

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

OLIGOQUETA *Eisenia andrei* COMO BIOINDICADOR DE CONTAMINAÇÃO DE SOLO POR HEXACLOROBENZENO⁽¹⁾

Thaís Mitre Vampré⁽²⁾, Raffaella Fuccillo⁽³⁾ & Mara M. de Andréa⁽⁴⁾

RESUMO

O hexaclorobenzeno (HCB) é um composto organoclorado de presença ubíqua no ambiente, sendo, por isso, classificado como um dos poluentes orgânicos persistentes (POP). Ele é altamente tóxico e está presente como contaminante na região da Baixada Santista (SP) há vários anos. Para avaliar o potencial de minhocas da espécie *Eisenia andrei* como bioindicadores de contaminação por HCB, espécimes delas foram expostos durante 14 dias a solo contendo ¹⁴C-HCB, e sua bioacumulação foi analisada. Não se verificou mortalidade nem aos sete nem aos 14 dias de contato com o solo tratado, indicando, portanto, que a dose usada no tratamento foi subletal e permitiu o estudo de bioindicação. Aos 14 dias do início do estudo, amostras de solo e de tecido animal foram submetidas à extração com solventes orgânicos, para determinação do conteúdo de radiocarbono, de HCB e de lipídios nos organismos. Verificou-se que a maior parte do radiocarbono proveniente do ¹⁴C-HCB permaneceu no solo na forma de resíduo extraível e só pequenas quantidades foram encontradas nos tecidos animais, nas formas de resíduos extraíveis e ligados. Por meio de cromatografia gasosa, verificou-se que apenas HCB foi detectado e, portanto, não ocorreu degradação nem no solo nem nos tecidos animais. O conteúdo de lipídios nos tecidos de minhocas foi correlacionado negativamente com a quantidade de HCB (-0,2), indicando que a presença de HCB pode ter provocado inibição na formação de lipídios. Finalmente, o fator de bioacumulação (FBA) de 6,5 mostrou que o HCB é, de fato, bioacumulado em minhocas e que esses animais podem ser utilizados como bioindicadores em estudos de contaminação com esse composto.

Termos de indexação: minhocas, composto organoclorado, poluentes orgânicos persistentes, fator de bioacumulação.

⁽¹⁾ Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora do curso de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico. Recebido para publicação em março de 2009 e aprovado em outubro de 2009.

⁽²⁾ Bióloga, Mestranda em Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e o Ambiente, Instituto Biológico. Av. Conselheiro Rodrigues Alves 1252, Vila Mariana, CEP 04014-002 São Paulo (SP) E-mail: thavampre@yahoo.com.br

⁽³⁾ Estudante de Ciências Farmacêuticas e Bioquímica, Faculdades Oswaldo Cruz, São Paulo, SP. E-mail: raffaella.fuccillo@yahoo.com.br

⁽⁴⁾ Pesquisador Científico do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental. Instituto Biológico. Bolsista CNPq. E-mail: andrea@biologico.sp.gov.br

SUMMARY: *Eisenia andrei* (OLIGOCHAETA) AS BIOINDICATOR OF SOIL CONTAMINATION BY HEXACHLOROBENZENE (HCB)

HCB (hexachlorobenzene) is an environmentally ubiquitous organochlorine compound and is classified as one of the persistent organic pollutants (POP). It is highly toxic and has been found in the region “Baixada Santista” of the state of São Paulo (Brazil) for a number of years. To evaluate the potential of the earthworm species Eisenia andrei as bioindicator of HCB-contamination, earthworm specimens were maintained for 14 days in soil containing ¹⁴C-HCB, and their bioaccumulation was analyzed. No mortality was detected after neither 7 nor 14 days of contact with the treated soil, indicating that the dose was sub-lethal and would enable a bioindication study. Soil and animal tissue samples were submitted to solvent extraction 14 days after the beginning of the study to determine radiocarbon, HCB and lipid contents in the organisms. Most of the radiocarbon from the applied ¹⁴C-HCB remained in the soil in the form of extractable residue and only small amounts were found in the animal tissues as extractable and bound residues. The gas chromatography of the extracts detected only HCB and consequently, no degradation occurred, neither in the soil, nor in animal tissues. The lipid content of the earthworm tissues was negatively correlated with HCB amounts (-0.2), indicating that HCB may have inhibited lipid formation. Finally, the bioaccumulation factor (BAF) of 6.5 indicated that HCB is actually bioaccumulated by the worms which indicates that this animal may be used as bioindicator in HCB-contamination studies.

Index terms: earthworms, organochlorine compound, persistent organic pollutant, bioaccumulation factor.

INTRODUÇÃO

Entre os compostos organoclorados que estão espalhados como contaminantes do ambiente, a maioria é de agrotóxicos, mas também encontra-se grande quantidade de hexaclorobenzeno (HCB), considerado um poluente orgânico persistente pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP, 2005). O HCB é um composto aromático halogenado que apresenta o núcleo benzênico completamente clorado (Stan, 1981), o que, de acordo com Scheunert (1992), confere estabilidade ao composto, uma vez que o Cl ligado organicamente ao C inibe a sua biodegradação; embora a ligação C-Cl não seja totalmente estranha na natureza, a maioria dos organismos não dispõe de enzimas que a quebrem, conferindo-lhe grande persistência no ambiente. O HCB é gerado por meio de processos intermediários de manufatura, incluindo a produção de solventes clorados e agrotóxicos (USEPA, 1999). De acordo com Matheus (2003) e Silva et al. (2001), no Brasil o HCB está presente como contaminante em área do polo petroquímico de Cubatão, na Baixada Santista (SP), porque ali foi descartado como resíduo do processo industrial de produção do tetracloro de C, que é um desengraxante bastante utilizado na indústria metalúrgica.

Provavelmente devido à sua grande estabilidade, já se detectou a presença de HCB nos ambientes mais insólitos de diferentes regiões e em diversos compartimentos do ambiente, principalmente por

estudos de monitoração de presença de contaminantes (podem ser citados, por exemplo, os trabalhos de Toro et al., 2000; Connell et al., 2002; Carvalho et al., 2002; Brito et al., 2002; Monirith et al., 2003; Jantunen & Bidleman, 2006; Kunisue et al., 2007; Borgá et al., 2007), o que prova seu alcance e persistência no ambiente. Essa contaminação pode ter como consequências efeitos negativos em organismos terrestres e aquáticos e intoxicação humana pelo consumo de água e alimentos contaminados, além do risco de intoxicação ocupacional de trabalhadores e produtores rurais.

Testes ecotoxicológicos foram estabelecidos pelos órgãos regulamentadores, como a Organização Internacional de Padronização – ISO, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais – IBAMA e a Organização Européia de Cooperação e Desenvolvimento Econômico – OECD. Além destes, várias pesquisas sobre bioindicadores ambientais de poluentes em geral têm fornecido indicação prévia sobre os possíveis efeitos desses poluentes em populações animais e humanas a partir de exposições ambientais. Esses estudos são feitos por meio da determinação de doses subletais sobre biomarcadores – componentes celulares ou bioquímicos, estruturas e funções de organismos bioindicadores (Nicholson & Lam, 2005; Andréa et al., 2007a,b; Lam & Kueh, 2008) – e auxiliados pelas análises de solos, sedimentos e águas, que são os meios onde são encontrados os bioindicadores (Miguel et al., 1999; Gevao et al., 2001; Figueiredo-Barros et al., 2001).

Dessa forma, as medidas de bioindicadores têm sido usadas para apontar a probabilidade de um agente estressor (contaminante, alterações das condições físicas, etc.) causar efeito adverso no ambiente e nas populações. Essas medidas são também feitas para caracterizar a saúde do ambiente, indicar o grau de perigo e dar suporte às determinações dos possíveis riscos ecológicos de mudanças na saúde do ambiente (Andréa, 2008).

Exemplos de organismos que possuem os requisitos para serem utilizados como possíveis indicadores do nível de poluição são as minhocas, uma vez que, segundo Paoletti (1999a,b) e Papini (2003), elas são os organismos que entram em contato direto com as substâncias químicas que atingem o solo, devido ao seu nicho ecológico. De acordo com esses autores, essas substâncias podem também ser ingeridas juntamente com partículas de solo, quando esses animais se alimentam, e também ser absorvidas diretamente através da cutícula destes, quando os poluentes estão dissolvidos na solução do solo.

Como o HCB, além de ser persistente no ambiente físico, também apresenta características pouco favoráveis para os organismos, ou seja, é altamente hidrofóbico, resistente ao metabolismo (Linde et al., 2001), altamente lipofílico e frequentemente encontrado em alimentos (Carrizo et al., 2008), pode também acumular-se nos tecidos adiposos após a ingestão do alimento contaminado (Brito et al., 2002; ATSDR, 2002). Paralelamente, estudos com organismos bioindicadores são úteis porque, apesar de esses organismos não morrerem por alterações do ambiente, como a introdução de poluentes no meio onde vivem, os bioindicadores respondem a elas por meio de reações comportamentais ou metabólicas mensuráveis, que indicam e refletem alguma mudança no ambiente onde vivem (Andréa, 2008).

Assim, este trabalho estudou a influência do HCB em minhocas como bioindicadoras porque, tratando-se de composto de presença tão espalhada e com características pouco favoráveis tanto para o ambiente físico quanto para os organismos, estudos sobre o potencial de contaminação em organismo bioindicador podem fornecer informações para previsão de seu potencial de contaminação das diferentes teias alimentares e de alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Teste de toxidez em papel-filtro

Com base em OECD (1984), efetuou-se teste prévio de toxidez em papel-filtro para escolha de quantidade aproximada de tratamento do solo com HCB no estudo de bioacumulação.

Minhocas de peso entre 300 e 500 mg foram coletadas no minhocário do Laboratório de Ecologia

de Agroquímicos (LEA) do Instituto Biológico (São Paulo, SP) e mantidas por um período de 3 h em cristizador de vidro com o fundo forrado com papel-filtro umedecido com água destilada, para adaptação ao novo ambiente. Após esse período, os animais foram lavados e colocados nos frascos de vidro, onde o teste de toxidez foi realizado.

Os frascos-teste (15 cm de altura × 5 cm de diâmetro) tiveram suas superfícies internas forradas com papel-filtro, sobre o qual foram pipetados 150 e 75 µg de HCB em solução com hexano. O teste foi montado em 10 frascos/concentração e, nos 10 frascos-controle, pipetou-se apenas 1,0 mL de hexano. Após a evaporação do solvente sob exaustão, aplicou-se 1,0 mL de água destilada no papel-filtro de todos os frascos e adicionou-se uma minhoca por frasco. Os frascos foram vedados com filme plástico, com furos para passagem de ar, e apoiados lateralmente em bandejas, para que os animais entrassem em contato com o papel-filtro contendo o HCB. O teste foi conduzido em sala com temperatura controlada ($17^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$) e no escuro. Após 48 e 72 h, avaliou-se a mortalidade dos animais.

Solo

O solo utilizado no estudo de bioacumulação foi coletado na cidade de Piracicaba, SP ($22^{\circ} 40' 20'' \text{S}$ e $47^{\circ} 37' 31'' \text{O}$). Algumas análises de solo foram realizadas pelo Departamento de Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP). A análise granulométrica apresentou a seguinte distribuição: 310 g kg^{-1} de areia, 210 g kg^{-1} de silte e 480 g kg^{-1} de argila. O teor de matéria orgânica foi de 42 g kg^{-1} , e o pH (H_2O), de 6,2.

Determinação do ^{14}C -HCB extraível nas minhocas *Eisenia andrei*

O método mais eficiente de extração de HCB de tecidos de minhocas foi determinado em testes anteriores ao estudo. Animais adultos e com clítole com peso mínimo de 300 mg foram selecionados, lavados em água destilada e congelados em temperatura de -18°C durante 24 h. Após esse período, os organismos ainda congelados foram tratados com solução de ^{14}C -HCB em hexano contendo 0,25 mg de HCB e $15,85 \text{ kBq mL}^{-1}$ de ^{14}C -HCB e, em seguida, cortados em segmentos de cerca de 1 cm e homogeneizados durante 15 min sob exaustão, para evaporação do solvente.

O ^{14}C -HCB foi extraído dos tecidos das minhocas basicamente conforme Andréa et al. (2001), utilizando-se triplicatas de 3 g de tecidos e 16,0 mL de diferentes misturas de solventes: hexano, hexano:acetona (12:4 v/v) e hexano:metanol (12:4 v/v), por 35 ciclos de 160 W de energia de micro-ondas (Panasonic 1600 W), cada ciclo com duração de 15 s, intercalados com banho de gelo. Após a extração, as amostras de hexano:acetona foram concentradas em rota- evaporador (Büchi 461) até a secura quase completa,

e os resíduos foram ressuspensos em 16 mL de hexano. A extração utilizando hexano: metanol resultou em duas fases: hexano e metanol; o radiocarbono foi quantificado em ambas, para detectar possíveis metabólitos polares na fase metanol e os compostos apolares, como o HCB, na fase hexano.

Determinação do ^{14}C -HCB extraível do solo

A extração do ^{14}C -HCB no solo também foi feita em triplicatas de 3,0 g de solo, que foram extraídas com 16 mL de hexano:acetona (12:4 v/v), utilizando-se 25 ciclos de 25 s de 160 W de energia de microondas (Panasonic 1600 W), intercalados com banho de gelo (Andréa et al., 2001).

Contaminação das minhocas *Eisenia andrei*

A bioacumulação de ^{14}C -HCB em minhocas foi verificada basicamente de acordo com Farenhorst & Prorokopowich (2003), utilizando-se sistemas compostos de 200 g de solo colocados em frascos de vidro de 500 mL de capacidade. Para garantir um ambiente ativo e semelhante às condições naturais, uma semana antes do início do teste reativou-se a atividade microbiana do solo por meio de ajuste da umidade para 60 % da Capacidade Máxima de Retenção de Água (CMRA), conforme recomendado pela OECD (OECD, 2000).

Após esse período, as amostras de solo foram tratadas com HCB por aplicação de 6 μg de HCB e 0,022 k Bq de ^{14}C -HCB g^{-1} em quatro frascos, a partir da solução de 7.730 μg de HCB e 29,7 k Bq mL^{-1} de ^{14}C -HCB em hexano. Essa dose foi determinada a partir dos resultados do teste em papel-filtro, utilizando-se dessa forma uma dose superior às aplicadas no teste de toxidez em papel-filtro. O solo de outros dois frascos foi tratado apenas com 150 μL de hexano e utilizado como controle.

Todos os seis frascos permaneceram por 10 min sob exaustão em capela, para evaporação do solvente. Em seguida, cinco minhocas adultas, isto é, cliteladas e com massa mínima de 300 mg, foram colocadas em cada frasco. Cada conjunto de cinco espécimes foi pesado, e a massa, anotada antes da colocação no solo de cada frasco. Também a massa total dos sistemas foi anotada, para verificação da necessidade de adição de água para manter as condições de umidade durante o estudo.

Os sistemas completos foram mantidos em sala com temperatura controlada ($17 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 14 dias. Nesse período, em intervalos de três dias, os sistemas foram repesados e adicionou-se água quando necessário, para manter a umidade a 60 % da CMRA. Aos 14 dias de início do estudo, os sistemas foram desmontados e as cinco minhocas de cada sistema foram novamente pesadas e extraídas juntas, totalizando seis amostras com massa média de 1,8 g de tecido animal.

Efeito do HCB na sobrevivência das minhocas

A mortalidade e o ganho de peso dos animais de cada sistema foram verificados aos 7 e 14 dias por meio de pesagem de cada animal de cada sistema, separadamente e somando-se o peso dos cinco espécimes de cada sistema. Ao final do estudo, aos 14 dias, as minhocas foram separadas do solo, lavadas e pesadas, para análise da quantidade de ^{14}C -HCB absorvida em seus tecidos.

Determinação da quantidade de radiocarbono extraível nas amostras

Alíquotas de 2,0 mL da fase metanol e de 3,0 mL da fase hexano de cada extrato de tecidos e alíquotas de 3,0 mL da fase hexano de cada extrato de solo foram misturadas com 5,0 mL de líquido cintilador (Mesquita & Rüegg, 1984), para determinação da quantidade de radiocarbono presente por Espectrometria de Cintilação em Líquido – ECL em equipamento Packard (1600 TR).

A determinação da recuperação do ^{14}C -HCB nos extratos de tecidos de minhocas e solo foi feita por meio de cálculos comparativos entre a quantidade de radiocarbono inicialmente aplicada ao solo (100 %) e a quantidade de radiocarbono detectada nos tecidos e no solo, após 14 dias de estudo.

Quantificação do conteúdo de lipídios

O conteúdo de lipídios dos tecidos animais foi determinado gravimetricamente por meio de pesagem de uma alíquota de 1,0 mL de cada extrato de tecido, que permaneceu em temperatura ambiente por 24 h até a evaporação do solvente e repesagem. Os cálculos do conteúdo de lipídios das amostras foram feitos de acordo com Lauenstein & Cantillo (1998), sendo a quantidade de lipídios (mg g^{-1}) = massa do resíduo (mg) \times volume do extrato (mL) $\times 10^3$ / quantidade evaporada (μL) \times quantidade de tecido extraído (g).

Determinação de HCB

Para determinação da quantidade de HCB e possíveis metabólitos nas diferentes matrizes estudadas, alíquotas dos extratos de solo e de tecidos de minhocas também foram analisadas por cromatografia gasosa (CG), basicamente conforme Pérez-Ruzafa et al. (2000). A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo Varian 3300 com detector de captura eletrônica, em coluna megabor de 30 \times 0,53 mm (diâmetro interno), fase estacionária DB17 e filme de 1,0 μm , utilizando-se N_2 como gás de arraste a um fluxo de 1,5 mL min^{-1} . A temperatura da coluna foi programada para iniciar a análise a 180 $^\circ\text{C}$ e aumentar até 250 $^\circ\text{C}$, a uma taxa de 15 $^\circ\text{C min}^{-1}$ durante 10 min após a injeção da amostra. O volume de cada injeção foi de 2,0 μL . A curva de calibração para esse composto foi feita pelo método Meier & Zünd (1993), com seis concentrações do composto (0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,6 e 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de HCB em

hexano), e determinada utilizando-se as áreas cromatográficas dessas concentrações de HCB, analisadas por CG.

Determinação de ^{14}C -resíduos não extraíveis ou ligados nos tecidos animais, sedimento e solo

A determinação do ^{14}C -HCB não extraível, tanto das amostras de solo quanto de tecidos animais, foi feita por meio da combustão de amostras de 0,5 g de solo extraído e seco e do peso total de tecidos extraídos e secos, em aparelho Biological Oxidizer (OX 600), conforme Andréa et al. (1997). Após a combustão, a quantidade de radiocarbono nas amostras foi determinada por ECL do volume total recuperado.

Determinação do fator de bioacumulação

A determinação do fator de bioacumulação (FBA) de ^{14}C -HCB foi feita de acordo com Buratini & Brandelli (2006), a partir da seguinte fórmula: $\text{FBA} = \text{Co}/\text{Cs}$, em que Co = quantidade do radiocarbono no organismo (kBq g^{-1}) e Cs = quantidade do radiocarbono no sedimento ou no solo (kBq g^{-1}).

Análise estatística

As variáveis analisadas (quantidade de lipídios e quantidade de HCB) não apresentaram as exigências necessárias para a utilização de testes paramétricos, pois foram heterogêneas e com números de amostras insuficientes. Assim, optou-se pela utilização de um teste não paramétrico – o coeficiente de correlação para postos de Spearman –, analisando as possíveis correlações entre quantidades de HCB e de lipídios encontradas nos tecidos animais; o valor do coeficiente varia entre -1 (correlação perfeita negativa) e +1 (correlação perfeita positiva), passando pelo valor 0 (ausência de correlação) e $\alpha = 0,5$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de toxidez em papel-filtro, observou-se uma taxa de mortalidade entre 10 e 30 % após 72 h, nos frascos com tratamento de 75 e 150 μg de HCB, respectivamente, e nenhuma morte nos frascos-controle (Quadro 1). Como a mortalidade não ultrapassou 30 %, no estudo de bioacumulação aplicou-se uma dose superior à maior dose dos testes em papel, tendo em vista a possível adsorção do ^{14}C -HCB no solo, o que poderia dificultar a absorção do composto pelos animais (Scheunert, 1992; Spadotto et al., 2004).

Os testes prévios de extração para recuperação do HCB indicaram que a mistura de hexano:metanol foi o melhor solvente de extração de ^{14}C -HCB de tecidos de minhocas *Eisenia andrei*, pois 98,9 % (Quadro 2) da quantidade aplicada foi recuperada, sendo essa a mistura adotada para a extração de ^{14}C -HCB dos

Quadro 1. Mortalidade de minhocas *Eisenia andrei* em teste de toxidez de HCB em papel-filtro

Tempo	Mortalidade	
	75 μg de HCB	150 μg de HCB
h	%	
48	0	0
72	10	30

Quadro 2. Recuperação de ^{14}C -HCB do tecido de minhocas por diferentes solventes em extração por micro-ondas (% médias \pm d.p.)

Solvente	^{14}C -HCB
v/v	% g^{-1}
Hexano	34,45 ⁽¹⁾ \pm 0,47
Hexano:acetona (12:4)	47,53 \pm 0,64
Hexano: metanol (12:4)	98,91 \pm 24,45

*: n = 2

tecidos. Nos testes em que se utilizaram hexano e mistura de hexano:acetona como solventes, apenas 34,4 e 47,5 % da quantidade aplicada, respectivamente, foram recuperadas (Quadro 2).

A quantificação do HCB nos extratos das diferentes matrizes feita segundo o método resultou em um coeficiente de determinação de $R^2 = 0,93$ (Figura 1).

Após tratamento do solo com ^{14}C -HCB, não se verificou mortalidade das minhocas nem aos sete nem aos 14 dias de contato delas com o solo contaminado, indicando, portanto, que a dose usada no tratamento foi subletal e permitiu o estudo de bioindicação. Além disso, após os 14 dias de estudo de bioacumulação, verificou-se ganho de peso de aproximadamente 0,20 mg na maioria dos conjuntos de cinco espécimes de minhocas. Isso significa que as condições experimentais estavam adequadas e que, mesmo com a presença do ^{14}C -HCB como contaminante do solo, o crescimento das minhocas não foi alterado nesse período.

A maior parte do radiocarbono aplicado ao solo permaneceu no próprio solo, isto é, ao final dos 14 dias, 75,38 \pm 8,43 % do radiocarbono aplicado foram recuperados como resíduos extraíveis (Quadro 3). Essa quantidade de radiocarbono correspondeu a 2,0 \pm 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ de HCB no solo, detectados por cromatografia gasosa. Segundo Scheunert (1992), o HCB é um composto clorado, e a ligação com o Cl dificilmente é quebrada por organismos, uma vez que estes não possuem, em sua maioria, as enzimas necessárias para que essa reação ocorra. Com isso, esse

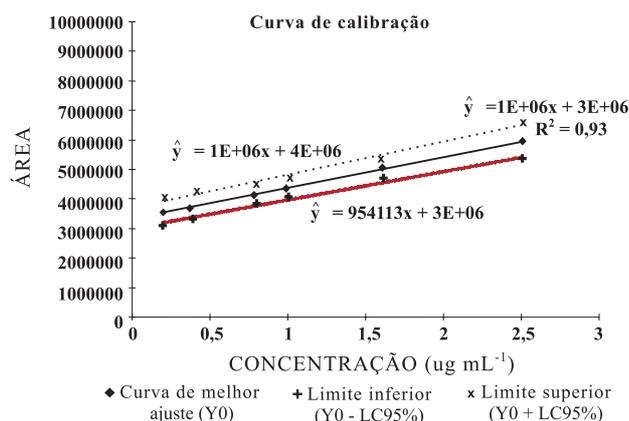


Figura 1. Curva de calibração de HCB por cromatografia gasosa.

composto torna-se altamente estável e persistente em todos os compartimentos ambientais. No presente estudo, a maior parte do HCB permaneceu no solo, não sendo detectada a presença de resíduos ligados, visto que as características químicas do HCB, isto é, ser um composto aromático halogenado com um núcleo benzênico completamente clorado (Stan, 1981), conferem grande estabilidade à molécula e, consequentemente, sua persistência nos compartimentos ambientais, como os solos, também é grande (Scheunert, 1992).

Nas minhocas, praticamente todo o radiocarbono dos extratos dos tecidos foi detectado na fase hexano, isto é, recuperou-se $1,60 \pm 0,34 \%$ do radiocarbono aplicado como ¹⁴C-HCB, que corresponderam a $1,5 \pm 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de HCB nos tecidos. Por sua vez, muito pouco foi detectado ($0,030 \pm 0,020 \%$) na fase metanol, como compostos mais polares. Além disso, uma pequena quantidade de resíduos não extraíveis ou ligados ($0,37 \pm 0,09 \%$ do radiocarbono aplicado) também foi detectada nos tecidos das minhocas 14 dias após sua colocação no solo tratado. O total recuperado aos 14 dias foi de aproximadamente $77,38 \pm 8,88 \%$ (Quadro 3) de ¹⁴C-HCB em relação à quantidade disponível para bioacumulação nos organismos ou $3,5 \pm 0,26 \mu\text{g}$ de HCB. A recuperação total do radiocarbono após os 14 dias de estudo indica

Quadro 3. Recuperação de radiocarbono em minhocas *Eisenia andrei* e solo, após 14 dias de contato com solo tratado com ¹⁴C-HCB (% média \pm d.p.)

Radiocarbono (%)				
Minhoca				Total recuperado
Extraível		Ligado	Solo	
Hexano	Metanol			
$1,60 \pm 0,34$	$0,03 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,09$	$75,38 \pm 8,43$	$77,38 \pm 8,88$

que uma parte do analito (22,62 %) pode ter ficado retida no solo, devido às características do composto, não sendo possível sua detecção por meio do processo de combustão.

De acordo com Papini (2003), as minhocas, como as da espécie *Eisenia andrei*, apresentam sensibilidade a diversos produtos químicos – uma propriedade que deve ser levada em consideração em estudos de toxicidade ambiental para o monitoramento de pesticidas. No presente estudo, verificou-se FBA de $6,5 \pm 1,7$ após 14 dias de contato dos animais com o solo contendo ¹⁴C-HCB, indicando que as minhocas realmente bioacumularam o HCB. Esse valor é relativamente alto, pois Papini (2003) verificou que os FBA do herbicida simazina em minhocas *Eisenia foetida* foram de 1,45 e 1,17 após 30 e 90 dias de estudo, respectivamente. Andréa & Papini (2005) detectaram valores de até 7 de FBA de simazina em minhocas, mas somente quando o conteúdo de matéria orgânica do solo era muito pequeno. Por sua vez, Viswanathan et al. (1988) detectaram FBA de aproximadamente 2 do inseticida também organoclorado (lindano) em minhocas. Assim, verifica-se que o HCB foi, de modo geral, mais bioacumulado nas minhocas do que outros agrotóxicos. Dessa forma, constatou-se que as minhocas *Eisenia andrei* também podem ser usadas como bioindicadores da contaminação do ambiente edáfico por HCB.

O conteúdo de lipídios nos tecidos de minhocas foi de $7,22 \pm 3,27 \text{ mg g}^{-1}$ de lipídios no tecido de animais não expostos ao solo contaminado e de $5,94 \pm 0,98 \text{ mg g}^{-1}$ de lipídios no tecido para os organismos expostos ao solo com ¹⁴C-HCB. No entanto, a análise de correlação entre os conteúdos de lipídios e a quantidade de HCB detectada nas minhocas mostrou-se negativa (-0,2) e estatisticamente não significativa.

Além disso, também nas minhocas foram detectados resíduos não extraíveis ou ligados aos tecidos, isto é, $0,37 \pm 0,09 \%$ do radiocarbono foram detectados ligados aos tecidos 14 dias após sua colocação no solo tratado. De acordo com Nendza et al. (1997) e Andréa et al. (2007a), como esses resíduos ligados não são detectados por técnicas analíticas convencionais, as reais concentrações de HCB, bem como de outros poluentes, podem ser subestimadas e resultar em biomagnificação ao longo das cadeias alimentares.

CONCLUSÕES

1. As minhocas da espécie *Eisenia andrei* bioacumulam HCB (FBA = $6,5 \pm 1,7$) a partir de solo; portanto, podem servir como bioindicadores de poluição de solo com o HCB.

2. A bioacumulação do HCB também indica o perigo de poluição ao longo das cadeias tróficas de que as minhocas fazem parte.

LITERATURA CITADA

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. Toxicological Profile for Hexachlorobenzene. Georgia, U.S. Department of Health and Human Services, 2002. 352p.
- ANDRÉA, M.M. Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos. (Comunicado Técnico, 83). Disponível em: < http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=83#>. Acesso em: 20 fev. 2008.
- ANDRÉA, M.M. & PAPINI, S. Influence of soil properties on bioaccumulation of ¹⁴C-simazine in earthworms *Eisenia foetida*. J. Environ. Sci. Health, B40:55-58, 2005.
- ANDRÉA, M.M.; MATALLO, M.B.; TOMITA, R.Y. & LUCHINI, L.C. Effect of temperature on dissipation of [¹⁴C]- atrazine in a Brazilian soil. Pesq. Agropec. Bras., 32:95-100, 1997.
- ANDRÉA, M.M.; PAPINI, S. & NAKAGAWA, L.E. Optimizing microwave-assisted solvent extraction (MASE) of pesticides from soil. J. Environ. Sci. Health. Part B, Pesticides, Food Cont. Agric. Wastes, B 36:87-93, 2001.
- ANDRÉA, M.M.; TOMÁS, A.R.G.; BARRETO, O.J.S.; VAMPRE, T.M. & LUCHINI, L.C. Bioconcentration and retention of ¹⁴C-hexachlorobenzene (HCB): I. The marine tropical mussel *Perna perna*. Environ. Bioind., 2:219-228, 2007a.
- ANDRÉA, M.M.; TOMÁS, A.R.G.; BARRETO, O.J.S.; VAMPRE, T.M. & LUCHINI, L.C. Bioconcentration and retention of ¹⁴C-hexachlorobenzene (HCB): II. The estuarine clam *Mytella gualanensis*. Environ. Bioind., 2:229-236, 2007b.
- BORGÁ, K.; HOP, H.; SKAARE, J.J.; WOLKERS, H. & GABRIELSEN, G.W. Selective bioaccumulation of chlorinated pesticides and metabolites in Arctic seabirds. Environ. Poll., 145:545-553, 2007.
- BRITO, A.X.P.; BRÜNING, I.M.R.A. & MOREIRA, I. Chlorinated pesticides in mussels from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. Mar. Poll. Bull., 44:71-81, 2002.
- BURATINI, S.V. & BRANDELLI, A. Bioacumulação. In: ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E., eds. Ecotoxicologia aquática. São Carlos, Rimma, 2006. p.56-88.
- CARRIZO, D.; GRIMALT, J.O.; RIBAS-FITO, N.; TORRENT, M. & SUNYER, J. Pentachlorobenzene, hexachlorobenzene, and pentachlorophenol in children's serum from industrial and rural populations after restricted. Ecotoxic. Environ. Saf., 71:260-266, 2008.
- CARVALHO, F.P.; GONZALEZ-FARIAS, F.; VILLENEUVE, J. P.; CATTINI, C.; HERNÁNDEZ-GARZA, M.; MEE, L.D. & FOWLER, S.W. Distributions, fate and effects of pesticide residues in tropical coastal lagoons of Northwestern Mexico. Environ. Technol., 23:1257-1270, 2002.
- CONNELL, D.W.; MILLER, G. & ANDERSON, S. Chlorohydrocarbon pesticides in the Australian marine environment after banning in the period from the 1970s to 1980s. Mar. Poll. Bull., 45:78-83, 2002.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. Hexachlorobenzene (HCB): Sources and regulation. 1999. Disponível em: <<http://www.p2pays.org/ref/06/05728.pdf>> Acesso em: 31 de março de 2003.
- FARENHORST, A. & PROROKOPOWICH, B. Effect of propanil on the sorption of 2,4-D by soil. J. Environ. Sci. Health, 6:713-721, 2003.
- FIGUEIREDO-BARROS, M.P.; FONSECA, J.J.L.; BOZELLI, R.L. & ESTEVES, F.A. Macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores de impacto e recuperação em um igarapé sob influência de mineralização de bauxita. 2001. 4p. (Documentos- Lab. de Limnologia, Depº de Ecologia, Inst. de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro)
- GEVAO, B.; MORDAUNT, C.; SEMPLE, K.T.; PIEARCE, T.G. & JONES, K.C. Bioavailability of nonextractable (bound) residues to earthworms. Environ. Sci. Technol., 35:501-507, 2001.
- JANTUNEN L.M. & BIDLÉMAN, T.F. Henry's law constants for hexachlorobenzene, p,p'-DDE and components of technical chlordane and estimates of gas exchange for Lake Ontario. Chemosphere, 62:1689-1696, 2006.
- KUNISUE, T.; TAKAYANAGI, N.; TSUBOTA, T. & TANABE, S. Persistent organochlorines in raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) from Japan: Hepatic sequestration of oxychlordane. Chemosphere, 66:203-211, 2007.
- LAM, J.Y.C. & KUEH, C.S.W. Monitoring of toxic substances in the Hong Kong marine environment. Mar. Poll. Bull., 57:744-757, 2008.
- LAUENSTEIN, G.G. & CANTILLO, A.Y. Sampling and analytical methods of the National Status and Trends Program. Mussel Watch Project: 1993-1996 Update. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 130. Maryland, 1998. 234p.
- LINDE, A.V.D.; HENDRICKS, A.J. & SIJM, D.H.T.M. Estimating biotransformation rate constants of organic chemicals from modeled and measured elimination rates. Chemosphere, 44:423-435, 2001.
- MATHEUS, D.R. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2003. 161p. (Tese de Doutorado)
- MEIER, P.C. & ZÜND, R.E. Statistical methods in analytical chemistry. New York, John Wiley & Sons, 1993.
- MESQUITA, T.B. & RÜEGG, E.F. Influência de agentes tensoativos na detecção da radiação beta. Ci. Cult., 36:446-450, 1984.
- MIGUEL, C.S.; MACHADO, L.M. & BEBIANNO, M.J. Concentrações de Cd, Cu e Zn em mexilhões *Mytilus galloprovincialis* e Lapas *Patella aspera*, ao longo da Costa Algarvia (Sul de Portugal). Ecotoxicol. Environ. Rest., 2:1-6, 1999.
- MONIRITH, I.; UENO, D.; TAKAHASHI, S.; NAKATA, H.; SUDARYANTO, A.; SUBRAMANIAN, A.; KARUPPIAH, S.; ISMAIL, A.; MUCHTAR, M.; ZHENG, J.; RICHARDSON, B.J.; PRUDENTE, M.; HUE, N.D.; TANA, T.S.; TKALIN, A.V. & TANABE, S. Asia-Pacific mussel watch: Monitoring contamination of persistent organochlorine compounds in coastal waters of Asian countries. Mar. Poll. Bull., 46:281-300, 2003.

- NENDZA, M.; HERBST, T.; KUSSATZ, C. & GIES, A. Potential for secondary poisoning and biomagnification in marine organisms. *Chemosphere*, 35:1875-1885, 1997.
- NICHOLSON, S. & LAM, P.K.S. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae:Bivalvia). *Environ. Intern.*, 31:212-132, 2005.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. [Protocolo]. Earthworm, Acute Toxicity Tests, 1984.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. [Protocolo]. Guideline for testing chemicals. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/andrei*), 2000.
- PAOLETTI, M.G. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 74:137, 155, 1999b.
- PAOLETTI, M.G. Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 74:1-18, 1999a.
- PAPINI, S. Bioavaliação da degradação de agrotóxicos. São Paulo, Universidade de São Paulo, 2003. 86p. (Tese de Doutorado)
- PÉREZ-RUZAFÁ, A.; NAVARRO, S.; BARBA, A.; MARCOS, C.; CÁMARA, M.A.; SALAS, F. & GUTIÉRREZ, J.M. Presence of pesticides throughout trophic compartments of the sea food web in the Mar Menor Lagoon (SE Spain). *Mar. Poll. Bull.*, 40:140-151, 2000.
- SCHEUNERT, I. Transformation and degradation of pesticides in soil. In: BING, W.E., ed. *Terrestrial behaviour of pesticides*. New York, Springer Verlag, 1992. p.25-75.
- SILVA, A.S.; BARRETTO, H.H.C.; INOMATA, O.N.K. & LEMES, V.R.R. Evaluation of human exposure to hexachlorobenzene at Sumarítá, São Vicente, São Paulo, Brazil. *R. Bras. Ecotoxicol. Meio Amb.*, 11:53-64, 2001.
- SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L.C. & ANDRÉA, M.M. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42)
- STAN, H.J. Combined gas spectrometry mass spectrometry. In: DASK, G., ed. *Pesticide analyses*. New York and Basel, 1981. p.369-423.
- TORO, B.; PALMA-FLEMING, H. & NAVARRO, J.M. Organic pollutant burden of the giant mussels *Choromytilus chorus* from the south-central Chilean coast. *Chemosphere*, 55:267-275, 2000.
- UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAM - UNEP. *Ridding the world of POPs: A guide to the Stockholm convention on persistent organic pollutants*. Geneva, 2005.18p.
- VISWANATHAN, R.R.S.; SCHEUNERT, I. & KORTE, F. Investigations on accumulation and biotransformation by earthworms of lindane occurring as soil contaminant. In: ABOU, R., ed. *Hazardous waste: Detection, control, treatment*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1988. p.759-765.