

Carvão e Meio Ambiente

Centro de Ecologia

da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul



Editora
da Universidade

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Carvão e meio ambiente é fruto da colaboração de inúmeros grupos de trabalho da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, tendo contado com pesquisadores de outras instituições com o objetivo de estudar os efeitos da exploração e do uso do carvão sobre o meio ambiente, na Região Carbonífera do baixo Jacuí, no Rio Grande do Sul.

A Região, nos seus aspectos ambientais e sociais, é tratada de modo global na primeira parte do livro, que relata sobre a geologia, o clima, os solos, a vegetação e as características demográficas, econômicas e jurídico-políticas.

A partir da descrição geral busca-se uma síntese dos aspectos ambientais e socioeconômicos, visando analisar a sustentabilidade econômica e ambiental da exploração e do uso do carvão.

Estudos sobre as conseqüências da queima do carvão, na atmosfera local, no solo e na água, são abordados nos tópicos ligados ao meio físico. Especial atenção

está voltada para a recuperação de áreas mineradas e com sugestões para os tomadores de decisão quanto ao monitoramento e ao gerenciamento ambiental.

Animais e plantas foram alvo de estudos específicos com objetivo de identificar indicadores dos impactos de atividades carboníferas sobre os organismos vivos, bem como os aspectos relacionados à saúde pública.

A organização social da região e seu engajamento na melhoria do ambiente ocorreram através de estudos sobre as ações de educação ambiental promovidas por escolas e associações comunitárias.

Quer pela caracterização geral da região, quer pelos estudos específicos, *Carvão e meio ambiente* trata de forma aprofundada e original os mais diversos tópicos associados à problemática da exploração e do uso do carvão e suas conseqüências sobre o meio físico, os organismos vivos e a sociedade.

Carvão e Meio Ambiente

Centro de Ecologia

da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul



Editora
da Universidade

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

RESERVA TÉCNICA
Editora da UFRGS

© dos autores
1ª edição: 2000

Direitos reservados desta edição
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Capa: Paulo Antonio da Silveira
Foto da capa: Geraldo Mario Rohde
Editoração eletrônica: William Wazlawik
Toni Peterson Lazaro
Fernando Piccinini Schmitt

C397c Centro de Ecologia/UFRGS
Carvão e meio ambiente/ Centro de Ecologia/UFRGS. – Porto Alegre : Ed. Universidade/UFRGS, 2000.

1. Carvão – Meio ambiente. I. Título.

CDU 622.33:634.0.11

Catálogo na publicação: Mônica Ballejo Canto – CRB 10/1023

ISBN 85-7025-563-2

CARV
C 332

Carvão

e Meio Ambiente

RESERVA TÉCNICA
Editora da UFRGS



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO
GRANDE DO SUL**

Reitora

Wrana Maria Panizzi

Vice-Reitor

Nilton Rodrigues Paim

Pró-Reitor de Extensão

Luiz Fernando Coelho de Souza

EDITORA DA UNIVERSIDADE

Diretor

Geraldo F. Huff

CONSELHO EDITORIAL

Anna Carolina K. P. Regner

Christa Berger

Eloir Paulo Schenkel

Georgina Bond-Buckup

José Antonio Costa

Livio Amaral

Luiza Helena Malta Moll

Maria da Graça Krieger

Maria Heloisa Lenz

Paulo G. Fagundes Vizontini

Geraldo F. Huff, presidente



Editora da Universidade/UFRGS • Av. João Pessoa, 415 - 90040-000 - Porto Alegre, RS - Fone/fax (51) 224-8821, 316-4082 e 316-4090 - E-mail: editora@orion.ufrgs.br - <http://www.ufrgs.br/editora> • **Direção:** Geraldo Francisco Huff • **Editoração:** Paulo Antonio da Silveira (coordenador), Carla M. Luzzatto, Cláudia Bittencourt, Maria da Glória Almeida dos Santos, Najára Machado • **Administração:** Julio Cesar de Souza Dias (coordenador), José Pereira Brito Filho, Laerte Balbinot Dias, Norival Hermeto Nunes Saucedo • **Apoio:** Idalina Louzada, Laércio Fontoura.

AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE BIOINDICAÇÃO DE METAIS-PESADOS ATRAVÉS DE PARÂMETROS ENZIMÁTICOS

Alexandre Guimarães Só de Castro
Tuiskon Dick

INTRODUÇÃO

A centenária exploração do carvão na região do baixo Jacuí hoje começa a instigar certos questionamentos. Qual seria a influência desta atividade, muitas vezes executada de forma inadequada, sobre os recursos naturais da Região? Em uma análise de custo-benefício, onde estariam embutidos os aspectos sociais e ambientais que comprovem a lucratividade, eficiência e produtividade desta atividade? Quais seriam as áreas mais impactadas até o momento? Que risco estariam sofrendo as espécies que habitam estas localidades?

No presente trabalho é proposto a utilização de um parâmetro biológico indicador, ativação e inibição da enzima Delta-aminolevulinatodesidratase. Através do monitoramento passivo com o molusco *Ampullaria canaliculata* (LAMARCK, 1801), busca-se verificar a sua eficiência nos processos de avaliação e monitoramento. O trabalho estuda a resposta do parâmetro biológico indicador em áreas que possuam influência de atividades antropogênicas e que tenham como subprodutos metais pesados disponíveis nos cursos d'água e sedimento.

O aperfeiçoamento de metodologias, que possam aferir não somente a variação de concentrações de poluentes nos componentes biológicos de um sistema, mas também o efeito real sobre os mesmos com expressão de uma agressão ao ecossistema, é um desafio. Novas informações podem ser acrescentadas a este processo, observando-se a resposta da enzima em condições de campo através do agente *Ampullaria canaliculata*, sob a ótica das Ciências Ambientais.

O presente trabalho tem por objetivos: 1. Dar continuidade aos trabalhos de MARTINS(1986) e BONILLA(1989), com o molusco *Ampullaria canaliculata*, a fim de utilizá-lo como bioindicador de metais-pesados, testando a eficiência do percentual de reativação enzimática da enzima delta ALA-D, como parâmetro biológico de resposta,

indicador de metais-pesados em condições de campo. 2. Demonstrar através da metodologia de avaliação proposta, diferentes áreas impactadas por metais-pesados.

REGIÃO DE ESTUDO E ÁREA DE AVALIAÇÃO

A Região de Estudo localiza-se na bacia carbonífera do Baixo Jacuí, área do projeto PADCT-CIAMB. Na Região encontramos três arroios que desembocam no rio Jacuí, principal corpo receptor do sistema em questão. Estes são o arroio do Conde, arroio da Porteira e Arroio dos Ratos. Também o Rio Taquari, desemboca dentro dos limites do projeto. Os principais municípios que compõe a área de estudo são Charqueadas, São Jerônimo, General Câmara e Triunfo.

As características ambientais desta região são diretamente influenciadas pelo seu hidroperíodo. A capacidade de retenção de água e nutrientes é de vital importância para a manutenção deste ecossistema e das interações que nele ocorrem. Áreas alagadiças, banhados, lagos temporários, pequenos córregos e arroios, formam este sistema de “wetlands”. Matas ciliares, campos alagadiços, macrofitos, gramíneas e vegetação de várzea caracterizam de maneira geral a paisagem.

A importância ecológica desta região, além do valor da beleza paisagística, pode ser definida de maneira geral por se tratar de um ambiente onde inúmeras espécies animais encontram abrigo e alimentação em abundância segundo observações em campo e relatos de moradores e pescadores da comunidade.

Mineração de carvão, de areia pluvial e a metalurgia contribuem de maneira expressiva para a realidade industrial da região. É difícil passar pela Região do Baixo-Jacuí, municípios de Charqueadas, São Jerônimo, Triunfo e Gal. Câmara, onde foi realizado o trabalho, e não perceber a íntima relação da situação ambiental da área, com a presença da indústria mineira e metalúrgica. Na Resolução 001/86 do CONAMA, as atividades de mineração e metalurgia, são definidas como “potenciais modificadoras do meio ambiente” ou seja, o simples fato de instalação e operação já significam um risco ambiental. Em caso de dano ambiental, estas indústrias são culpadas pelo dano até que provem o contrário (lei 7347/85). Tal fato é consequência de inúmeras e clássicas relações de impactos ambientais consequentes da poluição causada por estes setores da indústria (ELLENBERG e outros, 1991).

Uma série de elementos químicos, estão associados à produção da indústria carbonífera (REDDY & PRASAD, 1990) e metalúrgica, entre estes, os metais-pesados. Alguns destes metais são classificados como “substâncias potencialmente prejudiciais” (CONAMA, Resolução 20/86). Os metais-pesados mais importantes em vista à poluição aquática são zinco, cobre, chumbo, cádmio, mercúrio, níquel, cromo e alumínio no caso de águas ácidas (ABEL, 1989). Além do mais, em certas condições, estes metais quando em contato com animais e vegetais podem ser captados e acumulados, causando graves danos bioquímicos, fisiológicos e genéticos, podendo afetar de maneira expressiva o equilíbrio do sistema do qual fazem parte os organismos afetados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Avaliação ambiental e organismos indicadores

Para verificar as condições ambientais de um sistema hídrico, análises físicas e químicas são suficientes para informar o quanto do poluente se encontra no meio e se este está disponível ou não à biota deste sistema. Com o aumento das atividades industriais e, conseqüentemente o acréscimo de poluentes, percebeu-se a necessidade de avaliar o sistema em uma escala mais profunda.

Neste enfoque, somente os bioindicadores são capazes de demonstrar se o poluente incorporado, causará danos biológicos e em que concentrações isto ocorre. Também são os bioindicadores os únicos "instrumentos" que respondem ao mesmo tempo a ação sinérgica de vários poluentes, sob influência das condições do meio.

Em 1968, PRINGLE e outros, comprovam a capacidade dos moluscos de concentrar certas substâncias a níveis muito mais altos dos que os encontrados no meio. Em 1977, RAVERA sugere a utilização de moluscos gastrópodes como bioindicadores. Em 1985, BAUMGARTEN, M.G.Z., comprova o bom desempenho de moluscos como indicadores de metais-pesados em ambientes estuarinos. Em 1990, LAKATOS, Gy. e outros, utilizam moluscos de água doce para monitoramento de metais pesados. Atualmente além de moluscos, peixes, crustáceos, aves, macrófitos, algas e líquens, até os homens são considerados organismos indicadores.

Além do fato da *Ampullaria canaliculata* possuir as características gerais dos bioindicadores (PHILLIPS, 1977), possui também outros atributos necessários para ser o bioindicador proposto no projeto, ou seja:

- a) estudos preliminares já haviam sido executados (MARTINS, 1986., BONILLA, 1990., TERRA, 1989.);
- b) encontra-se em abundância na região de estudo;
- c) é de fácil coleta;
- d) é de hábito aquático;
- e) tem capacidade de concentrar em seus tecidos, metais tóxicos presentes no meio;
- f) têm ocorrência ampla em ambientes aquáticos;
- g) é facilmente mantido em laboratório;
- h) têm tamanho suficiente para fornecer tecido necessário a etapa laboratorial proposta;
- i) é de hábito sedentário;
- j) tem presente no tecido escolhido, a enzima delta-aminolevulinato desidratase.

Generalidades sobre *Ampullaria canaliculata* (Lamarck, 1801)

A. canaliculata é um molusco da Família Ampullaridae, que habita águas continentais calmas e de salinidade e dureza muito variáveis (HYLTON, 1957). Alimentando-

se de detritos, de certas plantas aquáticas, animais e vegetais mortos possui parte importante na cadeia alimentar do ambiente onde se encontra. É predado por pássaros, jacarés e tartarugas (GUEDES e outros, 1980). A acumulação de certos poluentes em seus tecidos, pode ser um fator importante na contaminação de seus predadores. A Família Ampullariidae possui uma ampla distribuição na faixa tropical, chegando ao sul até o paralelo 38 e ao norte até a zona meridional da América do Norte. No Rio Grande do Sul estes animais já foram encontrados em locais como Passo Fundo, Marau, Montenegro, Viamão, Gravataí, Porto Alegre, Guaíba, ilhas do Jacuí, nas lagoas costeiras ao sul do Estado (LANZER, 1983).

Parâmetro biológico indicador

Segundo GIESY & GRANEY (1989), os contaminantes ambientais podem atingir vários níveis de organização e os processos a cada nível de organização podem ser utilizados para monitorar ou constatar os efeitos tóxicos em sistemas aquáticos.

Neste cenário, segundo LIMA (1994), torna-se possível inferir que a observação do dano bioquímico pode gerar uma resposta rápida em relação a presença de determinados poluentes que venham a atuar sobre sítios ativos em enzimas.

Há mais de 10 anos, o Grupo de Bioquímica Ecológica, formado por docentes e alunos de pós-graduação em Ecologia e Bioquímica, desenvolve projetos de pesquisa com o objetivo de utilizar enzimas como parâmetro biológico indicador. Este parâmetro enzimático corresponde a atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase em relação a presença de metais tóxicos.

BELLINASSO (1985), RODRIGUES (1987), AMAZARRAY, (1986), MARTINS (1986), BONILLA (1989), BAYNI (1990), SCHOLEN (1991), TEIXEIRA (1992) e LIMA (1994), são algumas das dissertações em nível de mestrado que testaram a enzima delta-aminolevulinato desidratase, como potencial detectora de metais tóxicos em diversos níveis tróficos. A enzima já foi testada exaustivamente em seu comportamento e purificação, pelos efeitos tóxicos causados por metais em vários níveis tróficos, que vão de algas e fitoplâncton (*Egeria densa*), consumidores primários (*Ampullaria canaliculata*), secundários (*Pimelodus maculatus*) até terciários (humanos).

Muitos elementos-traço do tipo metais-pesados, fazem parte da composição química do carvão presente na Região de estudo. Uma vez disponíveis no ambiente, estes elementos podem trazer conseqüências danosas às populações e às relações naturais existentes no sistema. O método propõe a utilização do organismo indicador (*Ampullaria canaliculata*) como agente, e o percentual de reativação da enzima delta-aminolevulinato desidratase como parâmetro biológico indicador em relação a Cd, Pb, Cu e Ni.

Locais de coleta

Foram criadas três categorias de ocorrência para que os locais de coleta pertencessem. Foi considerado “evento”, todo o processo, produto, subproduto, rejeito ou atividade relacionada a indústria carbonífera, com potencial poluidor.

– Anterior ao evento:

Localizada no 2^o distrito de General Câmara, **Santo Amaro** é uma vila de pescadores que se fixou junto ao “lago” formado pela barragem de Amarópolis. As águas do Rio Jacuí que formam este “lago” nunca sofreram a influência do carvão e por isso “Santo Amaro” foi considerado como um dos brancos de referência.

O ponto de amostragem “**Taquari**” localiza-se num “lago” formado pelas águas do rio Taquari. Apesar deste rio não fazer parte da Bacia Carbonífera, desemboca no Jacuí em frente à cidade de São Jerônimo, dentro dos limites do projeto.

– Durante o evento:

A **Vila do Conde** faz parte do município de São Jerônimo. Durante as décadas de 50 e 60 foi muito utilizada como porto de embarque e desembarque do carvão. Esta Vila localiza-se na porção final do Arroio do Conde próximo ao desagüe no Rio Jacuí. É neste local onde está um ponto de amostragem “Conde”, representativo do Arroio do Conde. Em frente a Vila, encontra-se a **Ilha do Conde**, onde está outro ponto de amostragem representativo do Arroio do Conde chamado “Wet”.

O **Arroio da Porteira** é outro importante contribuinte da Bacia do Jacuí. O ponto de amostragem localiza-se num lago formado na planície de inundação, ao lado da ponte que passa sobre a RS 401, na parte final do Arroio. É neste local onde encontra-se o ponto de amostragem “Porteira”.

Em frente ao Arroio da Porteira, encontra-se uma **Ilha**, como é chamada pelos pescadores locais, que sofre a inundação das águas do Rio Jacuí. Neste local encontra-se o ponto de amostragem “Ilha”, representativo das águas deste Rio.

O **Arroio dos Ratos** é outro contribuinte importante na formação da bacia. Suas nascentes encontram-se no Município de Arroio dos Ratos, área bastante alterada pelas atividades carboníferas. Em virtude disto, um ponto amostral “Ratos” foi definido em um lago formado na planície de inundação do Arroio, próximo a ponte da RS 401.

– Posterior ao evento:

A área localizada posterior ao evento deveria representar a contribuição dos principais corpos d’água que estivessem dentro dos limites do projeto. Sendo assim, um ponto de amostragem foi localizado na **Ilha dos Dornelles**, em uma enseada formada pelas águas do Rio Jacuí.

Formação de equipe de apoio

A participação da comunidade de pescadores da região foi indispensável para o sucesso do trabalho em campo. Tendo em vista que os pescadores conhecem os corpos d’água da região, os locais que sofrem influência de atividades como plantação, saídas de esgoto, deposição ilegal de rejeitos e outras. Além disso os pescadores sabem os locais mais prováveis de encontrarmos o organismo indicador. O “caramujo”, como chamam,

é utilizado como isca para pesca de espinhal. Não bastasse isso, os pescadores também conhecem a dinâmica da água na região, o que auxiliou na escolha dos locais e períodos mais apropriados para as coletas. E ainda, existem locais onde o acesso só é possível via fluvial. Desta forma, os pescadores também ajudaram no transporte de “caíco” até o local de trabalho.

Em cada área de avaliação existia pelo menos um pescador responsável pelas coletas. O dia de coleta sempre era marcado com antecedência para que os pescadores pudessem aguardar, ou realizar suas atividades antes que chegássemos.

Período de avaliação

O período de coletas em campo foi de novembro/93 a abril/94. A atividade de campo foi limitada a este período em virtude dos fatores ambientais da região (IBGE, 1990) e dos hábitos do organismo indicador (BACHMAN, 1960).

Tipo de avaliação biológica

Foi adotado a avaliação do tipo passiva. Os animais estavam expostos às condições ambientais sem controle ou monitoramento de variáveis, em todas as etapas do seu ciclo de vida até a fase adulta. Não houve nenhum tipo de interferência nas cargas e períodos de exposição em relação aos metais pesados que foram analisados.

Campanhas de campo

Campanha I - Foi realizado uma pilotagem em três áreas de amostragem. Além de testar a metodologia de coleta durante esta etapa, foi realizada uma “varredura” de metais na água, sedimento e tecido animal, para definir quais os metais seriam priorizados, uma análise de parâmetros físicos e químicos da água e uma verificação da possibilidade da estocagem do material em nitrogênio líquido.

Campanhas II, III, e IV - estas campanhas tinham a finalidade de verificar a resposta do parâmetro biológico indicador (percentagem de reativação enzimática) em diferentes ambientes. Em cada campanha foram realizadas todas as coletas necessárias nas oito áreas determinadas.

Coletas e medições

As coletas de água foram realizadas com a mesma draga da coleta de sedimento. A água era armazenada em um frasco plástico de 250ml com ácido nítrico para posterior análise de metais. Em outro frasco plástico de 250ml com sulfato manganoso e iodeto azida era coletada água para análise de oxigênio dissolvido. O sedimento era colocado em um pote plástico com capacidade de 500ml. Todos os potes de plásticos eram previamente lavados com detergente, ácido nítrico e enxaguados com água deionizada.

Os animais foram coletados manualmente e colocados em um balde de dez litros com água de fundo do local para que fossem transportados até o laboratório.

Neste momento era feita uma rápida verificação das condições gerais dos animais, como reação ao toque, dimensões, peso, integridade da concha, retração parcial entre outros.

ÁGUA

Foram analisados, oxigênio dissolvido e alcalinidade e dureza, no dia da coleta, segundo método utilizado no Laboratório Geral do Centro de Ecologia. A água coletada para análise de metal foi preservada sob refrigeração até o momento das digestões. As análises foram embasadas nos padrões da Standar Methods 1985, utilizado no Laboratório de Espectofotometria do Centro de Ecologia.

SEDIMENTO

Os potes de plástico foram colocados em estufa à 60°C, durante 72h. Depois de seco, o material era retirado dos frascos e colocado dentro de um grau de porcelana, sendo triturado com um pistilo também de porcelana. Conforme a fragmentação ocorria, o material era disposto sobre folhas de papel craft descartáveis e “quarteado”. Parte deste quarteamento seguia este processo até atingir o peso desejado para a digestão.

MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais coletados foram colocados em aquários de vidro correspondentes a cada ponto de coleta, com proporção de um litro água para cada animal. Nos aquários aerados artificialmente, os animais eram mantidos sob estas condições durante aproximadamente 24h sem alimentação, tempo suficiente para o período de aclimação.

Após o período de aclimação, os animais eram sacrificados. Era retirado o tecido a fim de realizar o ensaio enzimático, para a análise quantitativa de metais e dosagem de proteína.

METAIS-PESADOS ANALISADOS

Após a campanha de pilotagem, descrita anteriormente no item 4.1.6, os critérios para estabelecer os metais foram basicamente a toxicidade do elemento e a concentração em que se encontravam. Foram definidos quatro elementos: Cádmio, Chumbo, Níquel e Cobre.

ENSAIO ENZIMÁTICO

A enzima delta-aminolevulinato desidratase (E C 4.2.1.24), classificada pela “International Union of Biochemistry” como 5-aminolevulinato hidrolase, é estudada na UFRGS desde 1981 e vem sendo pesquisada a mais de 40 anos (GRANICK, 1954).

Após as etapas de pesagem, sacrifício, extração e preparação do tecido, separação de alíquota para análise de metais, centrifugação, separação de alíquota para dosagem de proteína era realizado o ensaio enzimático. O método adotado para obtenção do parâmetro biológico indicador foi estabelecido por MARTINS (1986). (Quadro 1)

Quadro 1

	BRANCO(ml)	TESTE(ml)
H ₂ O deionizada/e ou soluções quelantes	0,28	0,28
Homogeneizado centrifugado (sobrenadante)	0,10	0,10
Pré-incubação por 10 min a 37°C		
Solução de TCA-HgCl ₂	0,25	-
Solução D-ALA 0,01 M, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2	0,25	0,25
Incubação por 120 min a 37°C		
Solução de TCA-HgCl ₂	-	0,25
Centrifugação a 4500 rpm por 10 min		
Alíquota de sobrenadante	0,5	0,5
H ₂ O deionizada	0,5	0,5
Reativo de Ehrlich	1,0	1,0
Desenvolvimento e estabilização da cor/5 min		
Absorbância em 555 nm		

ANÁLISES E CÁLCULOS

Expressão da atividade da enzima

A atividade da enzima D-ala-d, extraída da glândula digestiva-gônada de *Ampullaria canaliculata*, foi expressa em micromoles de porfobilinogênio (PBG), produzido por miligrama de proteína presente no meio por minuto de incubação. A equação utilizada para o cálculo para a atividade enzimática específica foi a mesma em BONILLA (1989):

$$\text{At.Esp.} = 4.A.v / (1000.E.b.t.q)$$

onde "A" é a absorbância lida em 555nm, "v" é o volume do meio de incubação após a adição de TCA (0,88ml), "b" é o percurso ótico da cubeta (1cm), "E" é o coeficiente molar de extinção do composto colorido (0,062 micromoles⁻¹.cm⁻¹.litro)(MAUZERALL e GRANICK, 1956), e "q" é a quantidade de proteína presente no meio de incubação, em mg

Já o cálculo de reativação percentual da enzima foi desenvolvido segundo MARTINS (1986). Tendo em vista que foi utilizado DTT (Ditiotreitol) como agente quelante e protetor sulfidrílico, reativador enzimático no ensaio, foi calculado um delta percentual de reativação enzimática a partir das diferenças com e sem a presença de DTT:

$$\text{Delta \%} = 100 \times (\text{Ativ.com DTT} - \text{Ativ.sem DTT}) / \text{Ativ. com DTT}$$

Análise quantitativa de proteínas

Para determinação da quantidade de proteína no extrato enzimático, seguiu-se o mesmo critério metodológico adotado por LOWRY *et alii* (1951).

Análise quantitativa e cálculo do teor de metal nas amostras

Nesta etapa, alíquotas determinadas foram transferidas para pequenos copos de Becker, previamente secos, tarados e pesados. Este material foi seco até peso constante em estufa a 80°C por 48h. Em seguida, as amostras foram digeridas em ácido nítrico seguindo o método recomendado por Tölg (Kotz et al, 1972). Ao final da digestão eleva-se o volume final das amostras a 5ml para posterior leitura.

A análise quantitativa dos metais foi realizada através de um espectrofotômetro de absorção atômica tipo Perkin-Elmer modelo 2380, forno de grafite ou chama, conforme a faixa de concentração nas amostras. Para o cálculo dos resultados dos teores de metais foi adotado o método a seguir:

$$T = \text{Leitura} \cdot \text{Diluição} / \text{Peso seco da amostra em g}$$

Os resultados foram expressos em ppm (mg/l) ou ppb (ug/l), dependendo do metal e da amostra. Os cálculos foram realizados, utilizando-se o peso seco das amostras.

RESULTADOS

Através da Regressão Múltipla, não foi encontrada diferença significativa entre as datas de cada local de amostragem, fazendo-se então uma nova regressão incluindo os locais independente das datas, com o objetivo de verificar quais as variáveis que influenciavam significativamente (0,05) a resposta do parâmetro biológico indicador. O resultado desta regressão demonstrou que as variáveis significativas foram:

- teor de Cádmio na água, teor de Cádmio na glândula digestiva, teor de Chumbo no sedimento, teor de Cobre na água, pH da água

Definidas as variáveis significativas, a segunda etapa do tratamento estatístico dos dados, tinha como objetivo verificar se através da análise dos resultados do delta percentual de reativação enzimática seria possível determinar diferenças significativas entre os locais amostrados. Através de uma Análise de Variância, confirmou-se esta hipótese, ou seja, a resposta do parâmetro biológico indicador varia entre locais. A partir

desta perspectiva, foi realizado um teste de Comparações Múltiplas de Médias, para distinguir as diferenças significativas entre os locais, obtendo os seguintes grupos de locais distintos em relação ao grau de influência das variáveis significativas:

- GRUPO 1: alta influência - Ratos, Ilha, Conde
- GRUPO 2: média influência - Porteira, Wet, Posterior
- GRUPO 3: média influência - Taquarí
- GRUPO 4: baixa influência - Santo Amaro

Existe um decréscimo das médias das resposta do parâmetro biológico indicador em relação aos grupos. Forma-se a seguinte ordem decrescente: Grupo1, Grupo2, Grupo3, Grupo4.

Para objetivarmos a análise dos resultados a seguir, optamos em determinar o Grupo3 e Grupo4 como um único grupo, tendo como base, o fato que Santo Amaro e Taquarí são os dois únicos locais de amostragem onde, historicamente a influência da mineração de carvão e seus possíveis impactos ambientais não ocorrem. Estabelecemos um critério de análise dos resultados onde, Santo Amaro e Taquarí formam a partir de agora o Grupo 3.

- GRUPO 1  - Ratos, Ilha, Conde
- GRUPO 2  - Porteira, Wet, Posterior
- GRUPO 3  - Santo Amaro e Taquarí

Quando comentamos sobre os resultados apresentados nos histogramas do percentual de reativação enzimática, referimo-nos ao maior ou menor intervalo de classe (STURGES, 1926), como aqueles que compreendem os maiores ou menores valores obtidos e não à amplitude dos intervalos.

Tabela 1

Média aritmética e erro padrão ($\bar{x} \pm EP$), intervalo de variação, amplitude total de variação (ATV) e coeficiente de variação (CV) dos teores de Cobre (mg/l) na água de fundo em cada grupo.

Grupo	N	$\bar{x} \pm EP$	Extremos		ATV	CV
			Min	Max		
1	10	0,08 ± 0,03	0,01	0,35	0,34	1,33
2	10	0,06 ± 0,04	0,01	0,38	0,37	1,81
3	6	0,03 ± 0,01	0,02	0,04	0,02	0,31

Tabela 2

Média aritmética e erro padrão ($x \pm EP$), intervalo de variação, amplitude total de variação (ATV) e coeficiente de variação (CV) dos teores de Níquel ($\mu\text{g/l}$) na água de fundo em cada grupo.

Grupo	N	$x \pm EP$	Extremos		ATV	CV
			Min	Max		
1	10	$64,0 \pm 17,9$	0,01	165	164,9	,89
2	10	$58,8 \pm 16,8$	11,2	174	162,8	0,90
3	6	$43,1 \pm 20,7$	11,2	137	125,8	1,18

Tabela 3

Média aritmética e erro padrão ($x \pm EP$), intervalo de variação, amplitude total de variação (ATV) e coeficiente de variação (CV) dos teores de Chumbo ($\mu\text{g/l}$) na água de fundo em cada grupo.

Grupo	N	$x \pm EP$	Extremos		ATV	CV
			Min	Max		
1	10	$36,4 \pm 12,2$	0,01	126	125,9	1,06
2	10	$20,8 \pm 8,85$	7,20	99	91,8	1,35
3	6	$14,5 \pm 3,40$	7,20	30,6	23,4	0,57

Tabela 4

Média aritmética e erro padrão ($x \pm EP$), intervalo de variação, amplitude total de variação (ATV) e coeficiente de variação (CV) do teor de Cádmio ($\mu\text{g/l}$) na água de fundo em cada grupo.

Grupo	N	$x \pm EP$	Extremos		ATV	CV
			Min	Max		
1	10	$0,95 \pm 0,55$	0,04	5,84	5,8	1,84
2	10	$0,70 \pm 0,34$	0,24	3,68	3,44	1,54
3	6	$0,29 \pm 0,04$	0,16	0,40	0,24	0,32

Tabela 5

Média aritmética e erro padrão ($x \pm EP$), intervalo de variação, amplitude total de variação (ATV) e coeficiente de variação (CV) do delta percentual de reativação enzimática.

Grupo	N	$x \pm EP$	Extremos		ATV	CV
			Min	Max		
1	49	$67,8 \pm 3,93$	2,84	98,4	95,6	0,41
2	46	$64,6 \pm 3,77$	14,3	99,2	84,9	0,40
3	28	$37,5 \pm 4,49$	10,4	97,0	86,6	0,63

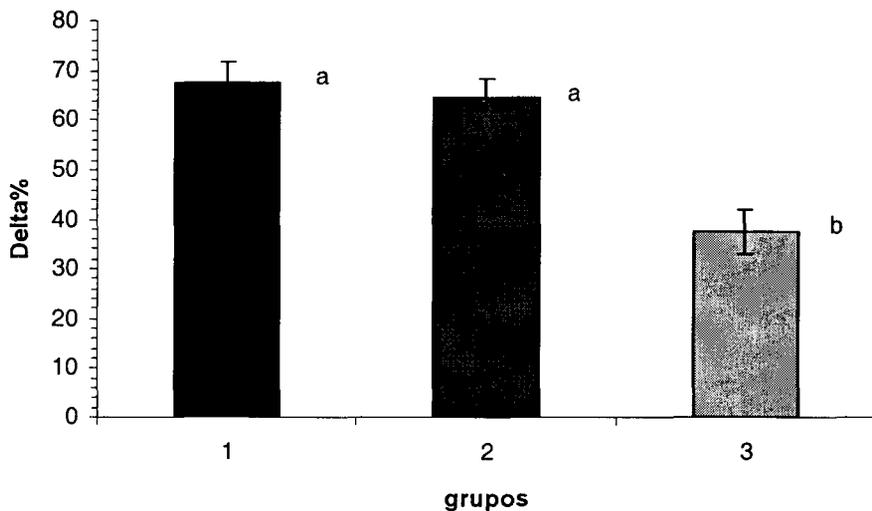


Figura 1. Histograma das médias e erro-padrão do delta % de reativação enzimática dos indivíduos em cada grupo. As letras *a* e *b* indicam o grau de similaridade entre os grupos.

Podemos observar na FIGURA 01, onde está representado um histograma das médias e erro padrão do delta percentual de reativação enzimática em cada Grupo, que existe diferença significativa entre os Grupos 1, 2 e 3. Os Grupos 1 e 2 possuem mesmo grau de similaridade, identificados pela letra *a*. Nota-se os resultados em ordem decrescente Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3.

Quando observamos os resultados dos teores de metais na água nas Tabelas 01,02, 03 e 04, percebemos que para Cobre, Níquel, Cádmio e Chumbo os valores são menores para o Grupo 3 se comparados aos Grupos 1 e 2. Este resultado fortalece diretamente a influência que sofre o comportamento da enzima (Tabela 05) quando o organismo indicador encontra-se em um ambiente com a presença de certos metais.

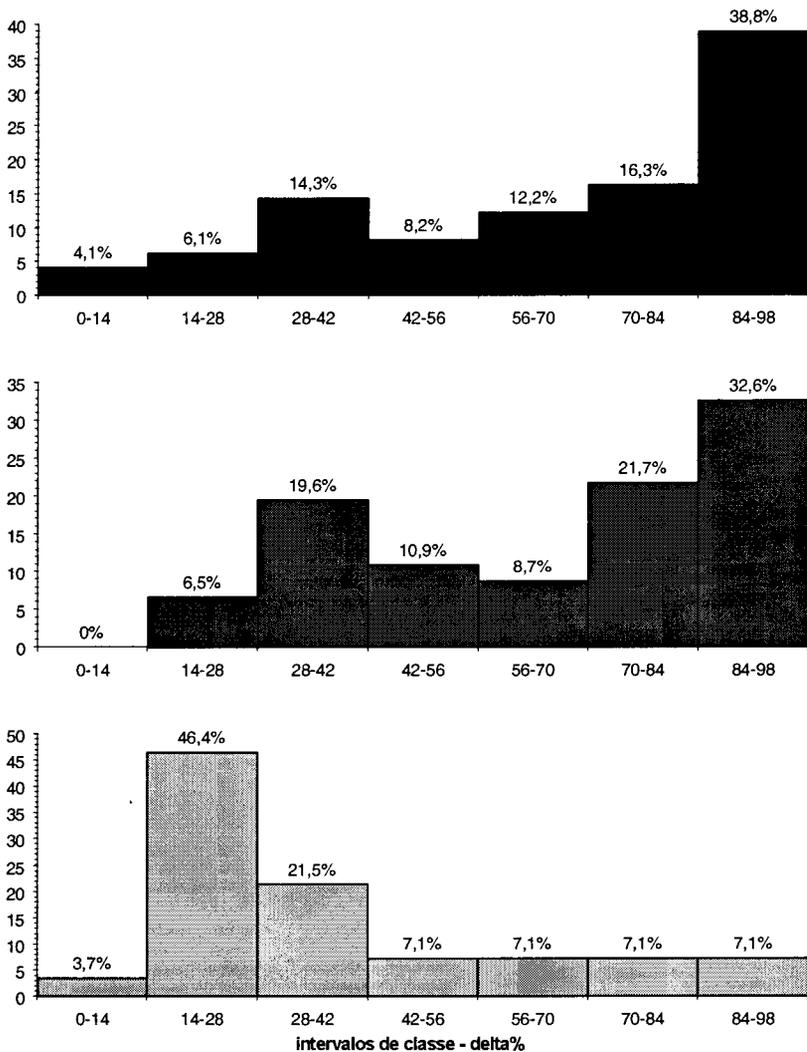


Figura 2. Histograma das freqüências relativas do delta % de reativação enzimática em cada grupo por intervalos de classe.

Na Figura 2, onde está representado um histograma das freqüências relativas por intervalo de classe do delta percentual de reativação enzimática em cada grupo, notamos que o Grupo 3 possui apenas 7,1% da freqüência relativa no maior intervalo de classe 84-98 enquanto o Grupo 1 apresenta 38,8% e o Grupo 2 32,6%.

DISCUSSÃO

CABRIDEDEC (1979) apud CHOMENKO (1981), afirma que testes de “bioensaios”, são o meio apropriado para obter as informações referentes ao comportamento das substâncias, sua localização no organismo, sua biodegradação, sua bioacumulação e seus efeitos inibidores ou ativadores nos organismos vivos constituintes dos ecossistemas aquáticos e terrestres ao nível de indivíduo, população e comunidade. No entanto, torna-se muito difícil reproduzir todos os parâmetros e variações ambientais que ocorrem no ambiente natural e que afetam, diretamente, o comportamento da biota aquática em relação as substâncias do meio.

Será que as respostas obtidas sob condições controladas em laboratório seriam repetidas com o organismo bioindicador em condições naturais? Para testar o comportamento da enzima como parâmetro bioquímico de indicação de metais pesados, optamos utilizar o monitoramento passivo para complementar os intensos bioensaios realizados anteriormente com *Ampullaria canaliculata*.

Sabemos que o delta percentual de reativação enzimática é uma resposta para a presença de metais no ambiente. Mas de que forma a enzima se comporta sob a influência sinérgica dos diversos metais neste ambiente?

No trabalho foi analisado o comportamento da enzima com o registro dos dados de temperatura, pH, alcalinidade, dureza, oxigênio dissolvido, condutividade, teores de Cobre, Níquel, Cádmio e Chumbo na água, no sedimento e na glândula digestiva, peso total dos animais, peso da glândula digestiva e data de coleta. No ambiente onde os animais se encontravam poderíamos listar ainda uma série de parâmetros que associados aos parâmetros analisados podem influenciar o comportamento da enzima. Esses dados e essas relações não foram avaliadas e dificilmente poderão ser analisadas através do monitoramento passivo.

Mas é justamente por este complexo sistema de interações entre os fatores que compõe o ambiente não poder ser compartimentalizado, caso busquemos um parâmetro que responda de forma global a este cenário, que a resposta da enzima torna-se tão importante.

Não podemos esquecer que metais-pesados são subprodutos de uma gama de atividades produtivas, desde a agricultura até a navegação fluvial. O Grupo 3 “branco” de referência no projeto, apresenta um delta percentual de reativação enzimática de 37,5%. Quando comparados com os dados obtidos por BONILLA, 1989 com os grupos “brancos” dos experimentos realizados em laboratório, cerca de 20%, a resposta do parâmetro indicador em campo, já demonstra sinais de inibição.

Sendo assim, o Grupo 3 não é necessariamente o referencial de áreas sem a presença metais-pesados, mas sim áreas da região sem o *pool* de metais da produção carbonífera.

Dentre os parâmetros analisados, o delta percentual de reativação enzimática é o que demonstra de maneira mais eficiente as diferenças existentes entre os Grupos, sendo a interpretação dos resultados eficaz tanto quando analisados através das médias ou análises de frequência relativa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O delta% de reativação enzimática é uma resposta única a influência da interação de todos os parâmetros que compõe o ambiente. Através desta resposta identificamos o Grupo 3 como sendo aquele onde a atividade enzimática está inibida de forma menos intensa (37,5%), pelos metais presentes no ambiente comparativamente aos Grupos 1 (67,8%) e 2 (64,6%). Esta resposta confirma a hipótese de predeterminar os locais de amostragem Santo Amaro e Taquari como o Grupo formado por áreas anteriores ao evento “carvão” e definidas como “branco” referencial para os Grupos 1 e 2.

Em função dos fatos supracitados recomenda-se:

- Que sejam utilizados parâmetros biológicos para a avaliação de ambientes aquáticos.
- Que a *Ampullaria canaliculata* seja utilizada como organismo bioindicador de reação através do método proposto.
- Que o delta% de reativação enzimática seja utilizado como parâmetro bioquímico indicador em ambientes aquáticos para a identificação de áreas críticas que sofram influência de atividades potencialmente transformadoras do ambiente que tenham subprodutos com metais-pesados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, P. D. *Water pollution biology*. England: Ellis Horwood Limited, 1989. p.54, 66-71, 100, 119-131, 139.
- AMAZARRAY, M. T. R. *Efeito de metais pesados em plantas: delta-aminolevulinato desidratase em (Ricinus communis)*. Porto Alegre, 1986. Tese (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biociências/UFRGS. 109f.
- BACHMAN, A.D. Apuntes para una hidrobiologia argentina; II - *Ampullaria insularum* Orb. y *A. canaliculata* Lam. (Moll. Prosobr. Ampullaridae). Observaciones biológicas. In: CONGRESO SUDAMERICANO DE ZOOLOGIA, 1. *Acta y trabajos...*, La Plata, 1960. p.19-24.
- BAUMGARTEN, M.G.Z. 1985. *Avaliação do Balanus improvisus como indicador dos níveis metálicos do estuário da Lagoa dos Patos (RS/Brasil)*. Dissertação de Mestrado - Fundação Universidade de Rio Grande.
- BAYNI, A. C. D. *Assimilação de cádmio e chumbo no sangue e tecidos de Pimelodus maculatus (Pisces, Pimelodidae) e seus efeitos sobre a delta-aminolevulinato desidratase (E.C.:4.2.1.24) eritrocitária*. Porto Alegre, 1990. Dissertação de mestrado - Pós-Graduação em Bioquímica/UFRGS.
- BELLINASSO, M. L. *Estudo comparativo da delta-aminolevulinato desidratase em eritrócito humano e fígado de peixe (Pimelodus maculatus) e o efeito de metais pesados*. Porto Alegre, 1985. Dissertação de mestrado - Pós-Graduação em Bioquímica/UFRGS, 1985.
- BONILLA, G.O.R. *Acumulação de metais tóxicos em glândula digestiva-gônada de Ampullaria canaliculata (Gastropoda: Prosobranchia) e efeitos sobre a delta-aminolevulinato desidratase*. Porto Alegre, 1989. Dissertação de Mestrado - Pós-Graduação em Ecologia/UFRGS.
- CHOMENKO, L. *Influência da salinidade na distribuição de moluscos do gênero Littoridina na área correspon-*

- dente ao litoral norte da planície costeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, out. 1981. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. *Resoluções do CONAMA 1984 a 1991*. 4.ed. rev. e aum. Brasília: IBAMA, 1992. 245p.
- ELLENBERG H. et al. *Biological monitoring. Signs from the environment*. Federal Republic of Germany. Lengerich: GATE - GTZ., 1991.
- GIESY, J. P.; GRANEY, R. L. Recent developments in and intercomparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators. *Hydrobiologia*, v.188/189, p.21-60, 1989.
- GRANICK, S. Enzymatic conversion of Delta-aminolevulinic acid to porphobilinogem. *Science*, n.120, p.1105, 1954.
- GUEDES, L. M. L. A.; FIORI, A. M. C.; DIEFENBACH, C. O. C. Biomass estimation from weight and linear parameters in the apple snail. *Ampullaria canaliculata* (Gastropoda:Prosobranchia). *Comp.Biochem Physiol.*, n.68A, p.285-288, 1980.
- HYLTON, M. I. Estudio morfológico y taxonomico de los Ampullaridos de La Republica Argentina. *Rev. del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia*, v.3, n.5, p.229-380, 1957.
- IBGE. *Geografia do Brasil: Região Sul*, 1990. v.2, p.163-187.
- KOTZ, L.; KAISER, G.; TÖLG, G. Aufschluss biolischer matrices für die Bestimmung sehr niedriger Spurenelementgehalte bei begrenzter Einwaage mit Salpetersäure unter Druck in einem Teflongefäß. *Z. Anal. Chem.*, n.260, p.207-209, 1972.
- LAKATOS, G. et alli. Use of freshwater mussels to biomonitor the metal loading of river Sajo in Hungry. GSF-Bericht 1/92: Proc.Intern. Symp. Ecotox., Munich, nov,1990.
- LANZER, R. M. *Interpretação da distribuição e ocorrência de moluscos dulceaquícolas nas lagoas costeiras da região sul do Brasil*. Porto Alegre, 1983. Dissertação de Mestrado - Pós-Graduação em Ecologia/UFRGS.
- LIMA, C. *Fixação de chumbo e zinco por folhas de Egeria Densa, Planchon (HIDROCARITACEAE) e seus efeitos sobre a atividade da enzima delta aminolevulinato desidratase (EC 4.2.1.24)*. Porto Alegre, 1994. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- MARTINS, V. *Delta-aminolevulinato desidratase (E.C.4.2.1.24) em Ampullaria canaliculata, características bioquímicas e efeitos de metais pesados*. Porto Alegre, 1986 Dissertação de Mestrado - Pós-Graduação em Bioquímica/UFRGS.
- PADCT. Programa de Apoio Científico e Tecnológico. *Energia e Meio Ambiente: a questão do carvão no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: UFRGS/CENECO, 1994. Relatório interno.
- PHILLIPS, D. J. H. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments: a review. *Environm. Pollut.*, n.13, p.281-317, 1977.
- PRINGLE, B. H.; HISSONG, D. E.; KATZ, E. L.; MULAWKA, S. T. Trace metal accumulation by estuarine mollusks. *J. Sanit. Engng. Div. Am. Soc. Civ. Engrs.*, n.94, p.455-475, 1968.
- RAVERA, O. Effects of heavy metals (cadmium, copper, chromium and lead) on a freshwater snail *Biomphalaria glabrata* say (Gastropoda, prosobranchia). *Malacologia*, v.16, n.1, p.231-236, 1977. Proc. Fifth Europ. Malac. Congr.
- REDDY, G. N.; PRASAD, M. N. V. Heavy metal-binding proteins/peptides: occurrence, structure, synthesis and functions: a review. *Environmental and Experimental Botany*, v.30, n.3, p.251-264, 1990.
- RODRIGUES, A. L. S. *Delta-aminolevulinato desidratase (E.C.: 4.2.1.24) em sangue de Pimelodus maculatus (Pisces, Pimelodidae): características bioquímicas e efeito de metais pesados*. Porto Alegre, 1987. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 132p.
- SCHOLEN, R. F. W. N. *Bioindicação de metais tóxicos em água através de parâmetro enzimático em plâncton: delta-aminolevulinato desidratase*. Porto Alegre, 1991. Dissertação de Mestrado - Pós-Graduação em Ecologia/UFRGS.

- STANDARD METHODS. *IBP Handbook*, n.8, p.210, 1985.
- STURGES, H. E. The choice of class interval. *it/nec. American Statistical Association*, 1926. 21:65-66.
- TEIXEIRA, C.C. *Delta-aminolevulinato desidratase (E.C.: 4.2.1.24) de Egeria densa (macrófita aquática, Hydrocharitaceae) como parâmetro de bioindicação de metais pesados*. Porto Alegre, 1992. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1992.
- TERRA, N. R. *Estudo sobre ganho de peso e reprodução em Ampullaria canaliculata Lamarck, 1801 (Molusca, Gastropoda, Prosobranchia), em condições controladas de laboratório*. Porto Alegre, 1985. Dissertação de Mestrado - Pós-Graduação em Ecologia/UFRGS, 1985a.