

VIABILIDADE DA UTILIZAÇÃO DE ÁCIDO BÓRICO COMO SUBSTÂNCIA REFERÊNCIA PARA ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS COM *Enchytraeus spp.* EM SOLO ARTIFICIAL TROPICAL¹

Paulo Teles de Oliveira e Silva², Osmar Klauberg-Filho³, Elder Schons Júnior⁴, Douglas Alexandre⁵

¹Vinculado ao projeto “Desenvolvimento de protocolo para ensaio ecotoxicológicos em comunidades de enquitreídeos em solo brasileiros”.

²Acadêmico do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária – CAV– Bolsista PROBIC/UDESC

³Orientador, Departamento de Solos e Recursos Naturais – CAV – osmar.klauberg@udesc.br

⁴Acadêmico do Curso de Engenharia Florestal – CAV

⁵Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo – PPGCS/CAV

A ecotoxicologia é a ciência que trata da avaliação do efeito de substâncias tóxicas em organismos vivos, com o intuito de promover e estabelecer níveis de proteção ambiental, bem como avaliar a toxicidade e o risco dessas substâncias aos ecossistemas. Os ensaios ecotoxicológicos se valem da utilização de organismos bioindicadores terrestres, tais como as plantas, enquitreídeos, minhocas e microrganismos a fim de avaliar efeitos sobre parâmetros comportamentais, morfológicos, bioquímicos.

Os enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta) são organismos invertebrados com corpo de forma vermiforme, podendo variar de 2 até 40 mm de comprimento, estão relacionados a processos de estruturação do solo e ciclagem de nutrientes. Além disso, destacam-se por sua ampla ocorrência em diferentes habitats no mundo todo, pela maior facilidade em manuseio e pela sensibilidade à poluentes, sendo aplicados como indicadores em diversos estudos ecotoxicológicos com solos naturais e artificiais.

A fim de garantir a adequação das condições laboratoriais do ensaio e da sensibilidade dos organismos uma substância referência deve ser utilizada. Uma substância-referência adequada deve atender alguns critérios, devendo apresentar biodisponibilidade aos organismos de interesse durante o teste, apresentar respostas estáveis e reprodutíveis, deve ser de fácil obtenção. A ISO 16387 recomenda a utilização do fungicida carbendazim (CAS: 10605-21-7), substância atualmente banida pela ANVISA para fins agrícolas. O ácido bórico vem sendo recomendado como substância referência em ensaios padronizados com minhocas, ácaros e colêmbolos.

Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi avaliar a empregabilidade do ácido bórico (H_3BO_3), como substância referência em ensaios ecotoxicológicos com *Enchytraeus spp.* em Solo Artificial Tropical (SAT).

Para tal, foram conduzidos teste crônicos (reprodução) com 5 espécies de enquitreídeos do gênero *Enchytraeus*: *Enchytraeus crypticus* (espécie padronizada, apresenta reprodução por fertilização cruzada), *E. bigeminus* e *E. dudichi* (ambas se reproduzem por fragmentação), *E. sp1* (coletada em Lages – SC, com descrição pendente, apresenta reprodução sexuada) e *E. sp2* (coletada em Curitiba – PR, com descrição pendente, apresenta reprodução por fragmentação) todos os ensaios seguiram a normativa NBR/ISO 16387 (ABNT, 2012).

Foram testadas as doses 0, 25, 50, 100, 200 e 400 mg de H_3BO_3 kg^{-1} (n=4), cada repetição contendo 25 gramas de SAT composto por 70% de areia, 25% de caulin e 5% de fibra de coco. O substrato teve seu pH ajustado para $6.0 \pm 0,5$ através da adição de $CaCO_3$. e a umidade para 50% da capacidade de retenção de água (CRA).

Dez organismos aptos à reprodução foram postos em cada repetição, os ensaios duraram 21 dias e foram conduzidos em sala com ambiente controlado, mantida a 20 ± 2 °C e 16:8 h de fotoperíodo e semanalmente os potes foram abertos para aeração. As perdas de umidade foram corrigidas pela adição de água destilada, e foram adicionadas 1 g de aveia moída. Após 21 dias, adicionou-se 12 gotas de solução de Rosa bengala (1% em etanol), e 30 ml de álcool etílico (70%) em cada unidade amostral, para preservar e corar os organismos. Após 72h, os organismos foram contados utilizando um microscópio estereoscópico (aumento de 60×).

O número de juvenis foi comparado entre os tratamentos de controle através de uma ANOVA *one way*, seguido do teste de Dunnett. A normalidade e homogeneidade das variâncias foi verificado pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. As concentrações efetivas para 50% do efeito (CE₅₀) foram estimadas através de modelos não lineares. As análises foram realizadas no *software* Statistica 7.0

Os critérios de validação da normativa foram atendidos sendo os números de juvenis em cada réplica maior do que 25 e o coeficiente de variação menor do que 50%. Os resultados de CE₅₀, ou seja, a concentração que causa uma redução de 50% nas taxas de reprodução da população em teste é apresentada na Tabela 1.

Pode-se observar que a sensibilidade das espécies variou sendo para *E. sp1* de 34,925 já para *E. sp2* foi de 171,56 mg de H₃BO₃ por kg de substrato⁻¹, destaca-se que estas não são espécies não padronizadas, com estratégias distintas de reprodução, sexuada e fragmentação, respectivamente.

Os resultados ajudam a preencher uma lacuna no conhecimento para condução de ensaios ecotoxicológicos em regiões subtropicais e, dado o amplo espectro de efeito observado evidenciam a necessidade de se testar espécies nativas não padronizadas a fim de obter resultados mais realísticos para as condições locais.

Destaca-se que são requeridos ainda ensaios inter-laboratoriais a fim de se observar a estabilidade dos resultados obtidos.

Tabela 1 – Concentração efetiva de ácido bórico (95% de Intervalo de confiança) para *E. crypticus*, *E. dudichi*, *E. bigeminus*, *E. sp1* e *E. sp2* em ensaios de reprodução em Solo Artificial tropical.

Espécie	Modelo	r ²	EC ₅₀ (mg i.a. kg ⁻¹)
<i>E. crypticus</i>	<i>Logistic</i>	0,810	100,861 (40,627 – 162,095)
<i>E. dudichi</i>	<i>Exponential</i>	0,920	62,890 (46,337 – 82,075)
<i>E. bigeminus</i>	<i>Logistic</i>	0,890	93,32 (47,010 – 139,430)
<i>E. sp1</i>	<i>Exponential</i>	0,760	34,925 (8,472 – 61,433)
<i>E. sp2</i>	<i>Logistic</i>	0,840	116,56 (61,56 – 171,56)

Palavras-chave: Ecotoxicologia terrestre. Oligoquetas. Invertebrados terrestre.