

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS EM ORGANISMOS AQUÁTICOS
EXPOSTOS A SOLUÇÕES DE DOIS ELEMENTOS DO GRUPO DOS
LANTANÍDEOS.**

**ASSESSMENT OF TOXIC EFFECTS ON AQUATIC ORGANISMS EXPOSED
TO SOLUTIONS OF TWO ELEMENTS OF THE LANTHANIDE GROUP.**

Cristiana Lima dos Santos

Aluno de Graduação de Ciências Biológicas, 4º período, Universidade
UNIGRANRIO

Período PIBIC: novembro de 2016 a julho de 2017

crlima@cetem.gov.br

Silvia Gonçalves Egler

Orientadora, Bióloga, M.Sc.

segler@cetem.gov.br

Tamine Martins Roldão

Co-orientadora, Bióloga, M.Sc.

troidao@cetem.gov.br

RESUMO

Foram testados os efeitos tóxicos agudos e crônicos em dois níveis tróficos aquáticos de duas soluções sintéticas com os elementos de terras raras (ETR) lantânio e samário. Representando os consumidores primários foi testado o microcrustáceo *Daphnia similis* que foi mais sensível a ambos os lantanídeos. Os efeitos quelantes do EDTA e da vitamina B12, constituintes do meio MS utilizado, que podem influenciar na biodisponibilidade dos lantanídeos estudados, foram demonstrados e seu uso deve ser evitado em ensaios com ETRs. Representando os produtores foram testadas as microalgas *Raphidoceles subcapitata*, *Chlorella vulgaris* e *Ankistrodesmus falcatus*, porém apenas com o ETR samário. Não houve diferença significativa entre as respostas obtidas nos ensaios. Novos ensaios ainda serão realizados para avaliar o efeito individual de lantânio e em misturas com samário para as diferentes espécies.

Palavras chave: elementos de terras raras, toxicidade, bioindicadores.

ABSTRACT

Acute and chronic toxic effects were tested on two aquatic trophic levels using two synthetic solutions with the rare earth elements (REE), lanthanum and samarium. Representing the primary consumers was tested the microcrustacean *Daphnia similis* that was more sensitive to both lanthanides. The chelating effects of EDTA and vitamin B12, constituents of the MS medium used, that could influence the bioavailability of studied lanthanids, have been demonstrated and their use should be avoided in bioassays with REEs. Representing the producers were tested the microalgae *Raphidoceles subcapitata*, *Chlorella vulgaris* and *Ankistrodesmus falcatus*, but only with the REE samarium. There was no significant difference between the responses obtained in the bioassays. New tests will still be performed to evaluate the effect of lanthanum individually and in mixtures with samarium for the different species.

Keywords: rare earth elements, toxicity, bioindicators.

1. INTRODUÇÃO

O grupo dos elementos de terras raras (ETR) é composto pelos elementos da tabela periódica classificados como lantanídeos que inclui 15 elementos, além de escândio (Sc) e ítrio (Y). São divididos, com base na configuração eletrônica, em: leves, de lantânio a európio que são considerados mais solúveis em água; e pesados, de gadolínio a lutécio considerados menos solúveis em água (SNELLER *et al.*, 2000 *apud* GONZALEZ *et al.*, 2014). Como consequência da distribuição eletrônica, as propriedades químicas e físicas dos elementos são semelhantes (MARTINS; ISOLANI, 2005). Na água, no sedimento e no solo geralmente são encontrados em baixas concentrações. A forma de íon livre é geralmente considerada como a espécie mais biodisponível, mas não está claro se os ETRs com íons trivalentes seguem esse modelo. Fatores como pH, dureza, temperatura e associação com ligantes orgânicos e inorgânicos, interferem na mobilidade e biodisponibilidade dos lantanídeos podendo gerar seu acúmulo no meio ambiente (CAO *et al.*, 2000 *apud* GONZALEZ *et al.*, 2015). No Brasil a primeira aplicação comercial das ETR foi a exportação da areia monazitica, sendo líder do fornecimento mundial, para a fabricação de barras metálicas. Atualmente, há a necessidade da retomada da mineração e processamento dos ETR como cadeia produtiva, para vidro e cerâmica, laser e ímãs permanentes, relógios e memória de computadores, refino de petróleo, energia eólica e veículos híbridos, de modo a garantir autonomia na matriz energética (SOUSA; SERRA, 2014). Na China, os ETRs são utilizados na indústria e na agricultura como fertilizantes. A mineração e o descarte inapropriado pode acarretar sua bioacumulação nos ecossistemas aquáticos e terrestres.

A ecotoxicologia utiliza bioensaios, que podem ser agudos ou crônicos, no estudo de efeitos tóxicos e interação de agentes químicos e físicos naturais ou agentes poluentes gerados pela atividade humana, importantes na preservação e avaliação da qualidade dos ecossistemas (SCOPE, 1978). Atualmente, há pouca informação disponível sobre a toxicidade ambiental dos ETRs. Em consequência, estudos sobre ecotoxicidade, bioacumulação e modo de ação devem ser desenvolvidos para um melhor entendimento e prevenção dos riscos associados a sua deposição e visando aplicações ambientalmente sustentáveis (GONZALEZ *et al.*, 2014, 2015).

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos tóxicos dos elementos de terras raras lantânio (La^{3+}) e samário (Sm^{3+}) utilizando ensaios com os bioindicadores *Daphnia similis* (microcrustáceo) e as algas clorofíceas *Raphidoceles subcapitata*, *Chlorella vulgaris* e *Ankistrodesmus falcatus*.

3. METODOLOGIA

As soluções dos ETRs testadas foram preparadas a partir de óxidos (Sm_2O_3 e La_2O_3) utilizando solubilização ácida com ácido nítrico p.a. a 65% para uma concentração final de solução-estoque de 5 g/L. As soluções-teste para os ensaios foram preparadas com os meios de cultivo dos organismos-teste utilizados. Para avaliação da toxicidade aguda do ácido utilizado na solubilização ácida dos ETRs foram realizados ensaios com *D. similis* e *C. vulgaris*.

Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos foram expressos em concentração efetiva inicial mediana - $\text{CEI}_{50\%, 48 \text{ ou } 96 \text{ h}}$ (efeito observado em 50% dos organismos testados) que mostram uma relação inversa com a toxicidade, quanto menor o valor, maior a toxicidade e em Unidade Tóxica (UT), calculada pela fórmula $\text{UT} = 100 / \text{EC}_{50\%}$, onde a relação é direta, quanto maior o valor da UT mais alta é a toxicidade. O programa estatístico utilizado foi o Statistica 13.1.

O cultivo e ensaios agudos com o microcrustáceo *D. similis* foram realizados de acordo com a norma ABNT 12713 (ABNT, 2016). Os organismos são cultivados em meio MS com parâmetros físico-químicos ajustados para: pH entre 7-7,6; dureza 40-48 mg CaCO_3/L e oxigênio dissolvido (O.D.) > 5 mg/L. São mantidos em câmaras de B.O.D. com temperatura de 20 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h luz:8 h escuro e alimentados diariamente com suspensão algácea de *Raphidoceles subcapitata*.

Os ensaios são realizados com neonatos de 6-24 h de vida, divididos em quadruplicatas com cinco organismos-teste cada, totalizando 20 organismos/concentração-teste mais um controle com meio MS. O ensaio tem duração de 48 h sob as mesmas condições de cultivo, porém no escuro e sem alimentação. O pH e O.D. foram medidos no início e no final dos ensaios. Para a realização dos ensaios os organismos foram expostos a diferentes concentrações (5, 10, 15, 20, 25 mg/L) de lantânio e samário e misturas dos mesmos na proporção 1:1, 1:2 e 2:1. Foram realizados ensaios utilizando o meio MS completo (todos os reagentes) e sem os quelantes EDTA e vitamina B12. Os resultados foram calculados através do programa *Trimmed Spearman-Kärber*. Mensalmente são realizados ensaios de sensibilidade (substância de referência - NaCl).

Os cultivos e ensaios crônicos com as algas clorofíceas *R. subcapitata*, *C. vulgaris* e *A. falcatus* foram realizados de acordo com a norma ABNT 12648 (ABNT, 2011) em meio LC. Oligo em câmaras de B.O.D. com temperatura de 25 ± 2 °C, aeração e iluminação (4500 Lux) constantes. A cada sete dias são realizadas as trocas dos meios de cultivo, iniciando um novo cultivo líquido, e a centrifugação do restante para utilização como inóculo para os ensaios e a suspensão algácea de *R. subcapitata* para alimentação dos cultivos de *D. similis*.

O ensaio tem duração de 96 h e foi realizado em mesa agitadora orbital com 130 rpm, iluminação (4500 lux) constante e em triplicata (soluções-teste e controle com meio LC-Oligo). O inóculo inicial foi de 3×10^5 cel/mL. Foram testadas diferentes concentrações (20, 30, 40, 50 e 60mg/L) de lantânio e samário e misturas dos mesmos na proporção 1:1; 1:2 e 2:1. A avaliação do efeito tóxico é determinada pela inibição de crescimento populacional quando comparado ao controle do ensaio. O pH e O.D. foram medidos no início e no final dos ensaios. Os resultados são obtidos em absorbância utilizando espectrofotômetro com comprimento de onda de 675 nm (*R. subcapitata* e *C. vulgaris*) e 450 nm (*A. falcatus*). Os resultados foram calculados através do programa *Linear Interpolation*. Mensalmente são realizados ensaios de sensibilidade (substância de referência - KCl).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A $CEI_{50\%, 48h}$, e seu 95% de Intervalo de Confiança, obtido para o ensaio com o ácido utilizado na solubilização ácida dos ETRs foram, com *D. similis*: $NO_3 = 2,51$ mL/L (2,34-2,69mL/L) e com *C. vulgaris*: $HNO_3 = 5,04$ mL/L (4,93-5,13 mL/L).

Os resultados obtidos dos ETRs, individualmente são apresentados na Tabela 1. O microcrustáceo *Daphniasimilis* foi mais sensível a samário, com $CE_{50\%}$ com menores concentrações e maiores valores de UT, do que as espécies de microalgas estudadas. Este resultado era esperado uma vez que os ETRs são utilizados como fertilizante em diversas culturas vegetais, principalmente na China (ANON, 1994 *apud* BARRY; MEEHAN, 2000). Nos ensaios com *D. similis* com samário em meio MS completo e sem EDTA e vitamina B12 não foi observada diferença significativa (Kruskal-Wallis: $H = 2,00$, $p = 0,1573$). No entanto, foi possível observar que nos ensaios com lantânio com meio MS completo e sem EDTA e vitamina B12 que houve diferença significativa (Kruskal-Wallis: $H = 4,50$, $p = 0,0339$). Diferença significativa também foi observada entre samário e lantânio com meio MS sem EDTA e vitamina B12 (Kruskal-Wallis: $H = 3,85$, $p = 0,0495$), demonstrando que lantânio foi mais tóxico para *D. similis* do que samário. Estes resultados podem estar relacionados aos efeitos quelantes do EDTA e da vitamina B12, constituintes do meio MS completo, que ao se ligarem aos ETRs os tornam indisponíveis biologicamente para *D. similis* (BARRY; MEEHAN, 2000).

Não houve diferença significativa entre as respostas obtidas nos ensaios com as microalgas (Kruskal-Wallis: $H = 0,0000$, $p = 1,00$). Novos ensaios ainda serão realizados para avaliar o efeito de lantânio individualmente e em misturas com samário para as diferentes espécies.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados dos ensaios com as misturas, em diferentes proporções e meios MS, de lantânio e samário com *D. similis*. A somatória das médias das UTs dos ETRs individualmente testados (Tabela 1) com meio MS completo ($UT = 4,87+4,86= 9,73$) é maior que os valores obtidos nos ensaios com as misturas (Tabela 2). Este resultado caracteriza um efeito tóxico antagônico (COSTA *et al.*, 2008), quando a interação diminui o efeito total. Nos ensaios com meio MS sem EDTA e vitamina B12 a somatória das médias ($UT = 5,57+8,81=14,38$) é menor que os valores obtidos nos ensaios com as misturas (Tabela 2). Este resultado caracteriza um efeito tóxico sinérgico (COSTA *et al.*, 2008), quando a interação aumenta o efeito total.

Tabela 1: Resultados em $CEI_{50\%, 48ou 96 h}$ e Unidade Tóxica (UT) dos ensaios de ecotoxicidade com soluções sintéticas de lantânio e samário individualmente. NC = não calculado.

| Espécies/ETRs | Samário mg/L- UT | 95% Intervalo de Confiança | Lantânio mg/L- UT | 95% Intervalo de Confiança |
|-----------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------|----------------------|-------------------------------|
| <i>Daphnia similis</i> – MS completo | 22,36 – 4,47 | 21,54 – 23,22 | 22,49 - 4,45 | NC |
| | 22,59 – 4,43 | 21,40 – 23,84 | 19,05 – 5,25 | 17,77 – 20,41 |
| | 21,49 – 4,65 | 22,38 – 20,64 | 22,29 - 4,49 | NC |
| | 16,89 - 5,92 | NC | 18,97 - 5,27 | NC |
| <i>Daphnia similis</i> – MS sem EDTA e vitamina B12 | 16,85 – 5,93 | 15,58-18,23 | 10,79 – 9,27 | 9,99 – 11,66 |
| | 17,32 – 5,77 | NC | 11,45- 8,73 | 10,38 – 12,63 |
| | 20,00 – 5 | NC | 11,86 – 8,43 | 10,85 – 12,95 |
| <i>Raphidoceles subcapitata</i> | 40,80 – 2,45 | 37,48 – 43,12 | | |
| | 46,10 – 2,17 | 44,48 – 47,60 | | |
| | 44,97 – 2,22 | 44,49 – 45,17 | | |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 58,22 – 1,72 | 57,63-58,63 | | |
| <i>Ankistrodesmus falcatus</i> | 47,16 – 2,12 | 47,07-47,25 | | |
| | 54,34 – 1,84 | 50,41-55,18 | | |

Tabela 2: Resultados em $CEI_{50\%, 48ou 96 h}$ e Unidade Tóxica (UT) dos ensaios de ecotoxicidade com soluções sintéticas de lantânio e samário em misturas. Parêntesis = 95% Intervalo de Confiança; * = 95% Intervalo de Confiança não calculado.

| Espécies | Samário+ lantânio - mg/L - UT | | |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------|---------------------------------|
| Proporção de mistura | (1:1) | (1:2) | (2:1) |
| <i>Daphnia similis</i> - MS completo | 12,11* - 8,26 | 12,11* - 8,26 | 12,68 – 7,89 |
| | 12,25*- 8,16 | 12,47- 8,02 | (12,10 – 13,28) |
| | | (12,05 – 12,91) | 13,30 – 7,52 (12,44 – 14,21) |
| <i>Daphnia similis</i> – MS sem EDTA e Vitamina B12 | 6,79* - 14,73 | 5,16 – 19,38 | 6,39 – 15,65 |
| | 5,35 – 18,69 | (3,00 – 8,89) | (5,60 – 7,30) |
| | (4,49 – 6,36) | 6,07 – 16,47 | 6,24 – 16,03 |
| | | (4,72 – 7,80) | (5,54 – 7,03) |

5. CONCLUSÕES

As respostas obtidas para a toxicidade aguda e crônica a um ou dois tipos de lantanídeos (lantânio e samário) observados neste estudo foram diferentes para os organismos-teste e para a água de diluição utilizada. O microcrustáceo *D. similis* foi o organismo mais sensível às soluções sintéticas testadas. As concentrações obtidas nas $CE_{50\%}$ foram menores e os valores de UTs maiores. Os efeitos quelantes do EDTA e vitamina B12 reduziram a biodisponibilidade dos ETRS estudados, evidenciando que seu uso deve ser evitado em estudos com ETRs. Os efeitos observados nas proporções das misturas testadas foram sinérgicos (meio MS sem EDTA e

vitamina B12) e antagonísticos (meio MS completo). Para as microalgas *R. subcapitata*, *C. vulgaris* e *A. falcatus* não houve diferença significativa entre as respostas obtidas nos ensaios crônicos realizados. Novos ensaios ainda serão realizados para avaliar o efeito de lantânio individualmente e em misturas com samário para as diferentes espécies de microalgas, e com isso gerar uma melhor compreensão do efeito dos ETRs sobre organismos responsáveis pela base da cadeia alimentar aquática.

6. AGRADECIMENTOS

À S. Egler, pela oportunidade, orientação e paciência concedidas a mim, à T. Roldão pelos conhecimentos concedidos, e instruções e assistência prestada durante o projeto. À G. Heidelmann pela parceria na realização deste projeto. À M. Nascimento e A. L. C. Moraes pelas soluções sintéticas fornecidas e E. Giese pelo auxílio em discussões na fase de elaboração do projeto. Ao Centro de Tecnologia Mineral (CETEM) pela estrutura e equipamentos fornecidos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT NBR 12.713. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* sp. (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro, ABNT. 2016. 33 p.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT NBR 12.648. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)**. Rio de Janeiro, ABNT. 2011. 33 p.
- BARRY, M.; MEEHAN, B. The acute and chronic toxicity of lanthanum to *Daphnia carinata*. **Chemosphere**, v. 41, p. 1669-1674, 2000.
- COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quím. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.
- GONZALEZ, V.; VIGNATI, D.; LEYVAL, C.; GIAMBERINI, L. Environmental fate and ecotoxicity of lanthanides: are they a uniform group beyond chemistry? **Environ. Intern.**, v. 71, p.148–157, 2014.
- GONZALEZ, V.; VIGNATI, D.; PONS, M-N.; MONTARGES-PELLETIER, E.; BOJIC, C.; GIAMBERINI, L. Lanthanide ecotoxicity: first attempt to measure environmental risk for aquatic organisms. **Environ. Poll.**, v. 199, p. 139-147, 2015.
- MARTINS, T.S.; ISOLANI, P.C. Terras raras: aplicações industriais e biológicas. **Quím. Nova**, v. 28, n.1, São Paulo, Jan./Feb. 2005.
- SCOPE - Scientific Committee on Problems of the Environment.-**Report 12: Principles of Ecotoxicology**. 1978. Edited by G.C. Butler, published on behalf of the Scientific Committee on Problems of the Environment (SCOPE) of the International Council of Scientific Unions (ICSU) by John Wiley e Sons. Chichester, New York, Brisbane, Toronto.
- SOUSA FILHO, P.C.; SERRA, O. A. Terras raras no Brasil: histórico, produção e perspectivas **Quím. Nova**, v.37, n.4, São Paulo, 2014.