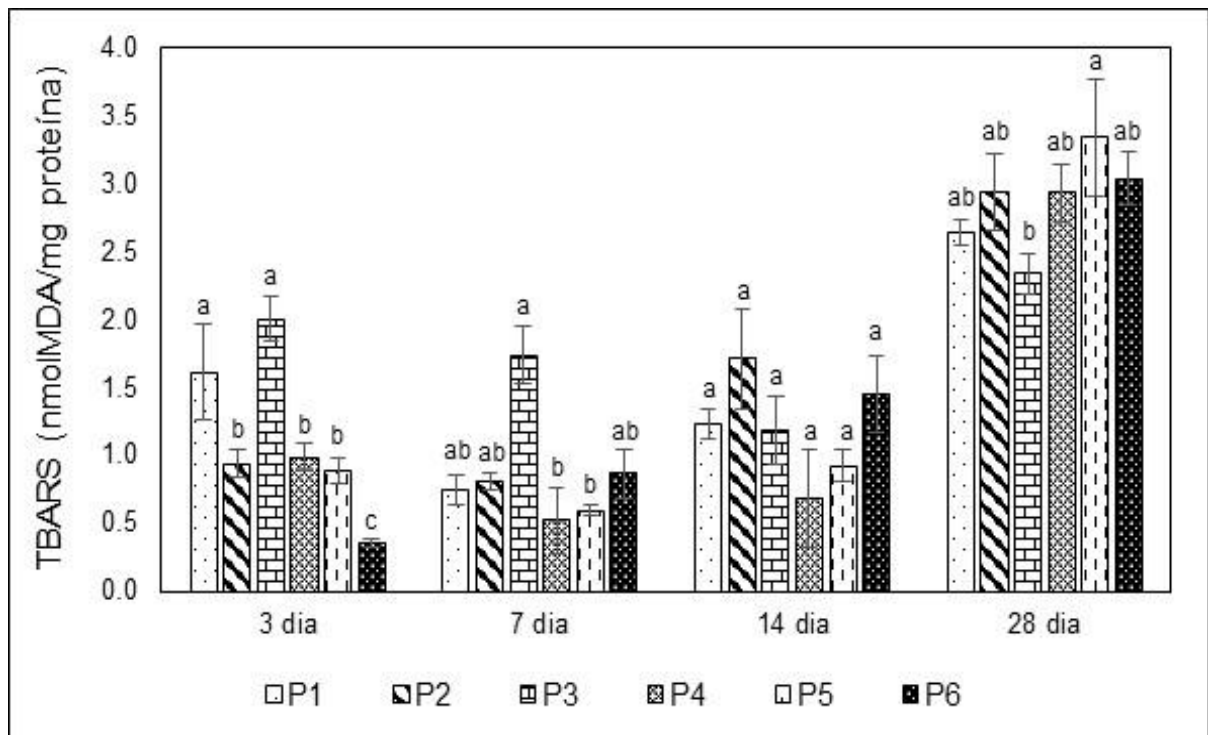
Considerando as principais enzimas antioxidantes para neutralização de ERO em todos os organismos, é possível separar as atividades da SOD e CAT. Estas enzimas antioxidantes são essenciais para a conversão de ERO em metabolitos inofensivos e podem ser aumentados ou inibidos sob estresse químico. Podem trabalhar conjuntamente para converter oxigênio singuleto e peróxido de hidrogênio, reduzindo a formação do radical hidroxila, um oxidante tóxico e ativo, bem como um menor conteúdo global de radicais livres das células (HU et al., 2010).

Em termos de mecanismos pelos quais os metais exercem efeitos tóxicos, sabe-se que Cu e Fe podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio através da reação de Fenton (WANG et al., 2012), podendo vir a interferir na atividade de enzimas antioxidantes, tais como SOD e CAT.

Os contaminantes do solo podem afetar a reprodução da minhoca através de caminhos diretos ou indiretos. A via indireta pode ser melhor explicada pela diminuição da energia disponível para a reprodução devido ao seu uso para compensar a energia necessária para os mecanismos de defesa (SAVARD et al., 2007). No presente estudo, os pontos P1 e P5 obtiveram elevadas atividades das enzimas antioxidantes, além dos maiores danos na reprodução.

O efeito do solo da área contaminada sobre a peroxidação lipídica foi determinada pela avaliação do teor de MDA nos organismos e seus resultados podem ser visualizados na Figura 4-5. No 3º dia de exposição foi observada diferença significativa na peroxidação lipídica. Todos os pontos de amostragem analisados apresentaram valores superiores ao do solo controle.

Figura 4-5 - Níveis de malondialdeído em *Eisenia andrei* expostas as amostras coletas de área contaminada por efluente sanitário aos 3, 7, 14 e 28 dias de exposição. As barras representam as medianas e as linhas verticais o erro padrão (n = 6). Diferentes letras acima das barras indicam 5% de significância



Fonte: Autora (2017).

Aos 3 dias de exposição ao solo contaminado em todos os pontos coletados, ocorreu peroxidação lipídica devido aos valores de MDA serem significativamente

elevados em relação ao controle, e esse aumento perdurou pelo resto da exposição, no entanto, seus valores foram semelhantes ao controle.

Para garantir o metabolismo fisiológico normal dos organismos, as enzimas antioxidantes SOD e CAT, trabalham mutuamente para limpeza de radicais livres causado pelo metabolismo normal ou estresse oxidativo. Se a atividades dessas enzimas for inibida ou o conteúdo de radicais livres exceder o limite da capacidade de remoção, o equilíbrio oxidação-antioxidação será desestabilizado, e na sequência ocorrerá o mecanismo de danos oxidativos nas células do tecido, que é a peroxidação lipídica (ZHANG et al., 2014; ZHOU et al. 2016).

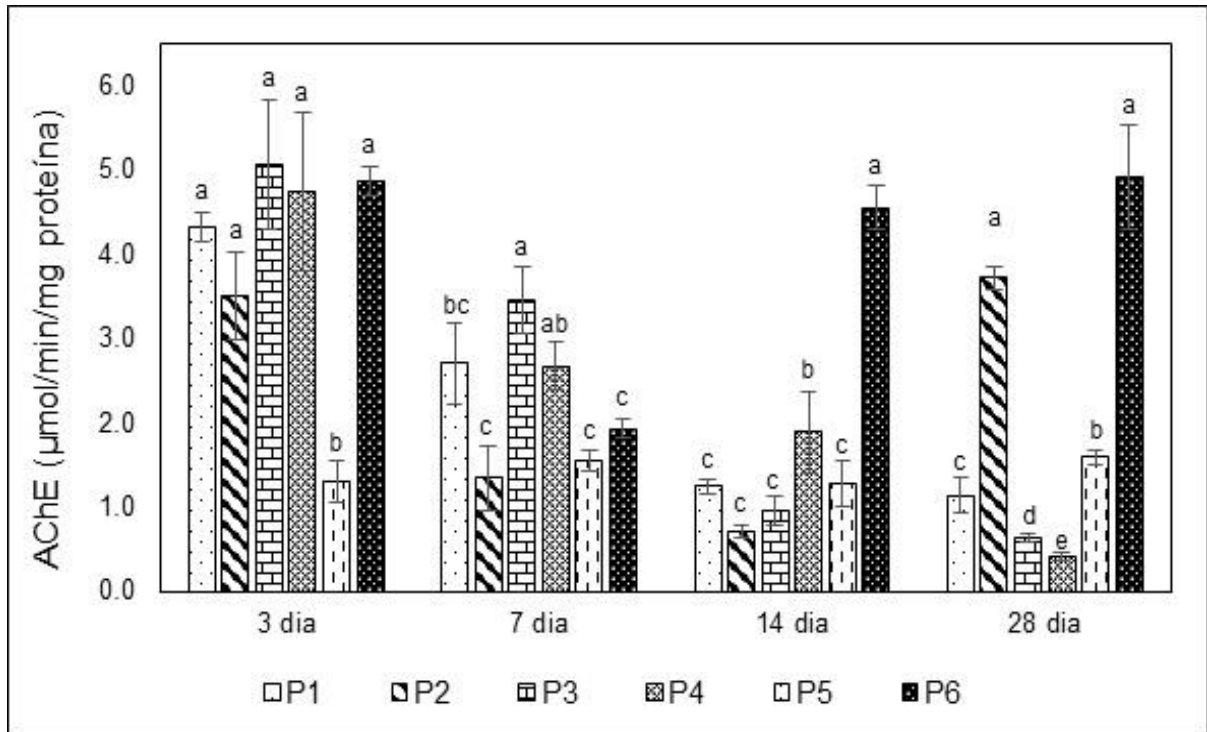
No presente estudo, a acumulação das ERO, aliado a elevação das atividades da SOD e CAT, podem ser observadas no aumento dos níveis do malondialdeído, indicando que ocorreu dano oxidativo. Žaltauskait e Sodien (2014) também identificaram danos a parede lipídica pelo aumento dos níveis de MDA de minhocas expostas por metais pesados causado por estresse oxidativos.

O fato de que nenhum aumento adicional no MDA, em relação ao controle no dia 28, pode estar associado a um dano extremo que ocorreu na membrana celular que pode ter levado à sua ruptura e, conseqüentemente, a níveis mais baixos de peroxidação lipídica, como é o caso do P3; ou uma tentativa dos organismos para eliminar o fator de estresse e recuperar o estado oxidativo padrão (NOVAIS et al., 2011).

Em estudo em área de mineração, Boughattas et al. (2016) verificaram a desestabilização da membrana lisossômica em *Eisenia andrei* devido a presença de metais pesados. As células estressadas afetadas pelos químicos, reagiram através da degradação de macromoléculas celulares e organelas.

A atividade da enzima acetilcolinesterase nas minhocas expostas ao solo contaminada com efluente no 3° dia foi variável (Figura 4-6). Os pontos P1, P2, P3 e P4 foram semelhantes ao controle (P6), com exceção do ponto P5, que apresentou baixa atividade da enzima. No 7° dia os pontos P3 e P4 apresentaram indução da AChE e foram estatisticamente superiores ao controle. No 14° dia de exposição em todos os pontos analisados, houve decréscimo na atividade da acetil, sendo estatisticamente menores do que o solo controle a 5% de significância. No 28° os organismos do ponto P2 se recuperaram e os valores da atividade da acetil foram semelhantes ao controle, no entanto, os pontos P1, P3, P4 e P5 obtiveram reduzida atividade da acetilcolinesterase.

Figura 4-6 - Atividade da acetilcolinesterase em *Eisenia andrei* expostas ao solo contaminado com efluente em diferentes tempos de exposição aos 3, 7, 14 dias e 28 dias de exposição. As barras representam as medianas e as linhas verticais o erro padrão (n = 6). Diferentes letras acima das barras indicam 5% nível de significância



Fonte: Autora (2017).

No presente trabalho, no 7º dia, os solos do ponto P3 e P4, e P2 no 28º dia de exposição, foram observados um incremento na atividade da enzima. Este aumento elevado, pode ser uma resposta compensatória protetora a toxicidade ocasionada pela exposição dos organismos aos solos contaminados, o que culmina em uma adaptação temporária ocasionando um aumento na atividade da acetilcolinesterase em minhocas *Eisenia andrei*. Resultados semelhantes foram encontrados por Zheng et al. (2013) em uma área contaminada por metais pesados, o qual encontraram estimulação na produção da enzima AChE.

Porém, aos 14 e 28 dias de exposição foi observada uma inibição na atividade enzimática. Esta exposição contínua aos solos pode ter excedido a capacidade das células em suportar o estresse, conduzindo assim a uma diminuição na atividade da enzima, fazendo com que o neurotransmissor acetilcolina se acumule, conduzindo a uma desordem no sistema nervoso.

Ao contrário do presente estudo, Novais et al. (2011) não observaram alterações da enzima AChE em minhocas expostas a concentrações máximas de 100 mg kg⁻¹ de zinco.

Comparando os resultados da atividade da AChE e o ensaio comportamental, é possível identificar que aos 28° dias da exposição, o P4 apresentou a menor atividade dessa enzima e 100% de evasão ao solo exposto após 48h, já o P2 no ensaio de evasão apresentou a menor fuga (13%), indicando que a AChE pode estar envolvida na transmissão neuromuscular, no entanto, são necessários maiores estudos para relacionar esses resultados (NOVAIS et al., 2011).

Novais et al. (2011) avaliaram os efeitos toxicológicos de zinco e cádmio na oligoqueta da espécie *Enchytraeus albidus*, e verificaram alterações na sobrevivência e reprodução dos organismos. Aliado a isso, os contaminantes induziram mudanças significativas nas atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT, bem como aumento da peroxidação lipídica, indicando danos oxidativos. As respostas bioquímicas avaliadas foram sensíveis, confirmando que o conjunto de biomarcadores, juntamente com as alterações nos níveis mais elevados de organização biológica, são importantes para avaliar os efeitos e mecanismos de ação dos contaminantes nos organismos.

De acordo com Dowling e Simmons (2009), as espécies reativas de oxigênio que induzem o estresse oxidativo foram discutidos como importantes mediadores do custo da reprodução nos organismos. A reprodução diminui as defesas antioxidantes e, portanto, o estresse oxidativo representa um custo de reprodução, indicando uma ligação entre os ensaios crônicos e a susceptibilidade ao estresse oxidativo (ALONSO-ALVAREZ et al., 2004). De fato, isso ocorreu, visto os pontos de amostragem que obtiveram danos reprodutivos e comportamentais, por sua vez, também induziram alterações nas respostas bioquímicas, sugerindo uma ligação entre os ensaios, no entanto, maiores estudos são necessários para confirmar e averiguar esses mecanismos.

As maiores alterações nas respostas toxicológicas foram observadas nos pontos amostrados P1, P4 e P5, e são nestes pontos que ocorreram as maiores concentrações de Cu e Zn. O ponto P4 localiza-se na entrada da área do estudo e recebe as maiores cargas de efluente e apresentou as maiores concentrações da área de estudo de cobre (7,96 mg kg⁻¹) e zinco (37,62 mg kg⁻¹). Nesse ponto obteve-se alterações no comportamento, reprodução e os mais elevados danos a

neurotransmissão dos organismos. O ponto P1 está no centro da área, além de apresentar comportamento de evasão ao solo, e danos na reprodução, os organismos expostos a esse solo, entraram em intenso estresse oxidativo, visto registrar as maiores atividades das enzimas CAT e SOD. O P5 está localizado na saída do canal de drenagem da área, além do dano a reprodução dos organismos, esse ponto apresentou os mais elevados danos na membrana lipídica, pelo ensaio de TBARS.

As alterações dos biomarcadores eram esperadas para os pontos com os maiores teores de Cu e Zn, o que se confirmou. No entanto, nos pontos P2 e P3, os quais apresentaram as menores concentrações desses metais, porém as maiores de Fe e Mn, foi expressiva as atividades da CAT e SOD ao longo do tempo.

Brulle et al. (2007) expuseram *Eisenia fetida* a várias concentrações de Cu durante 14 dias. Os autores encontraram alterações da CAT na concentração de 40 mg kg⁻¹ após 14 dias de exposição, e a SOD não sofreu alteração mesmo na maior concentração testada, de 400 mg kg⁻¹. Xiong et al. (2013) avaliaram CAT e SOD em minhocas expostas a concentrações de Zn. A CAT foi alterada após 5 dias na concentração de 250 mg kg⁻¹, enquanto que a SOD foi modificada apenas 15 dias após a exposição.

As concentrações de metais do presente estudo, estão bem aquém dos valores apresentados pela bibliografia para alterações nas enzimas antioxidantes, além de estarem abaixo da normativa brasileira. A Resolução CONAMA N° 420/2009 apresenta os valores orientadores de qualidade do solo para Cu e Zn, e estabelece 60 mg kg⁻¹ e 300 mg kg⁻¹, respectivamente, como valores de prevenção (VP)¹ para esses metais. Aliado a isso, para Fe e Mn, os valores para investigação do solo, são de 2450 mg kg⁻¹ e 400 mg kg⁻¹, respectivamente.

De acordo com Zheng et al. (2013) a exposição simultânea a misturas, pode levar a antagonismos, não necessariamente aos efeitos aditivos ou sinérgicos dos contaminantes em separado. Em um solo contaminado real, os poluentes geralmente coexistem no ambiente e potencialmente interagem uns com os outros, o que complicam seus mecanismos de reação. Logo, não foi possível atribuir um contaminante como principal causador do estresse dos organismos.

¹ VP é o valor limite de uma determinada substância, de modo que seja capaz de sustentar as suas funções principais e foi estabelecido baseado em análise de fitotoxicidade e avaliação de risco ecológico.

Associar as respostas toxicológicas aos atributos físico-químicos do solo é demasiadamente prematuro, pois deve-se mencionar que outros contaminantes não avaliados, podem contribuir para os resultados encontrados. Os solos foram coletados de uma área receptora de efluentes de uma universidade, no qual inclui dejetos de atividades humanas básicas, bem como resíduos laboratoriais. Uma investigação mais aprofundada se faz necessário para determinar a interação entre os diversos contaminantes.

No entanto, a avaliação dos efeitos do efluente sanitário no solo, tanto em nível individual e de população, é importante para a avaliação do risco ecológico, pois auxiliam na identificação dos efeitos dos estressores e dos mecanismos de toxicidade (UWIZEYIMANA et al., 2017), mesmo não sendo possível indicar propriamente qual contaminante causou os efeitos toxicológicos.

4.4 CONCLUSÃO

O ensaio comportamental foi de grande valia, uma vez que as respostas de evasão podem ser usadas como ferramenta de triagem para monitorar o nível de poluição e biodisponibilidade de contaminantes em solos alterados com lançamento de efluentes. Esse teste é um ensaio simples e pode ser realizado em um curto período de tempo.

No ensaio crônico, alguns pontos de amostragem apresentaram baixo sucesso reprodutivo, sugerindo que a área, devido ao descarte constante de lançamento de efluentes, não consegue mais reter os contaminantes e conseqüentemente estes, são tóxicos aos organismos. Desta forma, deve-se considerar que o descarte de efluente de esgoto e suas cargas constantes no solo podem resultar em potenciais riscos ecológicos para a macrofauna terrestre.

Os resultados dos biomarcadores demonstraram que a exposição a solos com misturas de contaminantes provocaram efeitos adversos em todos os biomarcadores analisados. O aumento na atividade das enzimas CAT e SOD das minhocas expostas aos solos, evidencia o mecanismo de defesa dos organismos em resposta ao estresse causado pelos contaminantes presentes na área contaminada. O aumento nos níveis de MDA demonstraram a peroxidação lipídica ocasionada na membrana celular das minhocas em decorrência da exposição ao solo contaminado, porém o sistema de defesa antioxidante impediu danos ao longo do tempo. A atividade da enzima

acetilcolinesterase foi inibida em todos os pontos analisado, refletindo o efeito negativo da exposição dos organismos ao solo da área contaminada.

A análise química do solo englobou a determinação de poucos contaminantes, sendo necessário maiores avaliações, visto a área de estudo receber inúmeros tipos de efluentes, sendo esses provenientes de laboratórios de ensino e pesquisa da universidade, com ampla manipulação de substâncias. No entanto, o conjunto das respostas toxicológicas foram ferramentas essenciais para a avaliação da toxicidade do solo, respondendo apenas a fração biodisponível de contaminantes.

A abordagem de toxicológica utilizada nesse trabalho permitiu avaliar as respostas dos organismos expostos aos contaminantes presentes no solo da área de disposição de efluente. Os resultados encontrados são de grande importância para avaliação da qualidade desse compartimento ambiental, bem como a tomada de decisão para programas de monitoramento, e o estabelecimento de procedimentos de remediação de áreas impactados por esse tipo de resíduos.

4.5 REFERÊNCIAS

ABHIJITH, B. D.; RAMESH, M.; POOPAL, R. K. Responses of metabolic and antioxidant enzymatic activities in gill, liver and plasma of *Catla catla* during methyl parathion exposure. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, v. 77, p. 31 -40, 2016.

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO 17512-1: Qualidade do solo – Ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento. Parte 1: Ensaio com minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*). Rio de Janeiro, 2011, 26p.

ALONSO-ALVAREZ, C.; BERTRAND, S.; DEVEVEY, G.; PROST, J.; FAIVRE, B.; SORCI, G. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters*, v. 7, p. 363–368, 2004.

ARNOLD, R. E.; HODSON, M. E.; LANGDON, C. J. A Cu tolerant population of the earthworm *Dendrodrilus rubidus* (Savigny, 1862) at Coniston Copper Mines, Cumbria, UK. *Environmental Pollution*, v. 152, p. 713-722, 2008.

BARBOSA, J. S.; CABRAL, T. M.; FERREIRA, D. N.; AGNEZ-LIMA, L. F.; DE MEDEIROS, S. R. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, n. 3, p. 320-325, 2010.

BORI, J.; VALLE` S, B.; NAVARRO, A.; RIVA, M. C.; Ecotoxicological risks of the abandoned F–Ba–Pb–Zn mining area of Osor (Spain). *Environmental Geochemistry and Health*, v. 39, n. 3, p. 665–679, 2017.

BOUGHATTAS, I.; HATTAB, S.; BOUSSETTA, H.; SAPPIN-DIDIER, V.; VIARENGO, A.; BANNI, M.; SFORZINI, S. Biomarker responses of *Eisenia andrei* to a polymetallic gradient near a lead mining site in North Tunisia. *Environmental Pollution*, v. 218, p. 530-541, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRULLE, F.; MITTA, G.; LEROUX, R.; LEMIÈRE, S.; LEPRÊTRE, A.; VANDENBULCKE, F. The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: a trade-off mechanism? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 144, n. 4, p. 334 – 341, 2007.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology*. v. 52, p. 302–309, 1978.

CALISI, A.; LIONETTO, M. G.; SCHETTION, T. Biomarker response in the earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to chemical pollutants. *Science of the Total Environment*, v. 409, p. 4456–4464, 2011.

CESAR, R.; ALVARO, T.; SILVA, M.; COLONESE, J.; MOREIRA, C.; POLIVANOV, H.; EGLER, S.; BIDONE, E.; CASTILHOS, Z. Biodisponibilidade de contaminantes em solos brasileiros tratados com lodo de esgoto: uma abordagem ecotoxicológica utilizando bioensaios com organismos aquáticos e edáficos. *Geochimica Brasiliensis* v. 24, n.1, p. 41-49, 2010.

CESAR, R.; SILVA, M.; COLONESE, J.; BIDONE, E.; EGLER, S.; CASTILHOS, Z.; POLIVANOV, H. Influence of the properties of tropical soils in the toxicity and bioavailability of heavy metals in sewage sludge-amended lands. *Environmental Earth Sciences*, v. 66, n. 8, p. 2281–2292, 2012.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009.

CRESPO, M. A. D.; HERNÁNDEZ, Z. E. S.; HUERTA, A. M. T.; RODRÍGUEZ, M. L. N.; BARAJAS, E. C.; VELA, A. F. Effect of the Heavy Metals Cu, Ni, Cd and Zn on the Growth and Reproduction of Epigeic Earthworms (*E. fetida*) during the Vermistabilization of Municipal Sewage Sludge. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 223, n. 2, p. 915–931, 2012.

DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 276, p. 1737–1745, 2009.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, J. R. V. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88–95, 1961.

GASTALDI, L.; RANZATO, E.; CAPRÌ, F.; HANKARD, P.; PÉRÈS, G.; CANESI, L.; VIARENGO, A.; PONS, G. Application of a biomarker battery for the evaluation of the sublethal effects of pollutants in the earthworm *Eisenia andrei*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 146, p. 398-405, 2007.

HU, C. W.; LI, M.; CUI, Y.B.; LI, D. S.; CHEN, J.; YANG, L. Y. Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 42, p. 586–591, 2010.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 11268-2: Soil quality -- Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - Part 2: Determination of effects on reproduction. Geneva, 2012, 21 p.

KILIÇ, G. A. Histopathological and biochemical alterations of the earthworm (*Lumbricus Terrestris*) as biomarker of soil pollution along Porsuk River Basin (Turkey). *Chemosphere*, v. 83, p. 1175–1180, 2011.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 247, p. 3170–3175, 1972.

NAHMANI, J.; HODSON, M.; BLACK, S. Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. *Environmental Pollution*, v. 149, p. 44-58, 2007.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). *Analytical Biochemistry*, v. 49, p. 474–478., 1972.

MORGAN, A. J.; KILLE, P.; STURZENBAUM, S. R. Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environmental Science & Technology*, v. 41, p. 1085-1096, 2007.

NOVAIS, S. C.; GOMES, S. I. L.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L.; COEN, W.; SOARES, A. M. V. M.; AMORIM, M. J. B. Reproduction and biochemical responses in *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta) to zinc or cadmium exposures. *Environmental Pollution*, v. 159, p. 1836-1843, 2011.

NUNES, B.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*, v. 62, p. 581 – 594, 2006.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the testing of chemicals n° 222: Earthworm reproduction test. Paris, 2004. 18 p.

OLIVEIRA, L. L. D. Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Universidade de São Paulo, 279p., 2014.

PAUWELS, M.; FRÉROT H.; SOULEMAN, D.; VANDENBULCKE, F. Using biomarkers in an evolutionary context: lessons from the analysis of biological responses of oligochaete annelids to metal exposure. *Environmental Pollution*, v. 179, p. 343-350, 2013.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

RASTETTER, N.; GERHARDT, A. Toxic potential of different types of sewage sludge as fertiliser in agriculture: ecotoxicological effects on aquatic and soil indicator species. *Journal Soils Sediments*, v. 15, p. 565-577, 2015.

SAVARD. K.; BERTHELOT, Y.; SPEAR, P. A.; TROTTIER, B.; ROBIDOUX, P. Y. Effects of HMX-Lead Mixtures on Reproduction of the Earthworm *Eisenia Andrei*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 53, p. 351-358, 2007.

SHI, Z.; TANG, Z.; WANG, C. A brief review and evaluation of earthworm biomarkers in soil pollution assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, p. 13284–13294, 2017.

SILVA, P. R. D.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Use of bioassays to evaluate the effect of acute toxicity, reproduction and increase of biomass of earthworms *Eisenia fetida* in acclimated domestic domestic sewage sludge. *Ecotoxicology Environmental Contamination*, v. 8, n. 1, p. 143-146, 2013.

SPURGEON, D. J & HOPKIN, S. Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference reference to zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 35, p. 86-95, 1996.

UWIZEYIMANA, H.; WANG, M.; CHEN, W.; KHAN, K. The eco-toxic effects of pesticide and heavy metal mixtures towards earthworms in soil. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 55, p. 20-29, 2017.

WANG, J.; ZHU, L.; LIU, W.; WANG, J.; XIE, H. Biochemical responses of earthworm (*Eisenia foetida*) to the pesticides chlorpyrifos and fenvalerate. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 22, n. 3, p. 236–241, 2012.

XIONG, W.; SUN, Y.; ZOU, M.; MUHAMMAD, R. U. H. Molecular cloning, characterization of CAT, and eco-toxicological effects of dietary zinc oxide on antioxidante enzymes in *Eisenia fetida*. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 20, n. 3, p. 1746 – 1755, 2013.

ŽALTAUSKAIT, J.; SODIENĖ, I. Effects of cadmium and lead on the life-cycle parameters of juvenile earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 103, p. 9–16, 2014.

ZHANG, Q.; ZHANG, B.; WANG, C. Ecotoxicological effects on the earthworm *Eisenia fetida* following exposure to soil contaminated with imidacloprid. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, p. 12345–12353, 2014.

ZHENG, K.; LIU, Z. T.; LI, Y.; CUI, Y.; LI, M. Toxicological responses of earthworm (*Eisenia fetida*) exposed to metal-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 20, p. 8382–8390, 2013.

ZHOU, C.F.; WANG, Y.; LI, C. C.; SUN, R.J.; YU, Y.; ZHOU, D. Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Pollution*, v. 180, p. 71 -77, 2013.

ZHOU, D.; NING, Y.; WANG, B.; WANG, G.; SU, Y.; LI, L.; WANG, Y. Study on the influential factors of Cd²⁺ on the earthworm *Eisenia fetida* in oxidative stress based on factor analysis approach. *Chemosphere*, v. 157, p. 181-189, 2016.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo possibilitaram a avaliação da qualidade do solo em uma área de disposição de efluente sanitário sem tratamento adequado em uma universidade no sul do Brasil. Foram realizadas coletas de amostras de solo visando avaliar o local onde os efluentes são despejados, onde infiltram e acumulam-se no solo, e na região onde forma um fluxo de descarte para um canal de drenagem. Os solos foram caracterizados quanto aos seus atributos e preparados para exposição em minhocas da espécie *Eisenia andrei*, visando avaliar os efeitos toxicológicos que os contaminantes afetariam no comportamento, reprodução, sistema antioxidante, peroxidação lipídica da membrana celular e neurotransmissão dos organismos.

A determinação dos atributos do solo, mostrou aporte de Cu e Zn no lançamento dos efluentes, onde eles infiltram e desaguam no canal de drenagem. A utilização de ferramentas multivariadas, por meio de aplicação de análise de componentes principais, análise de agrupamento e correlação de Pearson, aliado aos índices de poluição e de aporte de metais pesados (IP, IPI, IGEO e FE), indicaram que há introdução de metais no meio devido a ação antrópica e sua consequente acumulação e poluição do ambiente. Além disso, a área já não retém mais os contaminantes, visto as similaridades dos atributos entre a entrada e saída do efluente, devido ao lançamento contínuo.

Os ensaios ecotoxicológicos indicaram toxicidade das amostras de solo. No ensaio comportamental ocorreu evasão de 100% dos organismos no ponto onde ocorre o lançamento de efluente. Essa resposta é extremamente relevante, pois se os organismos deixam ou evitam o local contaminado, então tem-se a perda da população e de suas atividades nos processos ecológicos.

O solo afetou a reprodução dos organismos, visto os baixos valores obtidos no sucesso reprodutivo. O ponto de amostragem localizado na saída onde o efluente desagua em um canal de drenagem e segue para um curso d'água, foi o mais crítico. No ensaio crônico os efeitos são subletais e observados em situações em que a concentração do contaminante, às quais os organismos ficam expostos, permitem sua sobrevivência, entretanto afetam as funções biológicas, tais como a reprodução, desenvolvimento de ovos e crescimento. Esse ensaio tem elevada relevância ecológica para a previsão dos impactos sobre o ecossistema terrestre, uma vez que demonstra a dinâmica da população ao longo do tempo.

A determinação dos biomarcadores, verificou aumento na atividade das enzimas CAT e SOD das minhocas expostas aos solos, evidenciando o mecanismo de defesa dos organismos em resposta ao estresse oxidativo. O aumento nos níveis de MDA demonstraram a peroxidação lipídica ocasionada na membrana celular das minhocas, porém o sistema de defesa antioxidante foi eficiente para evitar os danos ao longo do tempo. A atividade da enzima acetilcolinesterase foi inibida em todos os pontos analisado, refletindo o efeito negativo da exposição dos organismos ao solo da área contaminada e provocando danos neurotóxicos. Devido a sua sensibilidade ao estresse da contaminação, os biomarcadores podem ser utilizados como ferramenta potencial para avaliação de áreas contaminada, podendo também ser utilizado como um alerta precoce devido as alterações serem provocadas em subníveis nos organismos.

A análise dos atributos do solo englobou a determinação de poucos contaminantes, sendo necessário maiores avaliações, visto a área de estudo receber inúmeros tipos de efluentes, sendo esses provenientes de laboratórios de ensino e pesquisa, com ampla manipulação de substâncias, não sendo possível associar as respostas toxicológicas especificadamente a algum contaminante.

Apesar do local analisado ser uma situação específica, ou seja, uma área que recebe efluentes de diversas fontes, a maior parte caracteriza-se como efluente doméstico, demonstra a similaridade com a situação brasileira, visto grande parte dos resíduos serem descartados em locais indevidos sem tratamento prévio. A situação aqui avaliada, pode ser estendida a esses locais, e as ferramentas utilizadas serem aplicadas a esses ambientes contaminados por efluente sanitário.

Os resultados aqui encontrados, podem apoiar o futuro estabelecimento de taxas sustentáveis de lançamento de efluente, bem como avaliações de risco ecológico em áreas receptoras de esgoto. Dado o estado atual de contaminação da área, é urgente e necessário propor técnicas de remediação eficiente, objetivando eliminar o possível risco para a saúde humana e ecológica. As técnicas utilizadas no presente trabalho, contribuíram para entender a variabilidade e toxicidade das diferentes fontes de esgoto na área, tornando-se fundamental para aperfeiçoar as aplicações de remediação para cada local em separado, reduzindo a degradação ambiental provocada pelo excesso de descarte, melhorando o ambiente e colaborando para a redução do risco à saúde humana.

6 RECOMENDAÇÕES

i) Inclusão de mais pontos e contaminantes, bem como, amostragens sazonais, visando avaliar a dinâmica dos contaminantes na área. Além disso, sugere-se coletas de organismos presentes naturalmente no local.

ii) Avaliar a mobilidade, disponibilidade, fitotoxicidade e bioacessibilidade de metais pesados para determinar a probabilidade destes de se transferirem do solo para outros ecossistemas, como as águas subterrâneas ou culturas.

iii) A bioacumulação e o metabolismo dos contaminantes devem ser estudados para permitir avaliação do efeito em outros animais (produtores, consumidores primários e secundários), uma vez que as minhocas estão na cadeia alimentar terrestre, podendo potencialmente mediar a transferência de metal do solo para predadores.

iv) Para futuras investigações, sugere-se a inclusão de biomarcadores de exposição a metais (metalotioneínas), danos ao DNA, avaliação de alterações morfológicas, para se verificar a sensibilidade dos organismos frente a esses contaminantes.

v) Alternativas para recuperação da área devem ser avaliadas, no entanto, o tratamento do efluente antes do lançamento, auxiliaria na redução das cargas dos contaminantes, diminuindo o risco ao ambiente e à saúde humana.

7 REFERÊNCIAS

- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15537: Ecotoxicologia terrestre. Ecotoxicidade aguda. Método de ensaio para minhocas. Rio de Janeiro, 2014. 11 p.
- _____. NBR ISO 17512-1: Qualidade do solo – Ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento. Parte 1: Ensaio com minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*). Rio de Janeiro, 2011, 26p.
- ANDRÉA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. *Acta Zoológica Mexicana*, n. 2, p. 95-107, 2010.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos: RiMa, 2004. São Paulo: Intertox, 2004.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista Nutrição*, v. 23, n. 4; p. 629-643, 2010.
- BORI, J.; VALLE` S, B.; NAVARRO, A.; RIVA, M. C.; Ecotoxicological risks of the abandoned F–Ba–Pb–Zn mining area of Osor (Spain). *Environmental Geochemistry and Health*, v. 39, n. 3, p. 665–679, 2017.
- BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2014. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2016.
- CALISI, A.; LIONETTO, M. G.; SCHETTION, T. Biomarker response in the earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to chemical pollutants. *Science of the Total Environment*, v. 409, p. 4456–4464, 2011.
- CAMARGO, F. A. O. et al. Uso de microrganismos para remediação de metais. In: CERETTA, C. A. et al. *Tópicos em Ciência do Solo*. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, v. IV, 2007.
- CAMARGO, O. A.; BETTIOL, W. Agricultura: opção animadora para a utilização de lodo de esgoto. *O Agrônomo*: Campinas, 2000.
- CAMPOS, J. R (Coord). Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. *PROSAB*, Rio de Janeiro, 1999, 464p.
- CESAR, R. G.; EGLER, S. G.; ALAMINO, R. C. J.; POLIVANOV, H.; SILVA, R. C.; CASTILHOS, Z. C.; ARAUJO, P. C. Avaliação do potencial tóxico de latossolos e chernossolos acrescidos de lodo de esgoto utilizando bioensaios com oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*. *Anuário do Instituto de Geociências-UFRJ*, v. 31, n. 2, p. 53-60, 2008.

CHASIN, A. A. M. e PEDROZO, M. F. M. O estudo da ecotoxicologia. In: As bases toxicológicas da ecotoxicologia. AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. (Org.). São Carlos: RiMa, 2004. São Paulo: Intertox, 2004.

CHEN, C.; ZHOU, Q.; LIU, S.; XIU, Z. Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. *Chemosphere*, v. 83, p. 1147–1154, 2011.

COGO, A. J. D.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M. A. SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. *Natureza on line*, v. 7, n. 1, p. 37-42, 2009.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília, 2005.

_____. Resolução n. 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009.

_____. Resolução n. 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do CONAMA. Brasília, 2011.

COSTA, C. H. Estudo ecotoxicológico para valorização do resíduo produzido no processo de polimento de piso porcelanato na indústria cerâmica. 2010. 153 f. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. Toxicidade em Ambientes Aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CRESPO, M. A. D.; HERNÁNDEZ, Z. E. S.; HUERTA, A. M. T.; RODRÍGUEZ, M. L. N.; BARAJAS, E. C.; VELA, A. F. Effect of the Heavy Metals Cu, Ni, Cd and Zn on the Growth and Reproduction of Epigeic Earthworms (*E. fetida*) during the Vermistabilization of Municipal Sewage Sludge. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 223, n. 2, p. 915–931, 2012.

DOMÍNGUES, J.; VELANDO, A. e FERREIRO, A. Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* (Bouche 1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species?. *Pedobiologia*, v. 49, p. 81 -87, 2005.

DORAN, J. W.; ZEISS, M. R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, v. 15, p. 3-11, 2000.

FERREIRA, A. L. A. e MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista Assistência Médica Brasil*, v. 43, n. 1, p. 61 -8, 1997.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 11268-2: Soil quality -- Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - Part 2: Determination of effects on reproduction. Geneva, 2012, 21 p.

_____. ISO 17512-1: Avoidance test for testing the quality of soils and the toxicity of chemicals – Part 1: test with earthworms (*Eisenia foetida* and *Eisenia andrei*). Geneva, 2012, 25 p.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. Testes ecotoxicológicos: Métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2 ed, 2004, 289 p.

LAVELLE, P. et al. Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Biology*, v. 42, p. S3-S15, 2006.

LOSADA, M. P.; EIROA, J.; MATO, S.; DOMÍNGUES, J. Phylogenetic species delimitation of the earthworms *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* (Bouche, 1972) (Oligochaeta, umbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Pedobiologia*, v. 49, p. 317- 324, 2005.

LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M.; NOGUEIRA, A. J. A. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environmental pollution*, v. 138, n. 1, p. 121 -131, 2005.

MAGALHÃES, D. P. e FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia brasiliensis*, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

NAHMANI, J.; HODSON, M.; BLACK, S. Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. *Environmental Pollution*, v. 149, p. 44-58, 2007.

NGUYEN, T. A. H.; NGO, H. H.; GUO, W. S.; ZHANG, J.; LIANG, S.; YUE, Q. Y.; NGUYEN, T. V. Applicability of agricultural waste and by-products for adsorptive removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, v.148, p. 574-585, 2013.

NUNES, B.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*, v. 62, p. 581 – 594, 2006.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the testing of chemicals n. 222: Earthworm reproduction test. Paris, 2004. 18 p.

OLIVEIRA, L. L. D. Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Universidade de São Paulo, 279p., 2014.

RAMOS, A. S. EGLER, S.G.; CÉSAR, R.G.; RODRIGUES, A.C.; XAVIER, J.L.C.; CASTILHOS, Z.C. Testes de ecotoxicidade utilizando minhocas da espécie *Eisenia foetida* para valiação da contaminação mercurial em solos. In: XI Congresso Brasileiro de Geoquímica, 2007, Rio de Janeiro. Anais...Rio de Janeiro, 2007.

RASTETTER, N.; GERHARDT, A. Toxic potential of different types of sewage sludge as fertiliser in agriculture: ecotoxicological effects on aquatic and soil indicator species. *Journal Soils Sediments*, v. 15, p. 565-577, 2015.

SISSINO, C. L. S.; BULUS, M. R. M.; RIZZO, A. C.; MOREIRA, J. C. Ensaio de comportamento com minhocas (*Eisenia fetida*) para avaliação de áreas contaminadas: Resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v.1, n. 2, p. 41 -44, 2006.

STENESH, J. Biochemistry. In: COSTA, J. R. M. A. Bioindicadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao Chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR). 1998.

ULLAH, H.; KHAN, I.; ULLAH, I. Impact of sewage contaminated water on soil, vegetables, and underground water of peri-urban Peshawar, Pakistan. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 184, n. 10, p. 6411–6421, 2012.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

von SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3ª ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005, 452 p.

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

ZHENG, K.; LIU, Z. T.; LI, Y.; CUI, Y.; LI, M. Toxicological responses of earthworm (*Eisenia fetida*) exposed to metal-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 20, p. 8382–8390, 2013.

ZHOU, C.F.; WANG, Y; LI, C. C.; SUN, R.J.; YU, Y.; ZHOU, D. Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Pollution*, v. 180, p. 71 -77, 2013.

ZHOU, D.; NING, Y.; WANG, B.; WANG, G.; SU, Y.; LI, L.; WANG, Y. Study on the influential factors of Cd²⁺ on the earthworm *Eisenia fetida* in oxidative stress based on factor analysis approach. *Chemosphere*, v. 157, p. 181-189, 2016.

8 APÊNDICE A – DADOS DOS ATRIBUTOS FÍSICO-QUÍMICOS DO SOLO NAS AMOSTRAS COLETADAS

Ponto de amostragem	pH_(H₂O)	MO (%)	Cu (mg kg⁻¹)	Zn (mg kg⁻¹)	Fe (mg kg⁻¹)	Mn (mg kg⁻¹)	P (mg kg⁻¹)	Argila (%)	Silte (%)	Areia (%)	CTC (cmolc)
P1	4.09	6.67	6.17	33.03	360.70	39.93	47.21	28.3	49.5	22.2	13.14
P2	4.63	2.09	2.01	5.03	466.52	43.50	18.54	22.8	35.1	42.2	11.22
P3	4.46	2.04	2.22	4.13	498.82	36.95	21.41	21.7	31.5	46.8	11.45
P4	5.14	1.95	7.96	37.62	326.23	6.10	30.01	4.6	12.8	82.6	6.98
P5	4.40	6.05	4.77	32.61	340.77	33.43	95.19	30.0	60.6	9.4	22.06
P6	5.27	3.37	2.26	5.28	208.17	19.23	7.45	19.5	25.9	54.6	16.19