



**Ana Luísa
Neto Caetano**

**Identificação de um solo natural Português, para fins
ecotoxicológicos**



**Ana Luísa
Neto Caetano**

**Identificação de um solo natural Português, para fins
ecotoxicológicos**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ecologia, Biodiversidade e Gestão de Ecossistemas realizada sob a orientação científica da Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira, Investigadora Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Universidade de Aveiro, e co-orientação científica do Doutor Fernando José Mendes Gonçalves, Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao professor Fernando, por sempre ter acreditado em mim e me ter dado a oportunidade de fazer parte da sua equipa de trabalho. Pelo incentivo, apoio científico, partilha de conhecimento, pela amizade.

À professora Ruth, por compreender os meus erros e limitações, pela paciência, pela amizade, pelo crescimento científico e a ajuda fundamental em todo esta dissertação. Obrigado!

A todos os colegas biólogos do Laboratório, obrigado pela ajuda, sempre no momento certo e pelos momentos de boa disposição, de uma forma especial, ao Sérgio, à Catarina e à Sara. Sem eles não teria sido tão fácil.

Aos velhos amigos, Tânia, Pedro, Martha, Ghafa. Obrigado por sempre me aturarem as maluqueiras, as birras, as zangas, os desabafos, as choradeiras, os telefonemas longos. Pelo encorajamento, pela paciência... Eles são a prova de que a amizade jamais terá distância.

Às novas amigadas, Marta, Joana, Elisabete, Inês. Obrigada por cada hora de/no convívio, pelos cafés, pelos gelados, pelos jantares, pelas gargalhadas, pelas “borboletas”..., por cada bocadinho tão especial, que passamos juntas.

A eles todos, simplesmente obrigado por existirem e darem sentido à minha vida!

À Tátá e ao César, por terem sido os primos, os amigos, os manos grandes.

Aos meus pais e ao meu irmão. Obrigado pelo apoio, pela força, pela compreensão, acima de tudo, por terem confiado em mim. Sem eles nada disto teria sido possível!

À Margarida, companheira inseparável, nas noites/dias de trabalho...

Àqueles de quem não falei, mas que de alguma forma foram importantes.

...obrigado a todos por fazerem com que cada momento não fosse apenas mais um momento.

o júri

presidente

Prof. Doutor Carlos Manuel Martins Santos Fonseca
professor auxiliar convidado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Fernando José Mendes Gonçalves (co-orientador)
professor auxiliar com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira (orientadora)
investigadora auxiliar do CESAM, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Isabel Maria Cunha Antunes Lopes
investigadora auxiliar do CESAM, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutor Bruno Branco Castro
estagiário de pós-doutoramento do CESAM, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

*“ Pelo sonho é que vamos, comovidos e mudos. Chegamos? Não chegamos?
(...) Basta que a alma demos, com a mesma alegria, ao que desconhecemos,
e ao que é do dia-a-dia.
Chegamos? Não chegamos?
Partimos. Vamos. Somos”.*

Sebastião da Gama

palavras-chave

solo de referência natural, ensaios de toxicidade, *Eisenia andrei*, *Folsomia candida*, *Lycopersicon esculentum*, critérios de qualidade de solos

resumo

Em todo o mundo, o solo tem uma grande importância para o ser humano, uma vez que fornece os seus principais recursos, sendo também o suporte de quase todas as suas actividades. Por isso, é urgente melhorar, restaurar, proteger e preservar o compartimento terrestre, criando as ferramentas legais apropriadas para o efeito. Assim a Directiva-quadro do solo, em aprovação pela Comunidade Europeia, exige que cada estado membro identifique os locais contaminados existentes no seu território, e que proponha medidas para a sua reabilitação. A análise de risco de locais contaminados surge assim como uma ferramenta de grande utilidade para levar a cabo esta tarefa. Contudo, em Portugal, tal como em outros países europeus, não existe nenhum esquema de análise de risco definido, assim como não existem critérios de qualidade do solo, ou seguindo a terminologia Inglesa: *Soil screening levels (SSLs)*, estabelecidos que permitam fazer uma avaliação preliminar da qualidade dos solos, com base nas concentrações de metais e compostos orgânicos presentes na sua matriz. Este facto compromete a aplicação de quadros de avaliação de riscos, no território nacional, cujo 1º nível dependente da existência destes critérios. De uma forma geral, estes valores foram obtidos para outros países com base em dados de toxicidade determinados em ensaios laboratoriais, realizados para substâncias individuais e utilizando solo artificial OCDE. No entanto, é bem reconhecido que combinações específicas de propriedades físicas e químicas do solo podem influenciar a biodisponibilidade e toxicidade dos contaminantes, para organismos, bem como, o seu transporte para outros compartimentos. Assim, devido a este e outros constrangimentos, *os critérios de qualidade de solos* não devem ser transferidos entre os países, minimizando, portanto, as fontes de variabilidade. Pelo contrário, deverão ser determinados por cada país, utilizando solos naturais regionais na realização de ensaios de toxicidade. Assim, este trabalho teve como principal objectivo identificar um solo natural, da região centro do país, que possa ser utilizado quer para a definição de critérios de qualidade de solos, quer como solo de referência, para ensaios ecotoxicológicos, com solos contaminados, realizados no âmbito de análises de risco específicas para cada local. Um dos solos seleccionados no presente estudo (solo ET), apenas apresentou concentrações de alguns elementos metálicos (Al, Fe, Li, e U) acima de critérios de qualidade definidos. Contudo, tal facto parece estar relacionado com a própria geologia da zona. Estes elementos não parecem estar disponíveis em concentrações que afectem os organismos teste, na medida em que se demonstrou através dos ensaios ecotoxicológicos realizados que a função de *habitat* e de produção para as espécies *Eisenia andrei*, *Folsomia candida* e *Lycopersicon esculentum* não está afectada. Os resultados obtidos sugerem que o solo ET pode vir a ser utilizado como um potencial solo de referência nacional.

keywords

Natural reference soil, ecotoxicological assays, *Eisenia andrei*, *Folsomia candida*, *Lycopersicon esculentum*, soil screening levels

abstract

All around the world, the soil has a high importance to human beings, since it supplies their major resources and supports almost all of their activities. Therefore, it is urgent to improve, to protect, to restore and to preserve the terrestrial compartment, establishing legal documents to attain this objective. Hence, the soil framework directive, which is being approved by the European Community, states that each member state must identify the contaminated sites within their territory, proposing strategies for their reclamation. The risk assessment process becomes a powerful tool to carry out this task. However, Portugal and other member states, as well, have not defined their framework for the risk assessment of contaminated sites and their soil screening levels (SSL) for organic and inorganic contaminants. These values are of paramount importance for the first tier of site specific risk assessment, in which they are compared with the concentrations of organic and inorganic contaminants, recorded in the soil matrix, in order to make a first evaluation of risks. In a general way, in the other countries, these values have been derived based on data gathered from toxicity tests, performed with OECD artificial soil spiked with single substances. Nevertheless, it is well recognized that specific combinations of soil physical and chemical properties can influence the bioavailability and toxicity of contaminants to organisms, as well as, their transport to other compartments, which makes the OECD soil a poor representative of the great majority of natural soils. Hence, due to this and other constraints, SSLs should not be transferred among countries, to minimize sources of variability. In opposition they should be calculated based on toxicity data gathered using regional natural soils. Thus, the main goal of this work was to identify a natural reference soil, from the centre of Portugal, which can be used as reference soil for ecotoxicological assays, performed as part of site specific risk assessment of contaminated sites, or for ecotoxicological assays, with terrestrial species aimed in deriving Portuguese SSLs for metals and inorganic compounds. One of the natural soils identified in this study showed concentrations of some metals (Al, Fe, Li and U) above soil quality criteria, previously defined for other countries. This seemed to be explained by the geologic characteristics of the area, since the habitat and the production functions of this soil to *Eisenia andrei*, *Folsomia candida* e *Lycopersicon esculentum* was not affected. The results recorded in this study suggest that the soil ET, has potential to be used as a Portuguese natural reference soil.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Estrutura da dissertação	8
2. Material e Métodos	9
2.1. Locais de Amostragem	9
2.2. Recolha das amostras de solo e sua caracterização físico-química	10
2.3. Determinação das concentrações de contaminantes orgânicos	12
2.3.1 <i>Análise de PCBs</i>	12
2.3.2 <i>Análise de PAHs</i>	13
2.4. Determinação das concentrações pseudo-totais de metais pesados	13
2.5. Ensaio de evitamento do solo	14
2.5.1. <i>Organismos e condições de cultura</i>	14
2.5.2. <i>Ensaio de evitamento</i>	15
2.6. Ensaio de reprodução com <i>Eisenia andrei</i>	16
2.7. Ensaio de emergência e de crescimento com <i>Lycopersicon esculentum</i>	16
2.8. Análise estatística dos dados	17
3. Resultados	18
3.1. Caracterização físico-química e análise das concentrações pseudo- totais de metais de contaminantes orgânicos	18
3.2. Ensaio de evitamento	23
3.3. Ensaio de reprodução com <i>Eisenia andrei</i>	24
3.4. Ensaio de emergência e de crescimento com <i>Lycopersicon esculentum</i>	25
4. Discussão	27
5. Conclusão Geral	33
Referências bibliográficas	34

Índice de figuras e tabelas

Figuras	Pag.
Figura 1 Localização geográfica dos locais de recolha de solos	10
Figura 2 Parâmetros físico-químicos registados nos dois solos naturais portugueses analisados e no solo de referencia Lufa 2.2.	19
Figura 3 Percentagem de evitamento de <i>Eisenia andrei</i> , registada nos ensaios com solo Lufa 2.2 <i>versus</i> solo ET e solo Lufa 2.2 <i>versus</i> solo LD. As barras de erro correspondem ao desvio padrão dos dados.	23
Figura 4 Percentagem de evitamento de <i>Folsomia candida</i> , registada nos ensaios com solo Lufa 2.2 <i>versus</i> solo ET. As barras de erro correspondem ao desvio padrão dos dados.	24
Figura 5 Número médio de juvenis de <i>Eisenia andrei</i> registados nos solos ET e Lufa 2.2, no ensaio de reprodução. As barras de erro correspondem ao desvio padrão dos dados.	24
Figura 6 Variação média de peso dos indivíduos expostos ao solo Lufa 2.2 (solo 1) e ao solo ET (solo 2) durante o ensaio de reprodução. As barras de erro correspondem ao desvio padrão dos dados.	25
Figura 7 Número médio de sementes de <i>Lycopersicon esculentum</i> que emergiram no solo Lufa 2.2 e no solo ET. As barras de erro correspondem ao desvio padrão dos dados.	26
Figura 8 Figura 8. Valores médios de biomassa fresca e seca, de <i>Lycopersicon esculentum</i> , produzida no solo Lufa 2.2 e no solo ET. As barras de erro correspondem ao desvio padrão dos dados.	26
Tabelas	
Tabela 1 Frações granulométricas do solo ET e respectivas percentagens.	20

Tabela 2	Concentrações pseudo-totais de metais (média \pm desvio padrão) extraídas dos dois solos naturais portugueses com <i>aqua regia</i> e respectivos valores de referência alemães e estabelecidos pela Agência Ambiental Norte Americana US-EPA.	21
Tabela 3	Valores de PCBs registados no solo ET.	22
Tabela 4	Valores de PAHS registados no solo ET	22
Tabela 5	Tabela 4. Valores de referência para PCBs e PAHS (http://rais.ornl.gov/cgi-bin/eco/eco_search , acedido em Junho de 2008).	23

1. Introdução

Ao longo dos tempos, os solos têm vindo a ser sujeitos a poluição e a outros tipos de impactos resultantes das diferentes actividades humanas, com profundos efeitos adversos na sua composição química, estrutura física e na saúde dos organismos que nele existem. Contudo, o solo é um recurso finito, limitado e não renovável, face às suas taxas de degradação potencialmente rápidas, comparativamente às taxas de formação e regeneração extremamente lentas. O recente reconhecimento da sua importância, e do nível de degradação que este recurso natural já sofreu, nas mais diversas regiões do planeta, levou a que, só muito mais tarde, estudos conducentes à avaliação do seu estado de conservação e da sua qualidade, tenham recebido a importância merecida, comparativamente aos estudos realizados para o compartimento aquático e atmosférico (Beck e Rombke, 2005).

O solo representa o principal compartimento para o intercâmbio global de matéria e energia. É um meio vivo e dinâmico, constituindo um *habitat* de biodiversidade abundante, com padrões genéticos únicos, onde se encontra uma enorme quantidade e diversidade de organismos vivos, que servem de reservatório de nutrientes. Além disso, armazena e transforma parcialmente minerais, água, matéria orgânica e diversas substâncias químicas. Todas estas características conferem-lhe uma elevada capacidade de filtração e de efeito tampão estreitamente relacionada com a sua carga de matéria orgânica, limitando através da mesma a erosão e difusão dos contaminantes do solo para a água. O solo funciona ainda como um imprescindível substrato para a produção de alimentos, assim como uma importante fonte de matérias-primas (e.g. argila, areias, minerais e turfa). Contudo, além da sua valorização como um recurso fundamental para um vasto tipo de actividades antropogénicas, considerações éticas, como o valor intrínseco da biodiversidade do solo, por si só, não foram razão suficiente, até agora, para a protecção deste recurso. Por outro lado, há que ter em conta que a maioria dos solos são propriedade privada, sendo assim necessárias iniciativas jurídicas para o estudo dos locais, a fim de serem implementados métodos reprodutíveis e padronizados para avaliação da sua qualidade ecológica (Römbke, 2005).

A maior parte dos custos e consequências da degradação do solo não afectam os seus utilizadores directos, mas sim a sociedade em geral. Dada a importância do solo para o ser humano, e a consequente necessidade de o proteger, surge a urgência de aplicar políticas ambientais mais específicas e direccionadas para a preservação, remediação, e protecção da qualidade do solo. A política em matéria do ambiente (relativa ao ar, solo e água) e a política agrícola (agro-ambiente e eco-condicionalidade), tem vindo a contribuir para a protecção do solo, na medida em que mantêm o nível de matéria orgânica, assim como previne os desabamentos de terra (CCE, 2006). No entanto, por estas medidas serem demasiado abrangentes, sendo o objectivo, na maior parte das vezes a protecção do meio ambiente como um todo, estão longe de integrar todas as problemáticas da degradação dos solos. A nível nacional, a lei de Bases do Ambiente (Lei nº11/87, de 7 de Abril, alterada pela Lei nº13/2002, de 19 de Fevereiro) refere-se à necessidade de se implementar medidas de defesa e valorização dos solos, contudo poucas foram as regulamentações produzidas posteriormente em matéria de solo, para dar resposta a estas recomendações.

Mais recentemente, a Comissão das Comunidades Europeias propõe uma estratégia global para a protecção do solo na UE, através da directiva-quadro do solo (CCE, 2006). Esta marca a primeira abordagem política especificamente orientada para a protecção do solo a nível da UE, tem em conta todas as funções do solo, a sua variabilidade e complexidade e o leque dos diferentes processos de degradação, referindo-se ainda aos aspectos económicos. A directiva-quadro do solo, em aprovação, obriga todos os estados membros a tomarem medidas específicas para lutar contra as ameaças que põem em causa a estabilidade do solo, dando-lhes, no entanto, a total liberdade quanto à forma de o fazerem. Compete, portanto, aos Estados-Membros identificar as zonas de risco existentes dentro do seu território e definir metas para a sua mitigação, bem como o programa de medidas para as atingirem. Estas obrigações vêm permitir um melhor conhecimento da dimensão e localização das ameaças ao solo, assim como a adopção integrada, para todos os países membros, de medidas comuns mais específicas e eficientes (CCE, 2006). Para a identificação das zonas de risco, a comissão incentiva ainda a utilização de sistemas de monitorização já existentes, assim como o desenvolvimento de novas metodologias de monitorização.

A análise de risco ecológico (ERA) surge, assim, como uma excelente ferramenta, para dar resposta ao exigido nesta directiva, uma vez que pode ser utilizada para definir

prioridades no que refere a substâncias poluentes e/ou locais contaminados que exijam medidas regulamentares (Solomon e Sibley, 2001). A análise de risco ecológico tem como objectivo estimar os efeitos adversos que podem ocorrer ou que já estão em curso, em comunidades naturais, em locais expostos a agentes físicos, químicos ou biológicos (Suter, 1993; USEPA, 1998; Solomon e Sibley, 2002) Existem duas categorias gerais de análise de risco ecológico: a análise predictiva e a análise retrospectiva (Newman, 2003). A avaliação de risco predictiva tem assumido maior importância uma vez começou a ser exigida para a notificação de novas substâncias químicas, de substâncias prioritárias já existentes, substâncias activas e substâncias perigosas em produtos biocidas [Directiva 93/67/CEE (CEE, 1993) e Regulamento 1488/94 (EC, 1994)], tendo sido posteriormente elaborado um documento técnico de orientação à realização de análises de risco ambientais e para a saúde humana (EC, 2003). No entanto, a avaliação retrospectiva tem ganho maior ênfase, nas últimas décadas, com o reconhecimento da existência de inúmeros locais contaminados, nas mais diversas áreas do planeta. Assim, este método é utilizado na avaliação dos efeitos de contaminações que tiveram início no passado e que estão a ter graves consequências no presente, tais como a deposição localizada de resíduos perigosos, lamas, chuvas ácidas, extracção de minério ou a aplicação indiscriminada de pesticidas.

A avaliação de risco retrospectiva é mais diversificada comparativamente à avaliação predictiva, uma vez que é distinguida pelo facto de os acontecimentos definirem a dimensão do problema, e pela análise e avaliação de ambientes poluídos diversificados. Assim, enquanto que a avaliação de risco predictiva deve produzir informação para cenários de contaminação genéricos ou hipotéticos, a avaliação de risco retrospectiva têm um verdadeiro palco de actuação, definido pela presença dos contaminantes e pela distribuição dos efeitos (Suter, 1993).

Toda a avaliação predictiva começa com informação sobre fontes e taxas de emissão, e procede à estimativa dos efeitos esperados estudando o comportamento e os impactos toxicológicos/ecotoxicológicos que as substâncias químicas podem ter nos diferentes receptores ecológicos, antes de serem libertadas para o meio ambiente, terminando com o cálculo dos riscos associados a actividades futuras (Suter, 1993; Pereira et al., 2004). Em oposição, o ímpeto para uma avaliação retrospectiva pode ser a identificação de fontes emissoras, a observação de efeitos ou de evidências de exposição dos receptores (Suter, 1993).

Tanto na análise de risco preditiva como retrospectiva, e ainda que com uma organização diversa, existem quatro fases importantes: a identificação dos perigos, avaliação da exposição, avaliação dos efeitos e, por último, a caracterização do risco. Na primeira fase são recolhidas dados relevantes à situação, nomeadamente sobre: fontes e taxas de emissão, receptores ecológicos e contaminantes de potencial preocupação. Sendo estes últimos identificados com base em relações dose-resposta existentes que testemunham a sua perigosidade e com base nos níveis presentes ou previstos nos diferentes compartimentos ambientais. Na avaliação da exposição, identificam-se possíveis vias de exposição, assim como a intensidade e a frequência dos contactos com os contaminantes. A avaliação dos efeitos baseia-se na obtenção de dados ecotoxicológicos relevantes para os níveis de exposição previstos, ou na medição de efeitos já em curso, como resultado de exposições reais. Por último, a caracterização dos riscos integra toda esta informação para calcular a probabilidade de ocorrência de potenciais efeitos adversos para o ecossistema (Newman, 2003; Suter, 1993; USEPA, 1998).

Mais recentes, os modelos europeus de análise de risco de locais contaminados, sobretudo o modelo Inglês (Weeks e Comber, 2005) e o dos Países Baixos (Mesman et al., 2006), apresentam uma organização em etapas, ligeiramente diferente do modelo proposto pela USEPA (1998). Nestes dois últimos modelos, adquire maior destaque o facto de a avaliação de risco ambiental integrar informação de três grandes linhas evidência nomeadamente: química, ecotoxicológica e ecológica. Esta abordagem designada por TRIAD foi inicialmente proposta por Long e Chapman (1985) e por Chapman (1990) para a análise de risco ecológico de sedimentos contaminados e só mais recentemente foi adaptada para solos (Rutgers e Den Besten, 2005 *in* Jensen e Mesman, 2006). Com a adopção desta abordagem, a caracterização dos riscos segue a metodologia de análise pelo peso das evidências (USEPA, 1998), que incorpora a informações fornecida pelas três linhas de evidência na medida em que as mesmas são únicas e complementares: a combinação de componentes é necessária porque nenhum componente individual fornece informações suficientemente abrangentes (Chapman, 1990).

Assim, as análises químicas fornecem informações sobre as concentrações totais dos contaminantes presentes no compartimento em análise e, possivelmente, sobre a sua potencial biodisponibilidade, caso sejam aplicados métodos de extracção (Clevenger, 1990; Peijnenburg e Jager, 2003). Os ensaios ecotoxicológicos fornecem prova directa da

toxicidade relacionada com os contaminantes em causa e a sua verdadeira biodisponibilidade, os seus efeitos combinados e as vias de exposição mais significativas (Van Gestel et al., 2001; O'Halloran, 2006). Posteriormente, Chapman e Hollert (2006) sugerem ainda a possibilidade de se integrarem outras linhas de evidência, além das originais, como a fornecidas pela bioacumulação de contaminantes em diferentes espécies, pelas alterações da diversidade genética e pelos ensaios *in situ*.

A abordagem TRIAD, e a análise pelo peso das evidências, pode expressar os resultados de uma forma qualitativa ou quantitativa (Buset, 2004 *in* Semenzin et al., 2008). As abordagens qualitativas são definidas como simples combinações dos vários resultados numa forma não quantitativa. Deste modo, é assim avaliada a concordância ou discordância entre as diferentes linhas de evidência, não sendo apresentada nenhuma estimativa quantitativa dos riscos (Burton et al., 2002). Por outro lado, as abordagens quantitativas incluem a integração dos resultados das diferentes linhas de evidência, com o objectivo de obter uma estimativa dos riscos (Mesman et al. 2006).

No que refere à linha de evidência ecotoxicológica, a utilização de ensaios ecotoxicológicos para matrizes contaminadas recebeu especial atenção nos últimos vinte anos, uma vez que se percebeu que as concentrações totais de contaminantes presentes nos diferentes compartimentos ambientais por si não permitiam avaliar o potencial impacto ecológico derivado da sua presença (Banks e Schultz, 2005; Fernández et al., 2005). A avaliação dos riscos de substâncias químicas, existentes para o compartimento terrestre, é actualmente baseada, sobretudo, em ensaios ecotoxicológicos realizados com solo artificial, constituído por uma mistura de 70% de areia quartzítica, 20% de argila caulinitica, 10% de turfa, água e carbonato de cálcio para ajustar o pH a 6,0/ 5,0 (Kula, 1997; Lock e Janssen, 2003), e que foi proposto como substrato padrão em 1984, pela Organização para a Cooperação Económica e Desenvolvimento (OECD, 1984). Nestes ensaios o solo é contaminado com uma gama de concentrações apropriada, com vista a determinar parâmetros de toxicidade letais ou sub-letais para os organismos teste. Outros trabalhos, desenvolvidos sobretudo a nível Europeu, envolveram a utilização de um solo natural padronizado, seleccionando como um solo de referência: o solo alemão LUFA 2.2. (Agrarian Research Centre; Speyer/ Germany) (e.g. Brodsky et al., 1997; Fischer et al., 1997; Kula e Larink, 1997; Lock et al., 2004; Römbke et al., 2006).

Portugal não tem fugido à regra e os ensaios ecotoxicológicos com organismos

terrestres, quer para avaliação da toxicidade de substâncias químicas (e.g. Vijver et al., 2001; Amorim et al., 2005a; Amorim et al., 2005b; Pereira et al., submetido), quer para a avaliação de solos contaminados (Antunes et al., 2008; Antunes et al., in press) têm sido efectuados com recurso ao solo natural LUFA 2.2 ou a solo OCDE. Apesar das muitas vantagens na utilização destes solos (OCDE e Lufa 2.2.), em termos de reprodutibilidade e comparabilidade dos resultados, que são dois pressuposto fundamentais à padronização dos ensaios ecotoxicológicos, é sabido que as suas propriedades físico-químicas diferem nitidamente das dos solos naturais das mais diversas regiões europeias (Amorim et al., 2005b; Rooney et al., 2006; Rombke et al., 2006). Estas desigualdades, particularmente no que refere ao pH, conteúdo em matéria orgânica e capacidade de retenção da água, podem influenciar fortemente a biodisponibilidade das diferentes contaminantes químicos (metais e compostos orgânicos) nos solos e, portanto, conduzir a sub ou sobreavaliações da sua toxicidade (e.g., Vijver et al., 2001; Dayton et al., 2006; Rooney et al., 2006; Semenzin et al., 2007). É importante ainda referir que existe uma diferença significativa no teor em matéria orgânica entre o solo artificial OCDE e o solo de referência natural LUFA 2.2, actualmente usados em testes ecotoxicológicos como controlo, sendo que na LUFA 2.2 este é normalmente menor (aproximadamente 2,3%), comparativamente ao solo artificial padronizado OCDE (5,8%). Tal como já foi demonstrado em alguns estudos, a existência de uma maior percentagem de matéria orgânica, no solo OCDE, resulta geralmente numa maior capacidade de absorção dos contaminantes e, subseqüentemente, numa menor mobilidade e biodisponibilidade dos mesmos para exercerem efeitos tóxicos (Amorim et al., 2005b). Tal facto dificulta a extrapolação de dados de toxicidade de substâncias químicas, obtidos com estes solos, para solos de referência naturais. Os bioensaios com amostras naturais contaminadas, em processos de análise de risco de locais contaminados, podem também ser úteis na previsão da biodisponibilidade dos contaminantes e do real impacto dos mesmos nos organismos terrestres, uma vez que podem registar respostas/efeitos a níveis mais baixos que aqueles que são facilmente detectados por análise químicas (Banks e Schultz, 2005). Contudo, mais uma vez é de todo aconselhável que estes ensaios utilizem igualmente solos naturais não contaminados, com características pedológicas semelhantes, como solos de referência (Ferguson et al., 2008). Isto é especialmente importante, por exemplo, no caso dos metais, que são elementos de ocorrência natural, cujas concentrações de base são características de cada solo, e podem

induzir efeitos diferenciados nos organismos (Crommentuijn, et al., 2000). Estes efeitos não são tidos em consideração quando se utiliza um solo de referência natural (proveniente de outra região) ou um solo artificial como controlos. Assim, dada a diversidade do contexto geológico nacional e com o objectivo de aumentar a relevância ecológica das análises de risco de locais contaminados em território Português, este trabalho teve como objectivo identificar um solo natural da região centro do país, com potencial para ser utilizado como solo de referência natural, em ensaios ecotoxicológicos de solos naturais contaminados. Este solo, em conjunto com outros solos naturais que terão que ser identificados para outras regiões do país, representativos dos principais tipos de solo existentes em Portugal Continental, será igualmente útil, futuramente, para a definição de critérios de qualidade de solos. Estes critérios são de grande utilidade na fase inicial de análise de risco de locais contaminados (Weeks e Comber, 2005; Mesman et al., 2006) e ainda não estão definidos em Portugal (Pereira et al., 2008).

1.1. Estrutura da dissertação

A presente dissertação é constituída por um capítulo, escrito na forma de artigo científico, com uma introdução que faz uma abordagem geral da problemática relacionada com a utilização de solos naturais em ensaios ecotoxicológicos, e que conduziu ao trabalho de investigação descrito. A secção de material e métodos descreve as principais metodologias aplicadas na caracterização físico-química dos solos naturais recolhidos, assim como dos ensaios ecotoxicológicos com organismos terrestres, realizados com base em protocolos padronizados e levados a cabo com o intuito de avaliar a qualidade desses mesmos solos como *habitat*, para as diferentes espécies. Os resultados obtidos, previamente analisados estatisticamente, são apresentados em de forma de tabelas e gráficos, numa secção própria, de modo a facilitar a interpretação dos mesmos. Esta secção é seguida pela sua discussão e por uma breve conclusão, onde se indica sobretudo as etapas

futuras a realizar com vista à identificação/validação de um solo natural para a região centro do país.

2. Material e Métodos

2.1. Locais de Amostragem

Os locais seleccionados para a recolha de solos naturais pertencem à localidade de Lageosa do Dão (Concelho de Tondela, Distrito de Viseu) e à localidade de Ervas Tenras (Concelho de Pinhel, Distrito da Guarda) (40° 44' 20N), ambas situadas geotectonicamente na Zona Centro Ibérica (ZCI) de Portugal, onde se verifica a predominância de ambientes plutónicos, nomeadamente rochas graníticas (Teixeira e Gonçalves, 1980). Lageosa do Dão é uma freguesia do concelho de Tondela, situada no cimo rochoso da serra de Panela, que se ergue entre as distantes serras do Caramulo e da Estrela. O nome da freguesia deriva da palavra latina “Lagenosa”, sendo este um dos nomes mais representados na toponímia do nosso país e cujos significados derivam da flora, da fauna ou, como neste caso, da natureza do solo¹. A população encontra o seu meio de sobrevivência no sector primário, nomeadamente, na agricultura, sendo praticada uma agricultura de subsistência em propriedades pequenas, cujos produtos são a batata e o milho. O sector secundário é o que tem maior peso na economia da freguesia, distribuindo-se por várias actividades geradoras de emprego com a indústria de vinhos, a indústria de marcenaria, a indústria de pirotecnia e a indústria hoteleira.

Em termos de flora é predominante nesta zona o pinheiro bravo (*Pinus pinaster*) e carvalho português (*Quercus robur*), assim com algumas herbáceas de pequenas dimensões (Sampaio, 1988).

A freguesia de Ervas Tenras, onde de resto incidiu a maior parte deste trabalho, deve a sua toponímia, precisamente, à fertilidade que o seu solo sempre apresentou para as práticas agrícolas. São, portanto, a agricultura e a pecuária (gado bovino, ovino e caprino), as principais actividades económicas da povoação. Nestes solos são cultivadas sobretudo grandes extensões de trigo, aveia, centeio, milho e sorgo para sustento dos animais. A grande e fertilidade do solo permite ainda o cultivo de pequenas hortas para consumo doméstico, nomeadamente batata, hortaliça e legumes. A produção de vinho e pomares de algumas frutas, como maçãs e peras, são ainda uma forma de sustento para

¹ <http://lajeosadodao.com/freguesia/index.html>, acedido em Abril de 2008

alguma parte da população. Além da actividade agrícola, não existe qualquer tipo de actividade industrial na zona.

Neste local verifica-se uma grande diversidade florística, com o predomínio de rosmaninhos (*Lavandula luisieri*), feto (*Pteridium aquilinum*), giesta (*Cytisus striatus*), silva (*Rubus sp.*), pinheiro bravo (*Pinus pinaster*) e carvalho português (*Quercus robur*). Na zona de recolha da amostra de solo são característicos grandes prados férteis de herbáceas de pequenas dimensões (Sampaio, 1988).

As amostras de solo estudadas provêm de um local onde não há registo histórico de ocorrência de práticas agrícolas ou de qualquer tipo de actividade industrial.

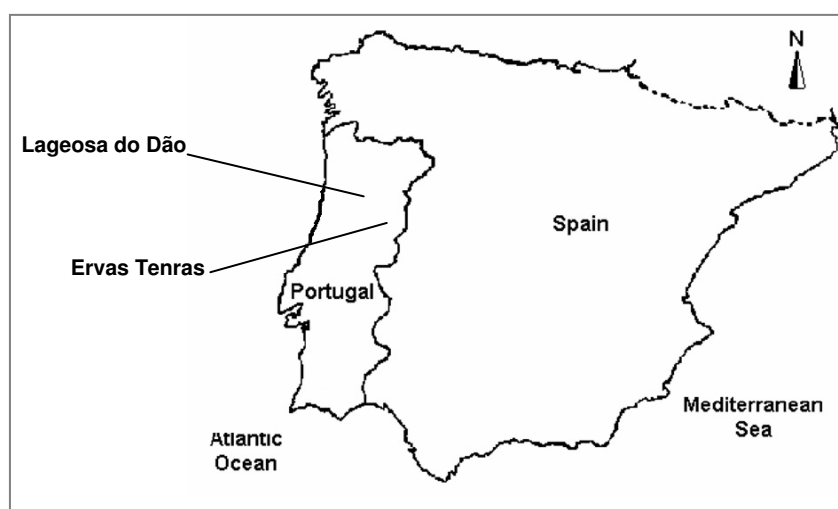


Figura 1. Localização geográfica dos locais de recolha de solos.

2.2. Recolha das amostras de solo e sua caracterização físico-química

Em cada um dos locais de amostragem, uma vez retirada a camada superficial de material vegetal, procedeu-se à recolha de amostras superficiais (0-15 cm), em diferentes pontos, que foram combinadas para formar uma amostra composta para Ervas Tenras e Lageosa do Dão (amostras ET e LD, respectivamente). Estas amostras foram transportadas imediatamente para o laboratório, onde foram colocadas a secar à temperatura ambiente e, mais tarde, peneiradas a fim de preservar a fracção <2 mm, para determinação das propriedades físico-químicas do solo (pH, condutividade, humidade, capacidade de

retenção hídrica e teor de matéria orgânica) e para a realização de ensaios ecotoxicológicos.

Os parâmetros físico-químicos foram determinados em dez réplicas de cada amostra de solo. A determinação do pH e da condutividade do solo em H₂O foi efectuada de acordo com o método descrito por FAOUN (1984). Assim, para cada amostra pesaram-se 10 g de solo e adicionaram-se 50 ml de água destilada, numa proporção de 1:5 (m/v). As suspensões foram de seguida agitadas mecanicamente durante 30 min. As misturas foram deixadas em repouso durante 1h e o pH da solução foi medido posteriormente com o auxílio de um medidor de pH pré-calibrado WTW330/SET-2. Nas mesmas suspensões, deixadas em repouso durante 12h, foi medida a condutividade, com um medidor LF 330/SET, segundo o procedimento descrito por FAOUN (1984). O pH do solo em KCl foi medido de acordo com a metodologia descrita anteriormente mas usando uma solução de KCl 1M (ISO, 2005) em substituição à água destilada.

A capacidade de retenção hídrica dos solos, foi determinada segundo protocolo padronizado ISO 190/CS 4 N 0238 (ISO, 2005). Para o efeito, as amostras de solo (3 réplicas) foram colocadas em frascos de polipropileno, com o fundo removido e substituído por papel de filtro, que foram posteriormente imersos em água durante 3 h. Após este período, os frascos foram colocados sobre papel absorvente, durante 2 h, a fim de se eliminar o excesso de água. A capacidade de retenção da água foi determinada por pesagem antes e após secagem de cada réplica a 105 ° C (ISO, 2005). A humidade do solo foi determinada a partir da perda de peso após secagem a 105 °C, durante 24 h. O teor de matéria orgânica foi determinado pela perda por combustão a 450 ° C, durante 8h (SPAC, 2000).

Procedeu-se ainda à determinação da dimensão das partículas através da análise mecânica seguindo o método descrito no FAOUN (1984). A porção mineral da amostra de solo, obtido após um tratamento prévio com peróxido de hidrogénio, para oxidar a matéria orgânica, e com uma solução de sódio hexametáfosfato, para dispersar partículas, foi peneirada a fim de separar o solo em diferentes fracções (2mm, 1 mm, 500 µ m, 250 µ m, 100 µ m e 63 µ m).

2.3. Determinação das concentrações de contaminantes orgânicos

2.3.1 Análise de PCBs

A metodologia de extracção foi baseado no método USEPA. Assim, cerca de dez gramas de solo foram extraídas por Ultrasons, com uma mistura de hexano/acetona (2:1). De seguida, os extractos foram limpos, com Florisil, através de um processo de Extracção por Fase Sólida (SPE), e secos para posterior análise. A amostra foi dissolvida em iso-octano para posterior análise por GC-MS. Os resultados foram depois expressos em peso seco. Este estudo foca-se na determinação de 21 congéneres de PCBs (congéneres 1, 5, 18, 28, 31, 44, 52, 66, 87, 101, 110, 118, 138, 141, 151, 153, 170, 180, 183, 187, 206) de acordo com a lista da EPA² e baseia-se no método 8270 US EPA.

Os extractos foram analisados com um Cromatógrafo de gás acoplado a um espectrómetro de massa (GC/MS-QP5050A), usando o hélio como gás de arraste e uma coluna capilar de sílica DB-5. A detecção foi feita por Impacto Electrónico (EI) em modo SIM. O volume de injeção foi de 1 µl em modo *splitless*. A temperatura da coluna foi programada para 40°C, durante 2 minutos, aumentando a uma taxa de 10 °C /min até 290°C e mantida durante 8 minutos. O fluxo da coluna foi mantido a 0,7 ml/min., a temperatura do injector a 280°C e a da interface a 300 °C.

Por cada conjunto de dez amostras foi analisado pelo menos um branco. Para cada amostra foram extraídas e analisadas duas réplicas, de modo a avaliar a precisão do método. Foi ainda utilizado um padrão interno (IST) de modo a garantir a consistência da análise (volume de injeção, variações do aparelho e tempos de retenção). O padrão interno utilizado foi o PCB congénere 209. A aquisição foi efectuada usando um ião de quantificação e dois iões de confirmação, seguindo o critério da maior abundância relativa, os iões de fragmentação típicos e de não interferência com os picos vizinhos. Os compostos foram identificados nas amostras quando o tempo de retenção coincide com o do padrão e quando os iões de quantificação e confirmação foram identificados e a razão entre eles não variou mais do que 15% em relação aos padrões.

² <http://www.epa.gov/pcbs/pubs/about.htm>, acessido em Junho de 2008

2.3.2 Análise de PAHs

A metodologia de extracção foi baseado no método USEPA. Assim, cerca de dez gramas de solo foram extraídas por Ultrasons, com uma mistura de hexano/acetona (2:1). De seguida, os extractos foram limpos, com alumina, através de um processo de Extracção por Fase Sólida (SPE), e secos para posterior análise por GC-MS. Para análise dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HAPs), a amostra foi dissolvida em diclorometano. Os resultados foram expressos em peso seco.

Os extractos foram analisados com um Cromatógrafo de Gás acoplado a um Espectrómetro de Massa (GC/MS-QP5050A), usando o hélio como gás de arraste e uma coluna capilar de sílica DB-5. A detecção foi feita por Impacto Electrónico (EI) em modo SIM. O volume de injeção foi de 1 µl em modo *splitless*. A temperatura do injector foi mantida a 290°C e a da interface a 300 °C. A temperatura da coluna foi programada do seguinte modo: 35 °C durante 2 minutos, aumentada a uma taxa de 10 °C/min até 220°C, de seguida a 6°C/min até 260°C e finalmente a 3°C/min até 300°C e mantida durante 6 minutos.

Por cada grupo de 10 amostras foi analisado pelo menos um branco, e foram extraídas e analisadas duas réplicas de cada amostra de modo a avaliar a precisão do método. Foi ainda utilizado um padrão interno (IST) e uma mistura de PAHs deuterada, de modo garantir a consistência da análise (volume de injeção, variações do aparelho e tempos de retenção). A aquisição foi efectuada usando um ião de quantificação e dois iões de confirmação, seguindo o critério da maior abundância relativa, os iões de fragmentação típicos e de não interferência com os picos vizinhos. Os PAHs foram identificados nas amostras quando o tempo de retenção coincide com o do padrão, quando os iões de quantificação e confirmação foram identificados e a razão entre eles não variou mais do que 15% em relação aos padrões.

2.4. Determinação das concentrações pseudo-totais de metais pesados

A análise de metais pesados nas amostras de solo foi determinada por extracção com *aqua regia*. Assim, para cada amostra (3 réplicas) foram utilizados frascos de teflon nos quais se misturou 1g de solo (tarado com uma aproximação de 0,001g), com *aqua*

regia (3 ml ácido clorídrico 37% *pro analysis*, Panreac® + 1 ml ácido nítrico 65%, Suprapu, Merck®). Seguidamente, os frascos foram devidamente fechados e mantidos em banho de areia, a 100 °C, durante aproximadamente 1h. Após este tempo, os frascos foram retirados do banho e deixados a arrefecer, para de seguida serem adicionados 10 ml de HNO₃ (4 N). De forma a remover pequenos resíduos, a solução foi filtrada através de filtros 0,2 µm FT30/0.2CA-S e transferida para tubos volumétricos. O volume de cada tubo foi acrescentado com água destilada (18,2 Ω) até perfazer 25ml. As concentrações totais de metais pesados foram analisadas por ICP-MS.

Para o controlo da qualidade da análise e do processo de digestão foram ainda preparados dez brancos que passaram por todo o processo de extracção, utilizando os mesmos reagentes, que foram aplicados às amostras de solo. Todo o material utilizado para processamento das amostras foi cuidadosamente lavado por imersão em ácido nítrico a 50%, durante pelo menos 12h, seguida de enxaguamento com água destilada (18,2Ω) e secagem na estufa.

2.5. Ensaio de evitamento do solo

2.5.1. Organismos e condições de cultura

Os ensaios de evitamento foram realizados com minhocas adultas (*Eisenia andrei*) e colêmbolos (*Folsomia candida*), ambos criados numa cultura mantida em ambiente controlado (temperatura 20 ± 2 °C; fotoperíodo 16h^L: 8h^D). As culturas de minhocas foram mantidas seguindo as recomendações do protocolo padronizado (ISO, 2005). Assim, os organismos foram mantidos em caixas de plástico, numa mistura de solo, folhas e estrume de cavalo, que lhes serve de alimento. Na tampa da caixa foi cortada uma secção quadrada, a qual foi revestida com rede com rede de 300µm de malha, para arejamento. O meio de cultura foi humedecido periodicamente para manter o teor de humidade. O pH foi igualmente controlado. Os organismos foram alimentados duas vezes por mês com folhas secas de amieiro (*Alnus glutinosa*). Os indivíduos utilizados nos testes tinham um peso médio de 0,28 a 0,655 g.

As culturas de colêmbolos foram desenvolvidas em recipientes de plástico semi-cheios com uma mistura de gesso, carvão activado e água. Os organismos foram

alimentados de dois em dois dias, com uma pequena quantidade de levedura seca. Todos os organismos da espécie *Folsomia candida*, utilizados nos testes, tinham entre 10 a 12 dias e eram provenientes de culturas sincronizadas.

2.5.2. Ensaio de evitamento

Para os ensaios de evitamento com *Eisenia andrei*, que seguiram os procedimentos descritos pelo protocolo padronizado ISO/TC 190/SC 4 N 0238 (ISO, 2005), foram utilizadas caixas de plástico (425 cm² de área) que foram divididas em dois compartimentos iguais, através de uma linha traçada na base da caixa. Num dos compartimentos colocou-se 200g do solo teste e no outro 200g solo de referência padronizado LUFA 2.2 (Agronomy Research Centre, Speyer, Alemanha). Para cada um dos solos foram efectuadas 47 réplicas. Antes de se iniciar o ensaio, o seu conteúdo em água foi ajustado para 40% da sua capacidade de retenção, através da adição de água destilada e homogeneização cuidada de cada um dos solos, para evitar a mistura entre os compartimentos. O ensaio teve início com a colocação de 10 organismos na separação dos compartimentos da caixa, cuidadosamente cobertos com solo. A exposição decorreu durante 48h, sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo, semelhantes às descritas para a cultura. Os organismos não foram alimentados durante o ensaio.

Os ensaios de evitamento com *Folsomia candida* foram realizados com base no procedimento descrito por Luz (2004) e pelo protocolo padronizado ISO/NP 17512-2 (em aprovação). Assim foram utilizados recipientes cilíndricos de plástico (diâmetro: 7 cm, altura: 6 cm), como câmaras de ensaio e, para cada réplica, pesaram-se 40g de cada um dos solos (LUFA 2.2 e solo teste), nos quais se misturaram aproximadamente 2 mg de levedura seca granulada. Os solos foram seguidamente colocados em cada uma das metades do recipiente e humedecidos até 50% da sua capacidade de retenção. Neste ensaio foram preparadas quinze réplicas, apenas do solo ET. Após a colocação dos solos, procedeu-se à remoção do cartão divisor e colocaram-se 10 indivíduos na linha mediana de cada câmara de ensaio. Para reduzir a evaporação e evitar que os organismos fugissem, as câmaras foram tapadas com película transparente e posteriormente mantidas numa câmara escura a uma temperatura 20 ± 2 °C, com um fotoperíodo de 16^L:8h^E, durante 48h.

No final do período de exposição, os solos de ambos os lados das câmaras foram cuidadosamente separados com o cartão e cada metade do recipiente foi preenchida com água e algumas gotas de tinta suave. Ao mesmo tempo que se agitava cada uma das metades, os animais subiam à superfície e flutuavam, efectuando-se assim a sua contagem.

2.6. Ensaio de reprodução com *Eisenia andrei*

O ensaio de reprodução com *Eisenia andrei* foi efectuado de acordo com o protocolo padronizado 11268-2.2. (ISO/DIS, 1996). Para o efeito foram utilizadas minhocas adultas cliteladas, com peso entre os 0,250 e 0,600g, criadas numa cultura mantida em ambiente controlado (temperatura 20 ± 2 °C; fotoperíodo 16h^L: 8h^D). Os organismos seleccionados para o ensaio foram aclimatados, em solo de referência Lufa 2.2 com estrume desfaunado, durante 24 h, tal como em ISO (2005).

O ensaio foi realizado apenas para o solo ET (15 réplicas), em caixas de plástico, com tampas perfuradas de modo a permitir a ventilação, utilizando 500g de solo. O solo de referência LUFA 2.2 foi utilizado como solo controlo, para o qual foram incluídas 4 réplicas no ensaio. Em cada réplica foram colocados 10 organismos-teste, previamente pesados (com aproximação às centésimas), após a humidade do solo ter sido ajustada para 40% da sua capacidade de retenção. No início do teste, de cada um dos recipientes foi ainda retirada uma pequena porção de solo, a fim de ser determinado o pH e a humidade, conforme o processo já descrito anteriormente. Os 10 organismos permaneceram nos recipientes até o 26º dia, quando foram retirados para que apenas os casulos produzidos aí permanecessem até ao 56º dia do ensaio. Após esse período, os juvenis produzidos em cada uma das réplicas foram contabilizados. Durante o ensaio, os organismos foram alimentados semanalmente, com 5 g de estrume de cavalo desfaunado, moído e peneirado (por caixa) e o solo humedecido com água.

2.7. Ensaio de emergência e crescimento com *Lycopersicon esculentum*

Para a realização de ensaios de germinação e crescimento com plantas terrestres, seguiram-se as indicações do protocolo padronizado ISO 11269 – 2 (ISO, 2005). Para o efeito, pesaram-se 200g de cada um dos solos, Lufa 2.2 e Solo ET, e colocaram-se em

pequenos recipientes de plástico. Os recipientes foram perfurados na base, de forma a permitir a passagem, através do orifício, de uma pequena corda, que contactava com a água do recipiente colocado na base, mantendo deste modo a humidade do solo, a qual foi inicialmente ajustada para 40% da capacidade de retenção da água. Em cada réplica de solo Lufa 2.2 (4) e de solo ET (20) foram colocadas 20 sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*).

Os recipientes foram posteriormente incubados em ambiente controlado (temperatura 20 ± 2 °C; fotoperíodo 16h^L: 8h^D; luminosidade 25 000 lux). Após 50% das sementes no solo de referência Lufa 2.2. terem emergido, mantiveram-se no máximo cinco plantas por recipiente, tendo o ensaio prosseguido por mais 14 dias. No final deste período, as plantas de cada réplica foram cortadas, imediatamente acima da superfície do solo, e pesadas para determinação da biomassa fresca. Posteriormente, procedeu-se à sua secagem a 80°C, até estabilização do peso, para determinação da biomassa fresca, com uma precisão de 0,0001g.

2.8. Análise estatística dos dados

No concerne aos dados dos ensaios de evitamento com *Eisenia andrei* e *Folsomia candida*, uma vez que a preferência dos organismos por cada um dos solos, presentes na câmara, não é feita de forma independente, realizaram-se testes-t emparelhados de forma a verificar a ocorrência de um comportamento de preferência/evitamento significativo, do solo teste em relação ao solo Lufa 2.2.

Relativamente ao ensaio de reprodução com *Eisenia andrei* e ao ensaio de emergência e crescimento com *Lycopersicon esculentum* realizou-se uma análise de variância de uma via, de forma a verificar a existência de diferenças significativas nos parâmetros avaliados (crescimento, número de juvenis, emergência e biomassa fresca e seca acima do solo) entre o solo natural ET e o solo de referência Lufa 2.2. (Zar, 1999).

3. Resultados

3.1. Caracterização físico-química e análise das concentrações pseudo-totais de metais de contaminantes orgânicos

No que refere à caracterização físico-química dos solos (Figura 2), ambos revelaram ser solos ácidos com valores de pH, na suspensão aquosa, de 5,2 e 5,9, respectivamente, estando, portanto, muito próximos do valor de pH do solo Lufa 2.2 (pH=4,9). No que refere aos valores de pH determinados com a solução de KCL, estes foram igualmente muito semelhantes em ambos os solos naturais portugueses (pH_{ET}=4,3; pH_{LD}=4,2) e ligeiramente inferiores ao valor determinado para o solo Lufa 2.2 (pH=5,6). A condutividade foi igualmente baixa nos dois solos analisados, sendo 4,86µS/cm, no solo ET e 12,8µS/cm, no solo LD. Estes valores foram bastante inferiores aos registados no solo de referência alemão.

O solo LD apresentou uma maior percentagem quer de humidade (11%) quer de capacidade para a retenção da água (30%) quando comparado com o solo ET. No que se refere à humidade, os valores foram bastante inferiores ao solo Lufa 2.2, que apresentou uma percentagem de 19%. Contudo, ainda que os solos passem por um período de secagem à temperatura ambiente, as condições ambientais no momento da recolha podem influenciar este parâmetro.

No que refere à matéria orgânica, foi possível verificar um maior teor nos solos portugueses (ET- 6,5%; LD- 6,3%) que, deste modo, apresentaram alta percentagem de matéria orgânica (> 6%) (USEPA, 2004). Por oposição o solo Lufa 2.2. que tem uma percentagem média de 2,3% de matéria orgânica ($2\% \leq OM \leq 6\%$).

Considerando as percentagens das fracções granulométricas do solo ET, e com base no esquema britânico de classificação de solos, a partir da textura das partículas minerais que o compõem, este pode ser classificado como um solo argilo-arenoso (do Inglês: *sandy clay*), que se caracteriza por uma elevada percentagem da fracção de areia (63-2000µm) e uma reduzida percentagem de argila (<63µm) (Gerrard, 2000).

Considerando as concentrações pseudo-totais de metais (Tabela 2), registadas em ambos os solos, é possível verificar que estes têm uma composição química muito semelhante. Assim, ambos os solos apresentaram valores de alumínio (Al), ferro (Fe), boro

(B), lítio (Li) e urânio (U) superiores aos valores de referência alemães e aos propostos pela EPA. Todos os outros elementos foram registados em concentrações inferiores aos valores de referência descritos.

No que refere aos valores de compostos Bifenil policlorados (do inglês: Polychlorinated byphenyls - PCBs) (Tabela 3), a maior parte dos congéneres avaliados no solo de Ervas Tenras estiveram abaixo dos limites de detecção. Os congéneres correspondem a cada um dos compostos químicos bem definidos dentro das categorias dos PCBs³. O nome de cada congénere especifica o número total de substituintes de cada cloro e a posição de cada átomo de cloro. De acordo com a a tabela apresentada pela EPA, os congéneres registados neste solo foram:

- 2, 4', 5 –triclorobifenil (31);
- 2, 2', 5, 5' – tetraclorobifenil;
- 2, 3',4, 4',5 –pentaclorobifenil (118);
- 2, 2', 3, 4, 4', 5' – hexaclorobifenil (138);
- 2, 2',4, 4',5, 5' hexaclorobifenil (153);
- 2, 2', 3, 4', 5, 5', 6 – heptaclorobifenil (187).

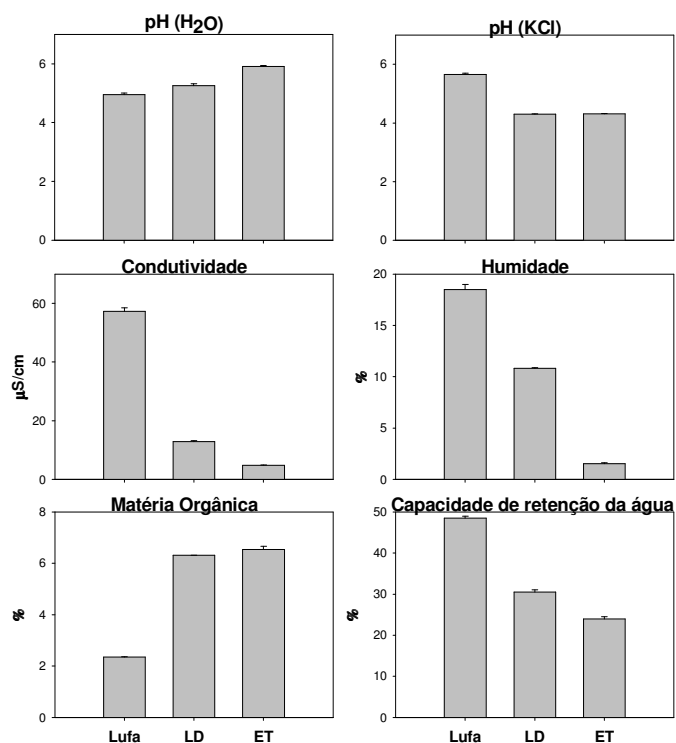


Figura 2. Parâmetros físico-químicos registados nos dois solos naturais portugueses (LD e ET) analisados e no solo de referência Lufa 2.2.

³ <http://www.epa.gov/pcb/pubs/about.htm>, acedido em Junho de 2008

As concentrações de PCBs, registadas na totalidade no solo ET, foram muito inferiores aos valores de referência existentes (Tabela 5). Quanto aos valores de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (do inglês: *polycyclic aromatic hydrocarbons* – PAHs) (Tabela 4), a grande maioria dos compostos analisados estava abaixo dos limites de detecção, no solo de Ervas Tenras, perfazendo na sua totalidade uma concentração de 8,05 mg/Kg de solo, o que foi igualmente muito inferior aos valores de referência reportados (Tabela 5).

A determinação de pesticidas está ainda em curso. Contudo, até à data, a contaminação química deste solo, quer com compostos orgânicos quer inorgânicos, é incipiente, dado que a grande maioria dos compostos químicos foram registados em concentrações inferiores a valores de referência estabelecidos para de solos.

Tabela 1. Frações granulométricas do solo ET e respectivas percentagens.	
Frações	(%)
>2mm	48,75
2-1mm	10,42
1-0,5mm	17,10
0,5-0,25mm	10,49
0,25-0,125mm	7,45
0,125-0,063mm	3,78
<0,063mm	2,01

Tabela 2. Concentrações pseudo-totais de metais (média \pm desvio padrão) extraídas dos dois solos naturais portugueses com *aqua regia* e respectivos valores de referência alemães e estabelecidos pela Agência Ambiental Norte Americana US-EPA (http://rais.ornl.gov/cgi-bin/eco/ECO_select, disponível em Junho de 2008).

	Dutch Intervention soil screening Benchmark mg/Kg ¹	Dutch Target soil screening Benchmark mg/Kg ⁵⁰	EPA R6 Earthworms Surface soil screening Benchmark mg/Kg ⁵⁶	EPA R6 Plants Surface soil screening Benchmark mg/Kg ⁵⁷	SO EPA R4 soil screening Benchmark mg/Kg ⁶¹	Solo 1 (Lageosa do Dão) mg/Kg	Solo 2 (Ervas Tenras) mg/Kg
Ag	15	–	–	2	2	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$
Al	–	–	–	50	50	36165,1 $\pm 2952,7$	25628,5 $\pm 5130,0$
B	–	–	–	0,5	0,5	4,2 $\pm 1,9$	2,2 $\pm 0,8$
Ba	625	160	–	500	165	36,3 $\pm 2,8$	45,8 $\pm 8,0$
Be	29	1,1	–	10	1,1	4,3 $\pm 0,2$	1,2 $\pm 0,2$
Cd	12	0,8	110	29	1,6	0,04 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,1$
Co	240	9	–	20	40	6,6 $\pm 1,2$	5,6 $\pm 1,1$
Cr	230	100	0,4	5	0,4	11,2 $\pm 1,8$	10,8 $\pm 2,1$
Cu	190	36	61	100	40	5,9 $\pm 1,1$	9,0 $\pm 1,8$
Fe	–	–	–	–	200	23690,1 $\pm 1948,7$	24921,4 $\pm 4534,4$
Li	–	–	–	2	2	21,9 $\pm 2,1$	124,4 $\pm 22,9$
Hg	–	–	–	–	–	5255,0 $\pm 696,7$	5253,5 $\pm 1025,5$
Mn	–	–	–	500	100	166,0 $\pm 144,1$	386,8 $\pm 77,9$
Mo	480	3	–	2	2	0,5 $\pm 0,1$	0,9 $\pm 0,2$
Na	–	–	–	–	–	99,4 $\pm 15,5$	78,1 $\pm 14,9$
Ni	210	35	200	30	30	3,0 $\pm 0,2$	4,6 $\pm 0,9$
Pb	290	85	500	50	50	12,5 $\pm 1,1$	12,5 $\pm 2,2$
Sb	–	–	–	–	–	0,35 $\pm 0,1$	0,2 $\pm 0,0$
Sn	910	–	–	50	53	9,4 $\pm 1,6$	10,4 $\pm 1,9$
U	–	–	–	5	5	81,2 $\pm 9,8$	7,8 $\pm 1,7$
V	250	42	–	2	2	46,3 $\pm 10,1$	37,8 $\pm 14,1$
Zn	720	140	120	190	50	83,8 $\pm 9,4$	57,1 $\pm 8,9$

Tabela 3. Valores de PCBs registados no solo ET.

Congéneres	Concentração (µg/kg)
18	ild
31	0,22
52	0,07
44	ild
66	ild
101	ild
87	ild
110	ild
151	ild
118	0,27
153	0,06
141	ild
138	0,08
187	0,07
183	ild
180	ild
170	ild
206	ild
Total	0,78
ild- inferior ao limite de detecção	

Tabela 4. Valores de PAHS registados no solo ET.

Composto	Concentração (µg/Kg)
NP	0,8
ACY	ild
ACE	ild
FLU	ild
PHE	2,3
ANT	ild
FLA	3,7
PYR	ild
BAA	ild
CRY	1,25
BBF	ild
BKF	ild
BAP	ild
IND	ild
DBAH	ild
BGHI	ild
ild- inferior ao limite de detecção	

Tabela 5. Valores de referência para PCBs e PAHS (http://rais.ornl.gov/cgi-bin/eco/eco_search, acessado em Junho de 2008).

	Dutch Intervention soil screening Benchmark mg/Kg ¹	Dutch Target soil screening Benchmark mg/Kg ⁵⁰	EPA R6 Plants Surface soil screening Benchmark mg/Kg ⁵⁶	SO EPA R4 soil screening Benchmark mg/Kg ⁶¹	SO EPA R5 soil screening Benchmark mg/Kg ⁶¹
PCBs	1	0,02	40	---	0,000323
PAHs Total	40	1	—	1	---

3.2. Ensaios de evitamento

No ensaio de evitamento com *Eisenia andrei* uma maioria significativa dos organismos evitou o solo LD ($t=-5.096$; d.f.=30; $p<=0,001$), enquanto que, por oposição, houve uma preferência significativa pelo solo ET ($t=11,261$; d.f.=46; $p<=0,001$) em detrimento do solo Lufa 2.2.

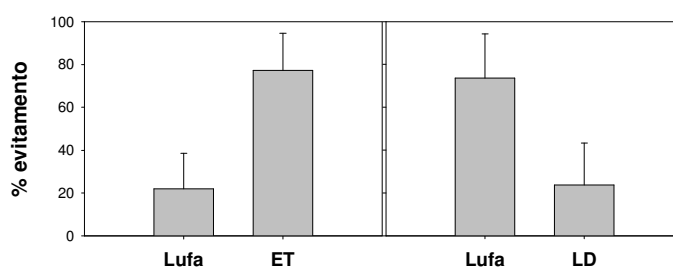


Figura 3- Percentagem de evitamento de *Eisenia andrei* registada nos ensaios com solo Lufa 2.2 versus solo ET e solo Lufa 2.2 versus solo LD. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

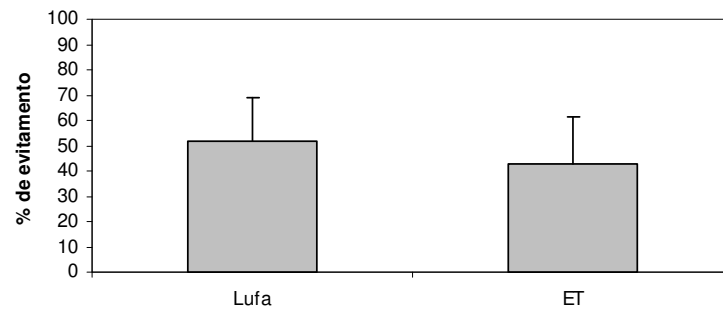


Figura 4- Percentagem de evitamento de *Folsomia candida* registada nos ensaios com solo Lufa 2.2 versus solo ET. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Quanto ao ensaio de evitamento com colêmbolos, realizado apenas com o solo ET, não se registaram diferenças significativas entre o solo natural português e o solo LUFA 2.2., no que refere à preferência/evitamento dos mesmos por parte destes organismos (Figura 4).

3.3. Ensaio de reprodução com *Eisenia andrei*

Não foram registadas diferenças significativas no número de juvenis obtidos nos ensaios de reprodução desta espécie, entre o solo ET e o solo LUFA 2.2 ($F=0,0148$; d.f.=18; $p=0,905$) (Figura 5).

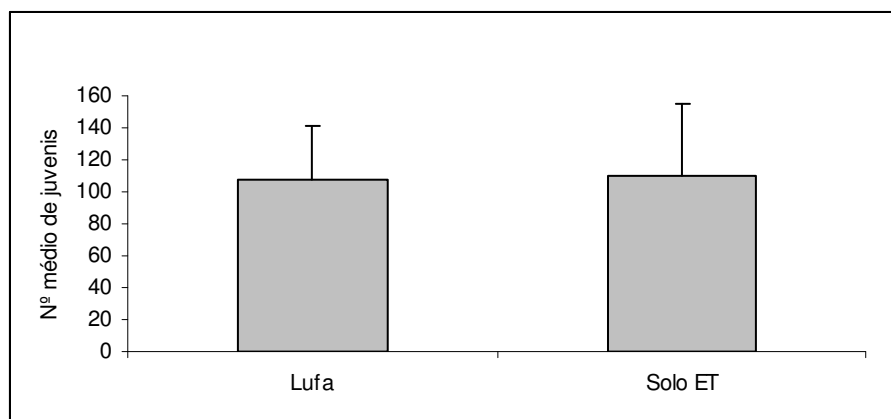


Figura 5. Número médio de juvenis de *Eisenia andrei* registados nos solos Lufa 2.2 e ET, no ensaio de reprodução. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

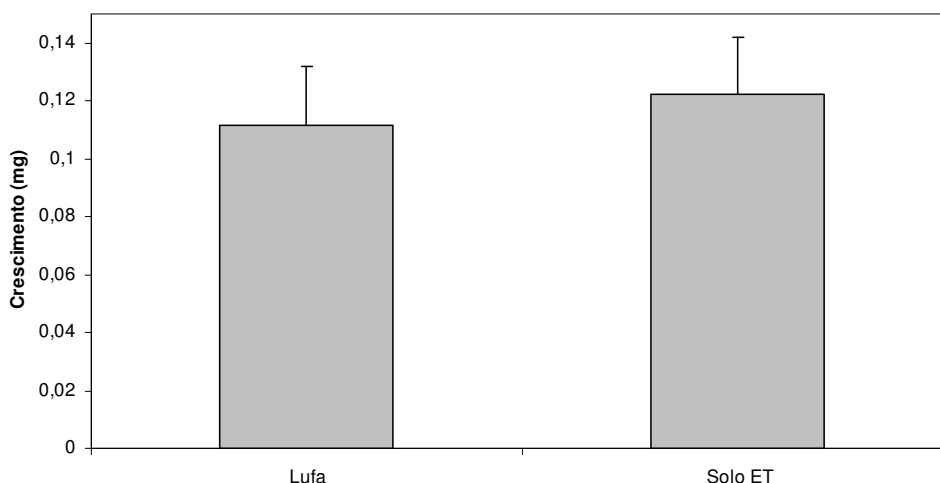


Figura 6. Variação média de peso dos adultos de *Eisenia andrei* expostos ao solo Lufa 2.2 e ao solo ET durante o ensaio de reprodução. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Relativamente ao crescimento dos indivíduos não foram registadas diferenças significativas ($F=0,587$; d.f.=18; $p=0,454$), na variação de peso dos indivíduos expostos a cada um dos solos.

3.4. Ensaio de emergência e crescimento com *Lycopersicon esculentum*

No ensaio de germinação e crescimento de *Lycopersicon esculentum* verificou-se que a taxa de germinação foi relativamente baixa em ambos os solos (Figura 7). A taxa de emergência mais elevada foi registada no solo ET (63,75%). Tal facto parece ter sido devido às condições do lote de sementes, na medida em que não foram registadas diferenças significativas entre solos, no que refere ao número médio de sementes que neles emergiram ($F=0,664$; d.f.=22; $p=0,209$).

No que refere aos outros dois parâmetros avaliados, nomeadamente a produção de biomassa fresca e seca (Figura 8), apenas se registaram diferenças significativas entre solos no que refere ao valor médio da biomassa fresca de *Lycopersicon esculentum* ($F=9,649$; d.f.=22; $p=0,021$), sendo este superior no solo ET. Por oposição não se registaram diferenças significativas entre os valores de biomassa seca produzida em ambos os solos ($F=2,385$; d.f.=22; $p=0,173$).

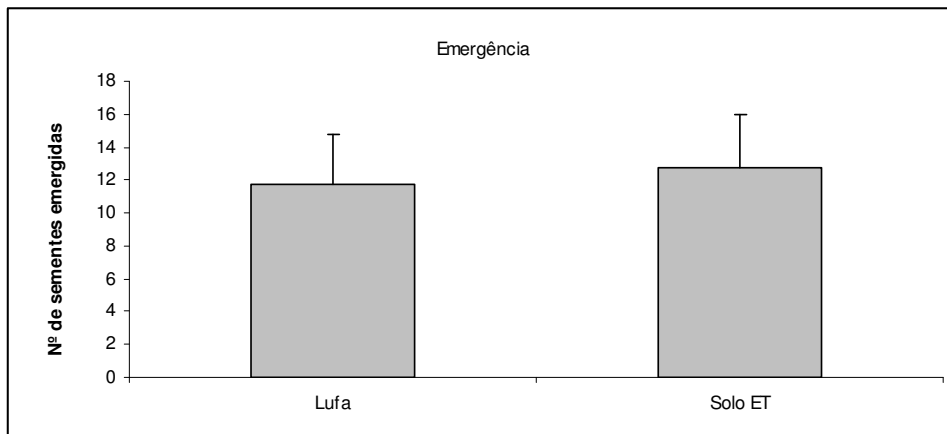


Figura 7. Número médio de sementes de *Lycopersicon esculentum* que emergiram no solo Lufa 2.2 e no solo ET. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

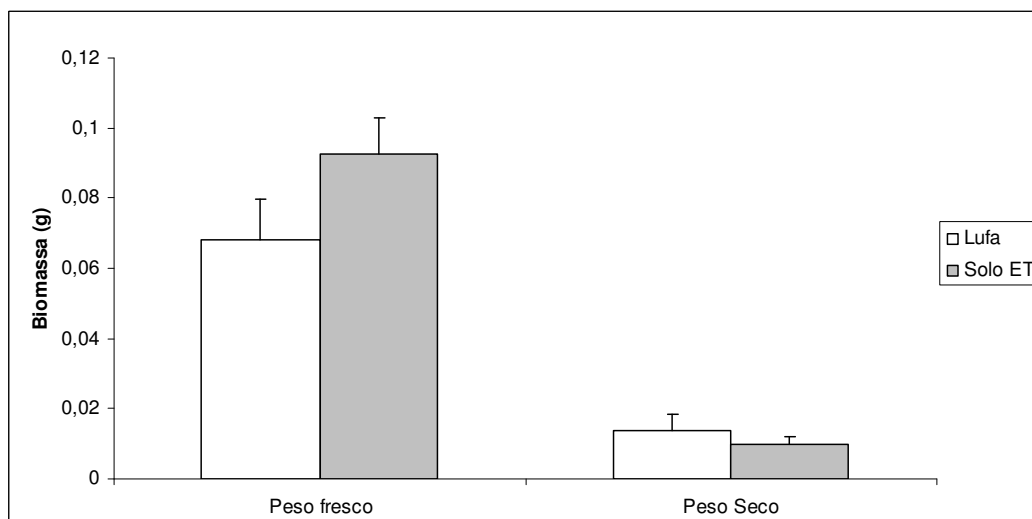


Figura 8. Valores médios de biomassa fresca e seca de *Lycopersicon esculentum* produzida no solo Lufa 2.2 e no solo ET. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

4. Discussão

O tipo de solo e o clima desempenham um papel crucial no destino e distribuição de substâncias químicas. Enquanto que a velocidade de metabolização, o transporte ou a volatilização de um químico depende de factores climáticos (*e.g.*, humidade, temperatura), a mobilidade, a especiação e subsequente biodisponibilidade dependem de factores como a matéria orgânica, o tipo de minerais presentes no solo, o pH ou ainda de factores biológicos como a presença de micorrizas (Oudeh et al., 2002; Van Straalen, 2002; Frische et al., 2003; Renaud et al., 2004 *in* Filser et al. *in press*). Deste modo e como referem ainda Filser et al. (*in press*) torna-se impossível avaliar a perigosidade de uma determinada substância química, para regiões grandes e heterogéneas, como a Europa.

Os ensaios ecotoxicológicos são geralmente utilizados para prever a toxicidade potencial dos compostos, antes destes serem libertados para o meio ambiente, ou para determinar a sua toxicidade relativa quando estão já presentes no ambiente, em áreas contaminadas (Eijsackers, 1993). No que concerne à análise de risco de locais contaminados, os níveis de rastreio para solos (do inglês: *Soil Screening Levels –SSLs*) são uma ferramenta bastante útil para a primeira etapa do processo, em que os valores registados nos solos contaminados são comparados com estes valores de referência, de forma a permitir uma primeira avaliação dos riscos (Weeks e Comber, 2005; Mesman e Jensen, 2006). Contudo, têm-se observado grandes discrepâncias entre os níveis que produzem efeitos em testes laboratoriais, com solos contaminados com soluções de contaminantes, e os níveis que produzem efeitos quando os organismos são expostos a solos recolhidos em locais contaminados, ou mesmo quando esses efeitos são monitorizados no campo (Amorim et al., 2005b; Mesman e Jensen, 2006). Estas discrepâncias resultam muitas vezes da utilização de substratos artificiais nos testes ecotoxicológicos, que limitam largamente a extrapolação para situações reais (Drobne, 1997), resultando muito frequentemente, pelo menos para algumas espécies, numa sobrestimação ou subestimação dos efeitos que realmente ocorrem em condições naturais (Amorim et al., 2005b; Rombke et al. 2006). Deste modo, do ponto de vista ecológico, é de todo recomendável a utilização de solos naturais, nos ensaios ecotoxicológicos com invertebrados (Rombke et al., 2006) e com plantas (van Assche et al., 2000; Gorsuch et al., 2006). Por outro lado, é extremamente importante que cada país, ou região, identifique os

solos naturais, representativos da sua heterogeneidade geológica e que ajuste, ou que determine, os níveis de rastreio, ou os critérios de qualidade, de contaminantes orgânicos e inorgânicos, para cada um desses solos. A transposição de critérios de qualidade para solos, entre países, não é de todo aconselhável, na medida em que a *política ambiental e a legislação* de cada país, além da informação científica existente, influenciam a sua determinação, pelo que os valores obtidos para um mesmo elemento podem ser bastante diferentes (O' Halloran, 2006). Por outro lado, se se considerar elementos de ocorrência natural, como é o caso dos metais, as concentrações de *background naturais*, que resultam dos materiais rochosos que dão origem aos diferentes solos, e o próprio processo de formação (pedogénese), podem conduzir a sobreestimações ou subestimações da contaminação com metais e dos riscos associados (Zhao et al., 2007).

Assim, o presente trabalho teve como objectivo identificar um solo natural para a região centro do país, que possa ser futuramente utilizado com dois propósitos: (i) como solo de referência em ensaios ecotoxicológicos, realizados no âmbito de análises de risco de locais contaminados, e (ii) como substrato para ensaios ecotoxicológicos, realizados com o objectivo de determinar critérios de qualidade ou níveis de rastreio de solos (do inglês: SSLs). Estes valores são de extrema utilidade, na fase inicial dos processos de análise de risco de locais contaminados, dado que permitem identificar áreas de potencial risco que requerem um estudo mais detalhado antes da toma de decisões relativas à sua recuperação (Kuperman e tal., 2004; Fernández et al., 2006). A região centro foi seleccionada, para esta primeira abordagem à identificação de solos naturais portuguesas, pelo facto de nesta região do país, sobretudo no distrito de Viseu e da Guarda, existirem numerosas áreas de exploração de minério radioactivo abandonadas, contaminadas com elevados níveis de metais e de radionuclídeos, cuja mitigação dos impactos no ambiente e na saúde humana, foi considerada uma prioridade pelo Governo Português [Decreto - Lei nº 198-A/2001, de 6 de Julho (ME, 2001)].

Uma vez que a qualidade ecológica de um solo é determinada por propriedades físicas, químicas e biológicas (Römbke e Breure, 2005), a selecção de solos de referência tem que avaliar, não apenas as suas propriedades físico-químicas mas também verificar a sua qualidade como *habitat* para as espécies terrestres, usualmente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos. Este facto resulta das diferentes respostas das espécies a determinadas

propriedades do solo, como a matéria orgânica, a capacidade de retenção da água, o pH, a capacidade de troca catiónica e a taxa carbono/azoto (Amorim et al., 2005b).

Do ponto de vista da caracterização físico-química dos solos naturais estudados, ainda que a mesma tenha que prosseguir, foram já analisados diversos parâmetros, assim como a sua composição química em termos de metais, PCBs e PAHs. Os dois solos portugueses naturais, à semelhança do solo alemão, revelaram ser ácidos. Várias são as causas da acidez apresentada pelos solos estudados. A principal cauda está relacionada com a natureza do material originário, ou seja com a rocha que deu origem ao solo. Os minerais encontrados nos solos são a combinação de minerais herdados da litologia original, que são resultantes dos processos de alteração (Ferreira, 2004). As concentrações dos diversos elementos químicos estão, obviamente, relacionados com a mineralogia dos solos, influenciando, assim, os seus valores de pH (Ferreira, 2004). Ambos os solos estudados foram formados a partir de rochas graníticas plutónicas. Este tipo de rochas apresentam um grande teor de sílica na sua composição, devido à presença de minerais silicatados como o quartzo. A sílica confere às rochas um carácter ácido e, portanto, o solo formado nestas condições apresentará características ácidas. Entre os problemas de um solo ácido destacam-se a menor disponibilidade de alguns nutrientes (especialmente fósforo e molibdénio) e a maior disponibilidade e subsequente toxicidade de outros, como alumínio, ferro e manganês (Ferreira, 2004). De facto, os dois solos apresentaram concentrações bastante elevadas de alumínio e de ferro, além do boro, lítio e urânio, que estiveram presentes acima de critérios de qualidade já disponíveis. A causa para determinados elementos se apresentarem em elevadas quantidades prende-se com a diversidade podológica e/ou geológica existente no nosso país. Os valores de Al apresentados estão fortemente relacionados com as zonas graníticas de onde são provenientes, pois solos derivados de litologias graníticas encontram-se enriquecidas em Al (Ferreira, 2004). Contudo, é sabido que as extracções com ácidos fortes representam o pior cenário, e as concentrações determinadas não são necessariamente indicadoras da ocorrência de efeitos adversos (Peijnenburg et al., 2007).

No que refere aos outros parâmetros físico-químicos avaliados, é de destacar o facto de ambos os solos apresentarem uma percentagem de matéria orgânica bem mais elevada que o solo Lufa 2.2, assim como uma menor capacidade para reter a água, dois aspectos bastante significativos na medida em que diversos autores têm mostrado o

contributo destes, e de outros factores, para alterações na biodisponibilidade dos contaminantes (Dayton et al. 2006, Semenzin et. Al. 2007). A biodisponibilidade de contaminantes em geral, e de metais do solo em particular, está directamente relacionada com a percentagem de matéria orgânica existente na sua matriz. Os metais pesados são fortemente vinculados aos solos ricos em matéria orgânica ou em argila (Sauvé, 2002). Contudo, e já no caso particular do solo ET, verificou-se que a percentagem de argila que o compõe foi reduzida, pelo que este factor poderá contrariar o efeito da matéria orgânica na adsorção de metais.

Do ponto de vista da contaminação com orgânicos persistentes, analisada apenas no solo ET (ver justificação abaixo), os níveis registados, apenas para alguns compostos bifenil policlorados (PCBs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), ficaram muito aquém de níveis de referência reportados. Contudo, e ainda que esta análise tenha que ser complementada, sobretudo para pesticidas, é perfeitamente reconhecida a impossibilidade de se detectarem todos os contaminantes potencialmente presentes. Daí que a realização de ensaios ecotoxicológicos, com este solo natural não contaminado, seja de todo em todo crucial, na medida em que permitem não só detectar efeitos intrínsecos das propriedades físico-químicas do solo, como também das misturas de compostos presentes a baixas concentrações, ou ainda de outros que possam não ter sido detectados pelas metodologias analíticas aplicadas.

Vários ensaios padronizados foram desenvolvidos com diferentes espécies e são, geralmente, usados na análise de risco de locais contaminados, ou para a determinação de SSLs, calculados a partir de curvas de distribuição de sensibilidade das espécies (Jänsch et al., 2007). Deste modo, e para que um solo natural possa ser de vasta utilização, convém que não tenha as suas funções de produção e de *habitat* comprometidas, para as diferentes espécies utilizadas em ensaios padronizados. Limitar a utilização do solo natural para qualquer uma destas espécies, não é de forma alguma conveniente, na medida em que todas têm um papel ecológico relevante (Smith et al., 2006), já que pertencem a grupos taxonómicos e níveis tróficos distintos (Cortet et al. 2000). Para além disso possuem diferentes vias de exposição, o que conduz a que possam responder de forma diferenciada aos níveis de contaminação. Por este motivo, o solo LD foi eliminado à priori, com base nos resultados de evitamento com *Eisenia andrei*, pelo facto de sugerirem que este solo tinha a sua função de *habitat* limitada para esta espécie. Diversos autores têm reportado a

sensibilidade dos ensaios de evitamento, sobretudo para metais, reportando-os como excelentes ferramentas de rastreio na avaliação de solos contaminados (Hund-Rinke *et al.*, 2005; Lukkary and Haimi, 2005; Lukkari *et al.*, 2005). Assim, estes resultados de evitamento serviram de suporte à tomada de decisão, dada a relevância ecológica da espécie em causa. Esta espécie é sensível aos mais diversos químicos, participa na manutenção da fertilidade do solo e tem uma grande capacidade em transferir contaminantes aos níveis tróficos superiores (Spurgeon *et al.*, 2003).

Em contrapartida, no solo ET, os valores obtidos no teste de evitamento, realizado com a mesma espécie (*Eisenia andrei*), verificou-se a preferência dos organismos por este solo, quando comparado com o solo Lufa 2.2. Isto permitiu concluir que este solo apresentava características físicas e químicas, que lhe conferem as qualidades pretendidas para desempenhar as funções de *habitat* para a espécie em causa. A preferência pelo solo natural pode ser explicada pela maior concentração de matéria orgânica que este possui.

Nesta fase de rastreio foram, ainda, realizados ensaios de evitamento com *Falsomia candida*. Segundo Runday e Houx (1996), Achazi *et al.* (1997 *in* Diogo, 2007), os colêmbolos representam um dos mais utilizados grupos de invertebrados na investigação da contaminação antropológica do solo, não só por representarem uma grande proporção de biomassa nos ecossistemas edáficos, como também pelo facto de serem relativamente fáceis de manter em cultura, em laboratório (Crouau *et al.*, 1999; Diogo, 2007). Para além destas características, *F. candida* é altamente sensível à presença de contaminantes (Natal da Luz, 2004), o que os torna seres vivos importantíssimos na análise da toxicidade de um solo. Os resultados obtidos permitiram observar uma distribuição ao acaso dos organismos entre o solo natural ET e o solo Lufa 2.2, indicando que nenhum dos solos foi significativamente evitado. De facto, (Natal da Luz, 2008) observou uma menor sensibilidade de *Folsomia candida* à matéria orgânica e à textura do solo, quando comparada com *Eisenia andrei*. De acordo com estes mesmos autores, a capacidade de troca catiónica parece ser o factor que mais influencia esta espécie.

Os resultados obtidos no teste de reprodução com *Eisenia andrei* vieram, mais uma vez, dar informação que apoia a possível utilização deste solo, como um solo de referência natural para a região centro do país. Este facto baseia-se na ausência de diferenças significativas nos parâmetros avaliados (crescimento e número de juvenis produzidos) entre os organismos expostos ao solo natural português e ao solo de referência alemão Lufa

2.2. Contudo, e uma vez que para a avaliação ecotoxicológica de solos se recomenda uma bateria de ensaios com diferentes espécies, que avaliem os efeitos em diferentes parâmetros (O' Halloran, 2006), preferencialmente sub-letais, estes ensaios foram complementados com ensaios com uma espécie de planta terrestre. Assim, foi possível verificar que, embora a taxa de germinação tenha sido relativamente baixa, o que se atribui ao lote de sementes utilizado, não se registaram diferenças significativas entre os solos relativamente ao número médio de sementes que emergiram e ao valor médio de biomassa seca produzida acima do solo. Considerando que este parâmetro deve receber maior peso na avaliação em detrimento da biomassa fresca, por ser mais estável (ISO, 2005), pode-se considerar que, pelo menos para espécie avaliada, o solo ET não apresenta as suas funções de *habitat* e de produção comprometidas. Mais uma vez esta avaliação deve ser complementada com um maior número de espécies, incluindo monocotiledóneas, de forma a complementar a informação obtida.

5. Conclusão Geral

A escolha de um solo de referência não é um procedimento fácil, pois envolve um conjunto de metodologias que tornam todo o processo moroso, complexo e economicamente dispendioso. Para além disso, estes estudos tornam-se bastante complicados pelo facto da maioria dos solos serem propriedade privada, sendo, por isso, necessárias iniciativas jurídicas e de, muitas vezes, a informação histórica sobre o uso do solo não ser de fácil acesso. Todos estes factores contribuíram, portanto, para a demora na escolha de um solo de referência no nosso país.

Com o presente estudo foi possível seleccionar o solo ET como um possível solo de referência para fins ecotoxicológicos. Para isso contribuíram os resultados obtidos para os parâmetros físico-químicas, a manutenção da sua função de *habitat e produtiva* para as espécies terrestres utilizadas em ensaios ecotoxicológicos, as suas propriedades intrínsecas e as concentrações de alguns metais (Al, Fe, Li e U) estarem acima de critérios de qualidade já estabelecidos noutros países. Por oposição, o solo LD foi retirado da avaliação, na medida em que o ensaio de evitamento com *Eisenia andrei* demonstrou que o mesmo não seria apropriado para a espécie.

No entanto, muito mais haverá a fazer. Os trabalhos futuros deverão desenvolver ensaios com substâncias tóxicas de referência, previamente definidas para cada uma das espécies, para avaliar possíveis alterações na sensibilidade das espécies, induzidas pelas propriedades físico-químicas do solo. Com isto pretende-se validar definitivamente o solo ET, como um dos possíveis solos de referência da região centro/interior do país, para ensaios ecotoxicológicos realizados no âmbito, quer de análises de risco de locais contaminados, quer com o objectivo de determinar critérios de qualidade para solos.

Referências bibliográficas

- Amorim, M.J.B., Römbke, J., Schallnaß, H.J. e Soares, A.M.V.M., 2005a. Effect of soil properties and aging on the toxicity of copper for *Enchytreus albidus*, *Enchytreus luxuriosus* and *Folsomia candida*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (8): 1875-1885.
- Amorim, M.J.B., Römbke, J., Scheffczyk, A. e Soares, A.M.V.M., 2005b. Effect of different soil types on the *Enchytreus albidus* and *Enchytreus luxuriosus* using the herbicide Phenmedipham. *Chemosphere* 61: 1102-1114.
- Banks, M.K., e Schultz, K.E., 2005. Comparison of Plants for Germination Toxicity Tests in Petroleum-Contaminated Soils. *Water, Air and Soil Pollution* 16 (1-4): 211-219.
- Beck, L., Römbke, J., Breure, A.M., e Mulder, C., 2005. Considerations for the use of soil ecological classification and assessment concepts in soil protection. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62:189-200.
- Brodsky, J., Brodesser, J., Bauer, C. e Römbke, J., 1997. The environmental fate of six existing chemicals in laboratory tests. *Chemosphere* 34(3): 515-538.
- Burton, J.G., Batley, G., Chapman, P.M., e Forbes, V.E., 2002. Weight-of-evidence framework or assessing sediment (or other) contamination: improving certainty in the decision-making process. *HumEcol Risk Assess* 8: 1675– 96.
- CEE – Comunidade Económica Europeia. Directiva 93/67/CEE da Comissão, de 20 de Julho de 1993. *Journal Oficial* nº L227. p. 009-0018.
- Chapman, P.M., 1990. The Sediment Quality Triad approach to determining pollution-induced degradation. *Science of Total Environment* 97: 815-825.
- Chapman, P.M., e Hollert, H., 2006. Should the sediment quality Triad become a tetrad, a pentad, or possibly even a hexad. *Journal of Soils and Sediments* 6: 4-8.
- Clevenger, T.E., 1990. Use of sequential extraction to evaluate the heavy metals in mining wastes. *Water, Air and Soil Pollution* 50 (3-4): 241-254.
- Comunicação da comissão ao conselho, ao parlamento europeu, ao comité económico e social europeu e ao comité das regiões, 2006. Estratégia temática de protecção do solo. Bruxelas.

- Cortet, J., Vauflery, A.G., Poinso-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C. e Cluzeau, D., 1999. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology* 35(3): 115-134.
- Crommentuijn, T., Polder, M., Sijm, D., Bruijn, J., e Van de Plassche, E., 2000. Evaluation of the Dutch environmental risk limits for metals by application of the added risk approach. *Environmental Toxicology And Chemistry* 19: 1692-1701.
- Crouau, Y., Chenon, P., e Gisclard, C., 1999. The use of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) for the bioassay of xenobiotic substances and soil pollutants. *Applied Soil Ecology* 12: 113-111.
- Diogo, J.B., Natal-da-Luz, T., Sousa, J.P., Vogt, C., e Nowak C., 2007 Tolerance of Genetically Characterized *Folsomia candida* Strains to Phenmedipham Exposure. A comparison between reproduction and avoidance tests. *Journal of Soils and Sediments* 7 (6): 388–392.
- Drobne, D., 1997. Terrestrial Isopodes – a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(6): 1159-1164.
- Dayton, E.A., Basta, N.T., Payton, M.E., Bradham, K.D., Schroder J.L., e Lanno R.P., 2006. Evaluating the contribution of soil properties to modifying lead phytoavailability and phytotoxicity . *Environmental Toxicology And Chemistry* 25 (3) 719-725.
- EC – European Communities, 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment. Part II. Institute of Health and Consumer Production. European Chemical Bureau. Office for official Publications of the European Communities. EUR 20418 EN/2. L-2985 Luxembourg.
- EC – European Commission, 1994. Commission Regulation n° 1488/94, de 28 de Junho de 1994. *Journal Oficial* n° L161. p. 003-005.
- Eijsackers, H., 1993. Ecotoxicology of soil organisms. Seeking a way in a pitch-dark labyrinth. In M.H. Donker, H. Eijsackers e F. Heimbach eds. *Ecotoxicology of Soil Organisms*. Lewis , Boca Raton, FL. USA.
- Ferreira, M.S.I., 2004. Dados geoquímicos de base de solos de Portugal Continental, utilizando amostragem de baixa densidade. Tese de doutoramento em Geociências. Universidade de Aveiro.

- Fernández, M.D., Cagigal, E., Vega, M.M., Urzelai, A., Babin, M., Pró, J. e Tarazona, J.V., 2005. Ecological Risk Assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 174-184.
- Fernández, M.D., Vega, M.M., e Tarazona, J.V., 2006. Risk-based ecological soil quality criteria for the characterization of contaminated soils. *Combination of Chemical and Biological Tools* 366: 466–484.
- Ferguson, C., Darmendrail, D., Freiek, K., Jensen, B.K., Kasamas, H., Urzelai, A. and Vegter, J. (editors) 1998. *Risk Assessment for Contaminated sites in Europe. Vol.1 Scientific Basis*, LQM Press, Nottingham.
- Ficher, E., Farkas, S., Hornung, E. e Past, T., 1997. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide dimethoate on the Isopode *Porcellio scaber* Latr. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology, Pharmacology & Endocrinology* 116(2): 161-166.
- Filip, Z., 2002. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agriculture Ecosystems and Environment* 88:169-174.
- Filser, J., Koehler, H., Ruf, A., Römbke, J., Prinzing, A., e Schaefer, M., 2007. Ecological theory meets soil ecotoxicology: Challenge and chance. *Basic and Applied Ecology, in press* 9 (4): 333-466.
- Frische, T., e Hoper, H., 2003. Soil microbial parameters and luminescent bacteria assays as indicators for in situ bioremediation of TNT-contaminated soils. *Chemosphere* 50: 415–427.
- Gerrard, J., 2000. *Fundamentals of Soils*. Routledge, London.
- Gorsuch, J., Merrington G., e Welp G., 2006. Assessing risks of metals added to soils in Europe and North America. *Environmental Toxicology And Chemistry* 25 (3): 631-634.
- Hund-Rinke, K., Lindemann, M. and Simon, M., 2005. Experiences with novel approaches in earthworm testing alternatives. *Journal of Soils & Sediments* 5(4): 233-239.
- ISO, 2005. *Soil quality: avoidance test for testing the quality of soils and the toxicity of chemicals – test with earthworms (Eisenia andrei)*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.

- ISO, 2005. Soil quality: determination of the effects of pollutants on soil flora -Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. ISO 11269-2. International Organization for Standardization, Paris.
- Jänsch, S., Römbke, J., Schallnaß e Tertyze, K., 2007. Derivation of Soil Values for the Path 'Soil-Soil organisms' for metals and selected organic compounds using species sensitivity distributions. *Environmental Science and Pollution Research* 14(5): 308-318.
- Kula, H., e Larink, O., 1997. Development and standardization of test methods for the prediction of sublethal effects of chemicals on earthworms. *Soil Biology & Biochemistry* 29: 635-639.
- Kuperman, R.G., Checkai R.T., e Ruth L.M., 2003. A proteome-based assessment of the earthworm *Eisenia fetida*: response to chemical warfare agents in a sandy loam soil *Pedobiologia* 47 (5-6): 617-621
- Lock, K., Because, S., Criel, P., Van Eeckhout, H. e Janssen, C.R., 2004. Ecotoxicity of cobalt to the springtail *Folsomia candida*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology and Pharmacology* 139(4): 195-199.
- Lock, K. e Janssen, C.R., 2003. Influence of aging on copper bioavailability in soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (5): 1162-1166.
- Long, E.R., e Chapman, P.M., 1985. A sediment quality triad: measures of sediment contamination, toxicity and in faunal community composition in Puget Sound. *Marine Pollution Bulletin* 16: 405-415.
- Lukkari, T., Aatsinki, M., Väisänen, A. and Haimi, J., 2005. Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. *Applied Soil Ecology* 30(2): 133-146.
- Lukkari, T. and Haimi, J., 2005. Avoidance of Cu- and Zn-contaminated soil by three ecologically different earthworm species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62(1): 35-41.
- ME - Ministério da Economia, 2001. Decreto-Lei nº 198-A/2001, de 6 de Julho. Diário da República. Suplemento. Número 155. I-Série A: 4084-(2)- 4084(7).
- Mesman, M., Rutgers, M. e Jensen, J., 2006. Using the TRIAD in site specific assessment of contaminated soil. In *Ecological Risk Assessment of Contaminated Land*.

- Decision Support for Site Specific Investigations. Ed. by Jensen, J. e Mesman, M. RIVM report nº711701047.
- Natal da Luz, T., Ribeiro R., e Sousa J.P., 2004. Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. *Environmental Toxicology And Chemistry* 23:2188–2193,
- Natal da Luz, T. Röembke, J. e Sousa, J.P., 2008. Avoidance Tests in Site Specific Risk Assessment – The influence of soil properties on the avoidance response of collembolans and earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(5):1112-1117.
- Newman M.C., Unger, M.A., 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology*. Lewis Publishers.
- O'Halloran, K., 2006. Toxicological considerations of contaminants in the terrestrial environment for ecological risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* 12: 74 - 83
- OCDE - Organisation for Economic Co-operation and Development, 1984. *Earthworms acute, toxicity tests. Guideline 207*. Paris, France. 9 Pp.
- Oudeh, M., Khan, M., e Scullion J., 2002. Plant accumulation of potentially toxic elements in sewage sludge as affected by soil organic matter level and mycorrhizal fungi. *Environmental Pollution* 116 (2):293-300.
- Peijnenburg, W.J.G.M. e Jager, T., 2003. Monitoring approaches to assess the bioaccessibility and bioavailability of metals: matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56: 63-77.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Zablotskaja, M. e Vijver, M.G., 2007. Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 163-179.
- Pereira R., Antunes S.C., Marques S.M, e Gonçalves F., 2008. Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): I Soil chemical characterization. *Science of the Total Environment* 377: 386- 390.
- Pereira, R., Ribeiro, R. e Gonçalves, F., 2004. Plan For An Integrated Human And Environmental Risk Assessment In S. Domingos Mine Area (Portugal). *Human and Ecological Risk Assessment* 10(3): 543-578.
- Röembke, J., e Breure, A.M., 2005. Status and outlook of ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 300-308.

- Röembke, J., Breure, A.M., Mulder, C., e Rutgers, M., 2005. Legislation and ecological quality assessemnet of soil: implementation of ecological indication systems in Europe. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2005; 62: 201-210.
- Röembke, J., Jänsch, S., Junker, T., Pohl, B., e Scheffczyk A., 2006. Improvement of the applicability of ecotoxicological tests with earthworms, springtails and plants for the assessment of metals in natural soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25:776–787.
- Roembke, J., Jänsch, S., Junker, T., Pohl, B., e Scheffczyk, A., 2007. The Effect of Tributyltin-Oxide on Earthworms, Springtails, and Plants in Artificial and Natural Soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 52: 525–534.
- Rooney, C.P., Zhao, F.-J., e McGrath, P., 2006. Soil factors controlling the expression of copper toxicity to plants in a wide range of European soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25 (3): 726-732.
- Sampaio, G., 1988. Flora portuguesa- 3º edição. Instituto Nacional de Invenção Científica. Fac-smile.
- Semenzin, E., Critto, A., Carlon, C., e Rutgers, M., 2007. Development of a site-specific Ecological Risk Assessment for contaminated sites: Part II. A multi-criteria based system for the selection of bioavailability assessment tools. *Science of the Total Environment* 379: 34–45.
- Semenzin, E., Crittoa, A., Rutgersc, M., Marcominia, A., 2008. Integration of bioavailability, ecology and ecotoxicology by three lines of evidence into ecological risk indexes for contaminated soil assessment. *Science of the total Environment* 389:71-86.
- Solomon, K.R., Sibley, P., 2002. New concepts in ecological risk assessment: where do we go from here? *Marine Pollution Bulletin* 44: 279–285.
- SPAC. Soil and Plant Analysis Council— Handbook of Reference Methods. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2000C.
- Suter G.W., Cornaby B.W., Hadden C.T., Hull R. N., 1993. *Ecotoxicological Risk Assessment*.
- Teixeira C. e Gonçalves F., 1980. Introdução à Geologia de Portugal. Instituto Nacional de Invenção Científica. Fac-smile.

- USEPA . United States Environmental Protection Agency. Guidelines for ecological risk assessment, 1998. EPA/630/R-95/002F. Risk assessment forum, Washington, DC.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency— Framework for Inorganic Metals Risk Assessment. 2004. Draft EPA/630/P-04/068B, 20460. Washington DC.
- Van Gestel, C.A.M., Van der Waarde, J.J., Derksen, J.G.M., Van der Hoek, J.J., Veul, MFXW, Bouwens, S., Rusch, B., Kronenburg, R. e Stokman, G.N.M., 2001. The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (7): 1438-1449.
- Van Straalen, N.M., Donker, M.H., Vijver, M.G. e van Gestel, C.A.M., 2005. Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil vertebrates. *Environmental Pollution* 136: 409-417.
- Van Straalen, N.M., 2002. Assessment of soil contamination - a functional perspective *Biodegradation* 13 (1):41-52.
- Vijver, M., Jager, T., Posthuma, L. e Peijnenburg, W., 2001. Impact of metal pools and soil properties on metal accumulation in *Folsomia cándida* (Collembola). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (4): 712-720.
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th Ed. Prentice Hall Inc. Upper Saddle River New Jersey.
- Zhao, F.J., McGrath, S.P., Merrington, G., 2007. Estimates of ambient background concentrations of trace metals in soils for risk assessment. *Environmental Pollution* 148: 221-229.
- Weeks, J.M., Comber, S.D.W., 2005. Ecological risk assessment of contaminated soil. *Mineralogical Magazine* 69: 601-613.