



Número: 368/2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOCIÊNCIAS
ÁREA DE METALOGÊNESE

SERGIO TAGLIAFERRI BOSSO

BIOACCESSIBILIDADE DE CHUMBO DE SOLOS E REJEITOS DE
BENEFICIAMENTO DE MINÉRIO E SUA IMOBILIZAÇÃO COMO FOSFATOS

Tese apresentada ao Instituto de
Geociências como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Orientador: Profa. Dra. Jacinta Enzweiler

CAMPINAS - SÃO PAULO

Janeiro – 2007

**Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca
do Instituto de Geociências/UNICAMP**

B655b Bosso, Sergio Tagliaferri
Bioacessibilidade de chumbo de solos e rejeitos de beneficiamento
de minério e sua imobilização como fosfato / Sergio Tagliaferri
Bosso.-- Campinas,SP.: [s.n.], 2007.

Orientador: Jacinta Enzweiler.
Tese (doutorado) Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Geociências.

1. Química ambiental. 2. Contaminação. 3. Chumbo.
4. Fosfato. I. Enzweiler, Jacinta II. Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Geociências. III. Título.

Título em inglês: Lead bioaccessibility in soils and wastes from smelting activities and
phosphate immobilization.

Keywords: - Environmental chemistry;

- Contamination;

- Lead;

- Phosphate.

Área de concentração: Geologia e Recursos Naturais

Titulação: Doutor em Geociências

Banca examinadora: - Jacinta Enzweiler;

- Elena Mavropoulos;

- Bernardino Ribeiro de Figueiredo;

- Wanilson Luiz da Silva;

- Eduardo Melo de Capitani.

Data da defesa: 31/01/2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOCIÊNCIAS
ÁREA DE METALOGÊNESE

AUTOR: SÉRGIO TAGLIAFERRI BOSSO

BIOACESSIBILIDADE DE CHUMBO DE SOLOS E REJEITOS DE
BENEFICIAMENTO DE MINÉRIO E SUA IMOBILIZAÇÃO COMO FOSFATOS

ORIENTADORA: Profa. Dra. Jacinta Enzweiler

Aprovada em: 31/01/07

EXAMINADORES:

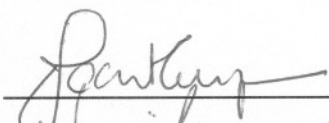
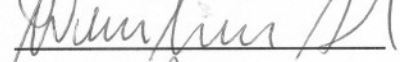
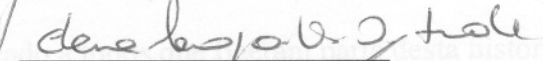
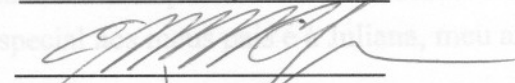
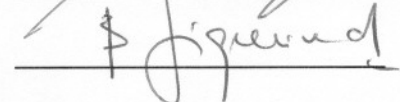
Profa. Dra. Jacinta Enzweiler

Prof. Dr. Wanilson Luiz Silva

Profa. Dra. Elena Mavropoulos Oliveira Tude

Prof. Dr. Eduardo Mello de Capitani

Prof. Dr. Bernardino Ribeiro de Figueiredo

 Presidente





Campinas, 31 de Janeiro de 2007

Sola dosis facit venerum

—Paracelsus

Dedicado a todos que fizeram parte desta história,
em especial aos meus pais e à Juliana, meu amor.

AGRADECIMENTOS

Foram muitos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o andamento deste trabalho nesses 4 anos. A todos sou muito grato. Em especial, agradeço imensamente à Profa. Jacinta, que nesse período foi mais que uma orientadora. Obrigado de coração pela orientação, pela paciência, pela confiança, pela amizade, pelos ensinamentos e pelos exemplos de profissionalismo e dedicação a profissão que levarei comigo pra sempre.

A CAPES, FAPESP e CNPQ pela ajuda financeira.

Agradeço também ao prof. Bernardino, prof. Wanilson e profa. Elena, minha banca de qualificação, tão importantes para a finalização deste trabalho. Obrigado pelos conselhos e sugestões. Agradecimentos extensivos ao prof. Rômulo, que sempre esteve disposto a ajudar nas análises de DRX e nas devidas interpretações. Ao IQ-Unicamp, em especial à Helena, pela ajuda nas análises de AAS. Ao prof. Ronaldo e Wagner, da Puc-Campinas, pelo uso dos laboratórios.

Eternamente grato a Lucia, Aparecida, Rosana e Dailto pela ajuda nos experimentos, no MEV, nas análises químicas e pela amizade sincera.

A Val, a Edinalva e todos aqueles que as ajudam na organização da melhor e mais eficiente secretaria de pós-graduação da Unicamp. Obrigado de coração pelo suporte.

Meu eterno obrigado ao alicerce de tudo. Minha família, sempre presente, até os mais distantes. Pai, mãe e irmã, sem vocês nada disso teria frutificado. Obrigado por tudo. Juliana, meu amor, sem palavras pra agradecer a paciência, principalmente nessa última fase do trabalho, e pelo amor incondicional dedicado a mim.

Aos meus grandes amigos, grandes pensadores e o futuro da ciência brasileira: Rodrigo Dutra, Palma Jr., Zé Paulo Bali-hai, Rafael, Aloísio, William Gama, Bienvenido, Amante, Diego e Juliano Sena, obrigado pelas longas conversas, pela companhia nos congressos e pela amizade sempre presente. Obrigado pela ajuda Dani Beck, Janaína, Sandra, Shirley, Alessandra, Rúbia e Lu Lenhari. Fê Woods, Tati Lilli e Nina Didi, mesmo distantes, vocês foram essenciais. Obrigado pela sincera e eterna amizade.

Agradeço muito a todos pelos momentos vividos, experiências trocadas, lições e conversas sempre muito bem vindas. Pode ser que alguns nomes não constem aqui, mas saibam que trago no coração cada um que fez parte da minha vida nestes 4 anos. Obrigado!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
 Parte 1 – Bioacessibilidade de chumbo de solos e rejeitos de beneficiamento de minério e sua imobilização como fosfatos.....	 1
1.1 Descrição da área e geologia.....	2
1.2 Revisão dos trabalhos realizados na área.....	7
1.3 Contaminação Humana.....	9
1.4 Objetivos.....	24
1.5 Estrutura da tese.....	24
1.5.1 Ensaio para determinar a (bio)disponibilidade de chumbo em solos contaminados.....	24
1.5.2 - Bioacessibilidade do chumbo em solos e rejeitos.....	25
1.5.3 – Redução da bioacessibilidade do Pb nos solos rejeitos por tratamento com fosfatos.....	26
1.6 Referências Bibliográficas.....	28
 Parte 2 - Ensaio para determinar a (bio)disponibilidade de chumbo em solos contaminados: revisão.....	 31
2.1 Introdução.....	31
2.2 Métodos de especiação de chumbo em solos.....	36
2.3 Métodos de extração seletiva.....	37
2.4 Métodos de biodisponibilidade <i>in vivo</i>	38
2.5 Métodos de bioacessibilidade <i>in vitro</i>	42
2.6 Conclusões.....	50
2.7 Referências	51

Parte 3 - Bioacessibilidade do chumbo em solos e rejeitos.....	55
3.1 Bioaccessible lead in soils, slag and mine wastes from an abandoned mining district in Brazil.....	66
3.1.1 Introduction.....	66
3.1.2 Materials and Methods.....	70
3.1.2.1 Sample pretreatment and characterization.....	71
3.1.2.2 Bioaccessibility tests.....	73
3.1.3 Results and Discussion.....	75
3.1.3.1 Chemical and mineral characterization.....	75
3.1.3.2 Bioaccessibility results – Gastric simulation.....	81
3.1.3.3 Gastrointestinal simulation.....	90
3.1.4 References.....	94
 CAPÍTULO 4 - Lead bioaccessibility in soil and mine wastes after immobilization as phosphate phases.....	98
4.1 Introduction.....	98
4.2 Materials and Methods.....	101
4.2.1 Description of the samples.....	101
4.2.2 Sample characterization.....	102
4.2.3 Phosphate immobilization.....	102
4.2.4 Lead solubility evaluation.....	103
4.3 Results and Discussion.....	104
4.3.1 Formation of lead-phosphate phases.....	109
4.3.2 Bioaccessible lead.....	119
4.3.3 Bioaccessible lead after phosphate treatment.....	119
4.4 Conclusions.....	130
4.5 References.....	131
Parte 5 – Conclusões gerais.....	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Detalhe da região do vale do rio Ribeira, entre os estados do Paraná e São Paulo	2
Figura 1.2: Mapa de localização da cidade de Adrianópolis-PR.....	3
Figura 1.3: Mapa de localização da usina Plumbum S.A., na cidade de Adrianópolis, na embocadura da mina de Panelas.....	5
Figura 1.4: Vista da área de entrada da mina do Rocha. À esquerda, pilha de rejeitos de mineração e beneficiamento dos minérios extraídos da mina, que foram processados na pequena estação de flotação que existia no local (2002). À direita, a mesma área, livre dos rejeitos (2004).....	9
Figura 1.5: Vista da bacia de contenção de rejeito de minério da mina do Rocha, para isolar os materiais ricos em chumbo. O material acinzentado é o rejeito rico em chumbo, já recoberto com a camada de solo rico em argilominerais.....	9
Figura 1.6: Principais efeitos do chumbo no organismo humano relacionados com a concentração deste elemento no sangue de crianças e adultos [$\mu\text{g dL}^{-1}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)] – adaptado de Staundinger & Roth (1998).....	13
Figura 1.7: Pilha de rejeitos finos de beneficiamento e separação de minério, localizada às margens da única via de acesso à Vila Mota, município de Adrianópolis/PR.....	17
Figura 1.8: Pilha de rejeitos de escória (cinza escuro) do forno de metalurgia da usina Plumbum, localizada às margens da única via de acesso à Vila Mota.....	19
Figura 3.1: Mapa de localização da coleta das amostras de solos e rejeitos.....	55
Figura 3.2: Raspagem da camada mais superficial do solo para a coleta das amostras de solos compostas (Solo 4).....	57
Figura 3.3: Coleta de amostra composta de solos superficiais às margens da principal via de acesso à Vila Mota (a esquerda). No canto superior direito é possível visualizar uma habitação típica da vila, muito próxima à estrada (Solo 5).....	57
Figura 3.4: Ponto de coleta de amostras de solos superficiais próximo à pilhas de rejeito de mineração e separação mineral (canto inferior esquerdo) e da pilha de escória do forno de metalurgia (Solo 6).....	59
Figura 3.5: Amostra de solo coletada em frente a usina, denominadas Solo 1, 2 e 3 sendo a fração superficial, 1 a 15 cm de profundidade e 15 a 30 cm de profundidade, respectivamente.....	59
Figura 3.6: Vista da estação de tratamento de efluentes da usina Plumbum S.A., localizada à frente da antiga usina (ao fundo), às margens da principal estrada da Vila Mota.....	61
Figura 3.7: Local de coleta da segunda amostra (Solo 7 e 8) pontual de solo (ao fundo).....	61
Figura 3.8: Pilha de rejeitos localizada a frente da usina Plumbum, com sinais de alteração, em verde (amostra Rejeito B). Ao redor da área alterada, o rejeito inalterado coletado (amostra Rejeito A).....	63
Figura 3.9: Detalhe da área com sinais de alteração na pilha de rejeitos localizada à frente da Usina Plumbum (Rejeito B).....	63

Figure 3.10: Waste C and slag pile close to the abandoned smelting plant. The picture was taken at the unpaved road that gives access to the village.....	71
Figure 3.11 Schematic representation of the procedure of bioaccessibility tests, separation and soluble metal quantification methods.....	74
Figure 3.12: SEM image of grains of S1 with a Pb bearing phase (in white). With the EDS spectra, beside Pb, also Ca, Si, Al and Fe were identified.....	79
Figure 3.13: Waste A particle with Pb bearing phase (in white). EDS also shows Si, Al, Ca and Fe.....	79
Figure 3.14: Slag particle with Pb bearing phase (in white), probably a PbO phase, according XRD and EDS analysis.....	81
Figure 3.15: Lead bioaccessible fraction of soils samples, in glycine, pepsin and PBET acidic solutions. Error bar=one standard deviation, with n=4 for all samples in glycine and pepsin tests, n=3 for PBET tests. *SRM refers to SRM 2710.....	83
Figure 3.16: Lead bioaccessible fraction in waste and slag samples, in glycine, pepsin and PBET acidic solutions. Error bar=one standard deviation, n=3 (Waste A and B); n=4 (Waste C and slag).....	86
Figure 3.17: Lead bioaccessible fraction in lead minerals and synthetic salts, in glycine, pepsin and PBET acidic solutions. Error bar=one standard deviation, n=3 for glycine and pepsin tests and n=2 for PBET test.....	88
Figure 3.18: Percentage of lead from selected samples, which remains in solution when the acid gastric solution is neutralized to pH~7 with sodium bicarbonate solution, for glycine and pepsine solutions, and by sodium bicarbonate, bile and pancreatin addition for PBET...	90
Figure 4.1: SEM images of particles of Soil A and B and Waste A and B. Soil A and B show lead (in white) on the surface of other minerals. The particle of Waste A is lead oxide and Waste B shows a lead phase encapsulated by a carbonate mineral, possibly a calcite.....	107
Figure 4.2: SEM image of particles of Soil A and EDS spectrum showing Pb-P phase association (in white) in a soil particle after 6 months treatment with super phosphate (SP6) (bar=100 µm).....	111
Figure 4.3: SEM image of particles of Soil B and EDS spectrum showing Pb-P phase association (in white) in a soil particle after SP6 treatment (bar= 200 µm).....	111
Figure 4.4: SEM image of Waste B sample and EDS spectrum showing Pb-P (in white) association and the incipient formation of needles, after SP6 treatment (bar= 50 µm).....	113
Figure 4.5: SEM image of Waste A particles with typical habit of pyromorphite-like minerals and EDS spectrum showing Pb-P (in white), NaP6 treatment (bar= 50 µm).....	113
Figure 4.6: SEM image of Waste A particles with typical habit of pyromorphite-like minerals and EDS spectrum showing Pb-P (in white), SP6 treatment (bar= 20 µm).....	115
Figure 4.7: SEM image of Waste A particles, after PR6 treatment, with typical habit of pyromorphite-like minerals and EDS spectrum showing Pb-P (in white), (bar= 20 µm).....	115

Figure 4.8: Elemental map chart (EDS) and electron backscattering (BS) image of a grain of Waste A showing the association between Pb-P-Cl in a Pb bearing phase after 6 months of treatment with superphosphate.....	117
Figure 4.9: Bioaccessible Pb fraction in Soil A after each P-compound treatment, compared to the untreated sample (control).....	121
Figure 4.10: Bioaccessible Pb fraction in Soil B after each P-compound treatment, compared to the untreated sample (control).....	123
Figure 4.11: Bioaccessible Pb fraction in Waste A after each P-compound treatment, compared to the untreated sample (control).....	125
Figure 4.12: Bioaccessible Pb fraction in Waste B after each P-compound treatment, compared to the untreated sample (control).....	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Constantes de estabilidade de alguns minerais de Pb encontrados em solos (adaptado de Hettiarachchi & Pierzinsky, 2004).....	23
Tabela 2.1. Tipo de ocorrência do Pb, fórmula química e produtos de solubilidade dos minerais e a biodisponibilidade.....	35
Tabela 2.2 Principais métodos de bioacessibilidade, tipo de experimento, constituintes das soluções simuladas, pH e tempo de contato de cada simulação. Todos testes são executados em temperatura controlada (37 °C), na proporção sólido:líquido (S/L) indicada. O último (TIM) é realizado em fluxo.....	49
Tabela 2.3: Comparação de resultados de bioacessibilidade de Pb (valores mínimos e máximos) obtidos em solos contaminados, suas respectivas concentrações e método utilizado.....	50
Tabela 3.1: Elementos-traço determinados por FRX nas amostras de solos e rejeitos coletados na Vila Mota (Adrianópolis/PR).....	65
Table 3.2: Soil (S1-S8), waste and slag samples total Pb concentration, the distance from the former plant, a short description and main minerals phases detected by XRD.....	76
Table 4.1 Total lead concentration (% m/m) determined by XRF, lead dissolved by aqua regia (% m/m), a description of each sample and main phases identified by XRD.....	104
Table 4.2: Bioaccessible lead fraction in gastric (pH 1.7) and duodenal (pH 6.9) simulated conditions of selected samples before P treatment.....	119

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOCIÊNCIAS

ÁREA DE METALOGÊNESE

**Bioacessibilidade de chumbo de solos e rejeitos de beneficiamento de minério e sua
imobilização como fosfatos**

RESUMO

Tese de Doutorado

Sergio Tagliaferri Bosso

Os 50 anos de extração e beneficiamento de minérios de chumbo, em Adrianópolis (PR), geraram uma grande quantidade de rejeitos, parte dos quais ainda se encontra disposta nas imediações da refinaria que existia na localidade. Solos da área acumularam chumbo e apresentam concentrações anômalas deste elemento. A ingestão acidental de solos contaminados por chumbo, e de poeiras deles derivadas, é considerada a principal rota para a absorção de Pb, especialmente para crianças, que têm mais contato com solos e também por características do seu organismo, são mais suscetíveis que adultos aos efeitos adversos do chumbo. Em outros estudos, realizados com a população local, um número significativo de crianças e adultos apresentou concentrações de Pb no sangue acima dos valores recomendados, porém a rota de absorção não foi estabelecida. Sabe-se que a biodisponibilidade depende das fases em que o Pb se encontra e não apenas da sua concentração total, e que a fração bioacessível, isto é, solúvel em condições gastro-intestinais, permite inferir sobre os riscos que os materiais apresentam. Neste trabalho, oito amostras de solos ([Pb]= 0,04 – 4,1% m/m) e quatro de rejeitos ([Pb]= 1,2 - 15 % m/m) da área foram usadas para estimar a bioacessibilidade do Pb em pH=1,5 (estômago) e pH=7 (intestino). Em três testes diferentes, o Pb de todas amostras de solos e de três rejeitos apresentou elevada solubilidade (50-90%) nas soluções de simulação gástrica e bem menor (2-22%) nas de simulação intestinal. Nas amostras de solos, nenhuma fase de Pb foi identificada por difração de raios X, mas nos rejeitos havia óxidos de Pb, cerussita e lanarkita, que se caracterizam pela solubilidade em meio ácido, mas a presença de outras fases não pode ser descartada. As mesmas fases foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), tanto nos solos como nos rejeitos. O Pb de uma das amostras de rejeito é menos solúvel (~ 20% em meio ácido) e nela foram identificados, entre outras fases, plumbogumita e plumbojarosita, que são menos solúveis. Amostras de dois solos e dois rejeitos foram colocados em contato com três materiais fosfatados (dihidrogenofosfato de sódio, superfosfato e rocha fosfática), com o objetivo de transformar as fases de Pb mais solúveis em fosfatos de Pb, que são menos solúveis. A bioacessibilidade do Pb após tratamentos por 1, 3 e 6 meses foi reduzida em 90% em pH ácido. Na análise elementar dos produtos formados, realizada no MEV, foi possível identificar a associação de Pb com P em vários grãos, principalmente nos rejeitos com maior teor de Pb. Estes resultados indicam que a aplicação direta de compostos fosfatados aos solos contaminados pode ser uma alternativa para diminuir a biodisponibilidade do Pb nesses materiais.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOCIÊNCIAS
ÁREA DE METALOGÊNESE**

**Lead bioaccessibility in soils and wastes from smelting activities and phosphate
immobilization**

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

Sergio Tagliaferri Bosso

The extraction and refining of lead ores in Adrianópolis (Paraná state, Brazil) for approximately 50 years produced a large amount of wastes, from which part is disposed nearby the former plant. As a consequence of lead processing, Pb has accumulated in soils of the area, which present anomalous concentrations of this element. The incidental ingestion of lead contaminated soils, and derived dusts, is considered as the main route for Pb absorption, specially for children, because they usually have more contact with soils and due to characteristics of their organisms, they are more susceptible to the adverse effects of Pb than adults. In other studies with local population, it was shown that a significant number of children and adults had Pb blood levels above recommended values.

It is known that bioavailability depends on Pb speciation rather than just on total concentration, and that the risks presented by the materials can be inferred measuring bioaccessible fraction, i.e., soluble in gastric-intestinal conditions. In this work, eight samples of soils ([Pb]= 0.04 – 4.1% m/m) and four of wastes ([Pb]= 1.2 - 15 % m/m) from the area were used to estimate bioaccessibility of Pb in pH=1,5 (stomach) e pH=7 (intestine). In three different tests, lead from all soil samples and from three wastes presented high solubility (50-90%) in gastric condition and much lower (2-22%) for intestinal conditions. None Pb phase was identified by X-ray diffraction in soil samples, but wastes contain were Pb oxides, cerussite and lanarkite, which are characterized by solubility in acid media, but the presence of other phases cannot be precluded. The same phases were observed by scanning electron microscopy (SEM) in soils and in wastes. One waste had less soluble Pb (~ 20% in acid pH). In this sample, among other phases, plumbogummite e plumbojarosite, which are less soluble, were identified. Two of the soils and of the wastes were put in contact with three phosphatic materials (sodium dihydrogen phosphate, super phosphate and phosphatic rock), to transform the more soluble Pb phases into Pb-phosphates, which are less soluble. The bioaccessible fraction of Pb in the products, measured after 1, 3 and 6 months of treatment, was reduced in up to 90% in acidic pH. With elemental analysis of the products, by EDS-SEM, association between Pb and P was observed in several grains, specially in wastes with higher lead content. These results suggest that the direct application of phosphatic compounds on the contaminated soils could decrease the Pb bioavailability of these materials.

Parte 1.

BIOACESSIBILIDADE DE CHUMBO DE SOLOS E REJEITOS DE BENEFICIAMENTO DE MINÉRIO E SUA IMOBILIZAÇÃO COMO FOSFATOS

A mineração de bens metálicos sempre exerceu um papel fundamental para o desenvolvimento da maior parte das sociedades e civilizações. O homem deu início à exploração do seu ambiente na busca por metais na transição entre o Paleolítico e o Neolítico. Essa atividade manteve-se ao longo da história e, atualmente, milhões de toneladas de metais são extraídas de depósitos minerais e processadas para suprir às necessidades do homem moderno.

Ao extrair os bens minerais desejados, o homem também produz alguns efeitos adversos tanto ao meio ambiente quanto a si próprio, direta e indiretamente. A abertura de trincheiras, lavras a céu aberto, cavas e minas subterrâneas, são alguns exemplos de alterações físicas do ambiente provocadas pela mineração de bens metálicos. Por outro lado, os efeitos adversos ocasionados pelas atividades de separação, refino e beneficiamento dos minerais de minério efetuados sem os cuidados requeridos, podem ser mais devastadores que a etapa de exploração, especialmente se o bem explotado for um metal que apresente toxicidade, como o chumbo (Pb), cujo acúmulo no organismo pode causar a morte.

Populações anteriores à era Cristã, como os chineses e fenícios, já utilizavam o chumbo, mas os primeiros registros de reações adversas derivadas do uso deste metal foram descritos apenas no império romano, onde o chumbo era utilizado em encanamentos e em recipientes para bebidas, como o vinho, entre outros usos. Ao longo dos séculos, compostos de chumbo foram largamente usados como conservantes e adoçantes de vinhos. Por outro lado, não era incomum a prescrição de compostos de chumbo para o tratamento de cólicas, por exemplo (Cláudio *et al.*, 2004).

Casos de contaminação de trabalhadores ligados à produção de chumbo e de produtos que contêm este metal, que devido à exposição crônica desenvolvem doenças ocupacionais, foram detectadas e documentadas nos séculos XIX e XX (Jaworski *et al.* 1987).

Usinas de beneficiamento de bens metálicos, operadas sem os requisitos de segurança apropriados, podem ser fontes de contaminação para pessoas que vivem em seu entorno. A emissão fumos metálicos, produzidos durante o processamento metalúrgico do minério e o acúmulo de rejeitos de mineração e de beneficiamento, indevidamente estocados, podem

contribuir direta e significativamente para a contaminação crônica de pessoas, com consequências à saúde pública.

No Brasil, estudos de saúde pública relacionados à exposição ao chumbo são escassos e pouco difundidos (Paoliello and De Capitani, 2005), sendo mais conhecidos e estudados apenas os casos de Santo Amaro da Purificação, na Bahia (Silvany-Neto *et al.*, 1996, Anjos, 2003) e do Vale do Ribeira, entre os estados de São Paulo e Paraná (Paoliello *et al.*, 2002, Cunha, 2003). Nos dois casos, atividades de mineração e refino de chumbo foram responsáveis por prováveis emissões atmosféricas, nunca monitoradas, e pela produção de rejeitos tanto de mineração quanto de beneficiamento. Devido à falta de cuidado no manejo e na disposição desses materiais, como o uso de filtros nas chaminés e bacias impermeáveis de deposição dos rejeitos, a população local foi cronicamente exposta ao chumbo durante décadas.

1.1 Descrição da área e geologia

A região do vale do rio Ribeira (Figura 1.1) foi nacionalmente conhecida como grande produtora de Pb primário no Brasil, com seus veios de Pb descritos desde o fim do séc. XVIII (Daitx, 1996). A primeira jazida, a mina de Furnas, porém, só foi explorada comercialmente a partir de 1919, com sua produção sendo totalmente exportada para a Espanha, já que não havia instalações capazes de beneficiar o minério extraído no local.

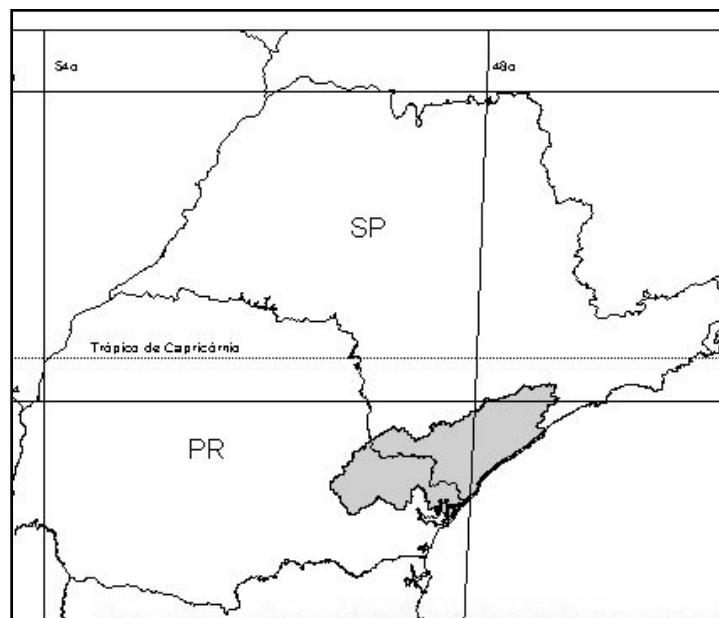


Figura 1.1: Detalhe da região do vale do rio Ribeira, entre os estados do Paraná e São Paulo.

Outra jazida, a mina de Panelas, localizada no município de Adrianópolis (Figura 1.2), estado do Paraná, começou a ser explorada comercialmente a partir de 1938, e foi considerada, até o seu fechamento, como a maior jazida de chumbo da região. Nas décadas de 40 e 50, outras minas foram sendo descobertas, exploradas e explotadas, como as minas do Rocha, Perau, Canoas e Barrinhas.

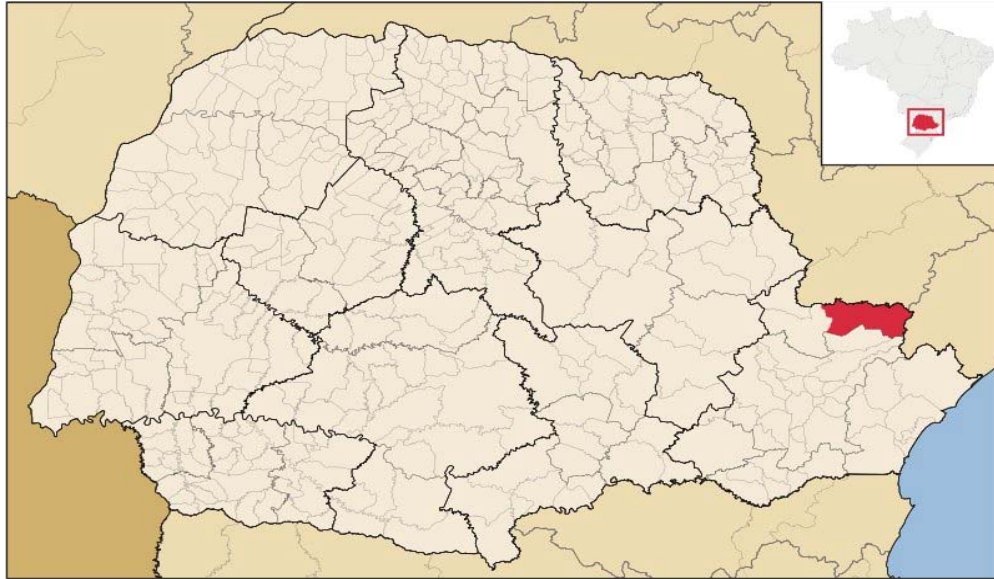


Figura 1.2: Mapa de localização da cidade de Adrianópolis-PR.

Estudos detalhados da geologia regional e da paragênese das jazidas minerais do vale do rio Ribeira foram realizados, dentre eles destacam-se os trabalhos de Fleischer (1976), Barbour (1990), Campanha (1991) e Daitx (1996).

A região do vale do Ribeira está inserida na Faixa Ribeira, caracterizada por falhas e zonas de cisalhamento (Barbour, 1990, Campanha, 1991) onde predomina o embasamento do Maciço Joinville, com o Complexo Costeiro (Arqueano) e com o Complexo Gnáissico Migmatítico (Paleoproterozóico). Sobre este embasamento se situa uma faixa de dobramentos com rochas supracrustais meso a neoproterozóicas, o Supergrupo Açungüi (Shepherd, 2006). Na região ainda há intrusões graníticas, compostas por batólitos e corpos menores, com contatos geralmente tectônicos ou intrusivos com as rochas encaixantes. Subdividido em diversos grupos (Moraes, 1997), o Supergrupo Açungüi apresenta mineralizações de chumbo apenas no Subgrupo Lajeado e na Formação Perau.

Em relação às jazidas de chumbo e sua paragénese, Fleischer (1976) e Daitx (1996)

sugerem dois tipos principais de jazimento, denominados tipo Perau e tipo Pannels. Hospedados na Formação Perau, os minerais singenéticos de chumbo do tipo Perau estão associados a formações ferríferas e baritíferas, são concordantes com a rocha encaixante e apresentam galena (PbS), pirita (FeS₂), esfalerita (ZnS), pirrotita (FeS), calcopirita (CuFeS₂) e barita (BaSO₄) como principais minerais de minério (Cunha, 2003). A mineralização do tipo Pannels, no Subgrupo Lajeado é epigenética, disposta em lentes ou veios com controle litoestrutural e discordantes dos calcários e dolomitos encaixantes. Os principais minerais são a galena, pirita, esfalerita, calcopirita e sulfatos de antimônio (Daitx, 1996, Cunha, 2003). A associação mineralógica encontrada em quase todas as jazidas do vale do Ribeira é descrita por Cunha (2003). Além da galena, os principais minerais de chumbo encontrados são a anglesita, a cerussita e a piromorfita.

A presença de jazidas de minerais de minério de Pb-Zn-Ag, e seu grande potencial econômico exploratório, ensejaram o início da construção de uma usina de beneficiamento de Pb em 1943, a poucos metros da embocadura da mina de Pannels (Figura 1.3). Em 1945, a empresa Plumbum S.A., iniciou as atividades de beneficiamento de todo o Pb extraído no vale do Ribeira, e até 1954, todo o minério de chumbo explotado no Brasil era processado por essa planta de refino (Moraes, 1997).

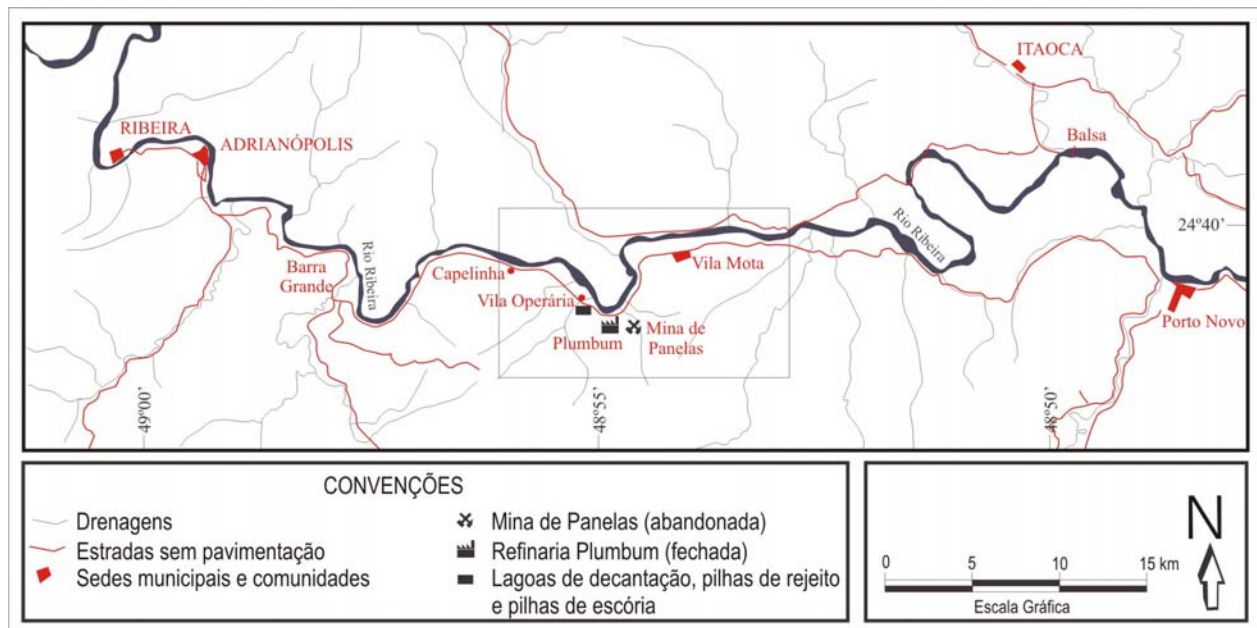


Figura 1.3: Mapa de localização da usina Plumbum S.A., na cidade de Adrianópolis, na embocadura da mina de Pannels.

Nas décadas seguintes, não só minério da região do Vale do Ribeira foi processado.

Concentrados de Pb importados dos EUA, Peru, Bolívia, Chile, Colômbia e Argentina foram beneficiados nas instalações da Plumbum S.A. Entre os anos de 1975 e 1988, cerca de 395000 t de concentrados de Pb foram importadas. Estima-se que somente das minas do vale do Ribeira, cerca de 2350000 t de minério foram extraídas, com uma produção final de 165000 t de Pb (Daitx, 1996).

1.2 Revisão dos trabalhos realizados na área

As atividades de mineração e metalurgia, além dos produtos desejados, foram responsáveis também por um grande impacto sócio-ambiental, e um passivo ambiental bastante preocupante na região. Desde o início das operações de refino de Pb pela Plumbum, a maior parte dos resíduos era lançada diretamente no rio Ribeira, principal rio da região e que abastece populações ribeirinhas e cidades ao longo do seu curso. Só a partir de 1991 os resíduos sólidos, tanto da mineração quanto do beneficiamento, começaram a ser empilhados em bacias de contenção, dispostas a céu aberto nas cercanias da antiga usina (Cassiano, 2001) e como tal se encontram até hoje.

Entre os anos de 1983 e 1996, em duas estações de monitoramento da qualidade de água, as águas do rio Ribeira apresentaram, em algumas épocas, concentrações de Pb até 8 vezes acima do permitido pela legislação brasileira, para esse tipo de corpo d'água ($0,03 \text{ mg L}^{-1}$, CONAMA, 1986). Conforme Moraes (1997), concentrações anômalas, também reportadas por Eysink *et al.* (1988), foram detectadas apenas entre os anos de 1986 e 1992. Nos últimos anos, a concentração de chumbo na água do Rio Ribeira se manteve abaixo dos limites estabelecidos (Lopes Jr., 2005).

A solubilidade de espécies iônicas de chumbo em águas é fortemente controlada pelo pH do meio. Em águas ácidas, as espécies solúveis predominantes são Pb^{2+} , $\text{PbSO}_4(\text{aq})$ e PbCl^+ , em ordem decrescente de concentração. A partir de pH 6, a concentração dessas espécies diminui e $\text{PbCO}_3(\text{aq})$, PbOH^+ tornam-se as principais espécies em solução (Claudio *et al.*, 2004). Em águas naturais, cujo pH geralmente está na faixa de 5-8, muito pouco Pb permanece solúvel. Dependendo da concentração de chumbo e da composição do meio, a especiação prevê a precipitação do chumbo, caso o produto de solubilidade de alguma fase sólida seja superada, ou a adsorção e/ou a complexação por materiais em suspensão, principalmente na fase coloidal, dentre eles a matéria orgânica. Moraes (1997), ao avaliar o transporte de chumbo e metais associados nos sedimentos do rio Ribeira, observou que entre 1983 e 1994, as águas deste rio apresentaram

pH médio de 7,4, o qual as caracteriza como levemente alcalinas e, conseqüentemente, sem tendência a conter chumbo na forma solúvel, detectável por técnicas analíticas comuns.

Por outro lado, os sedimentos podem apresentar informações relevantes sobre a presença anômala de chumbo. Moraes (1997), que quantificou o chumbo nos sedimentos em pontos distribuídos por toda a extensão do rio Ribeira, obteve concentração de Pb em sedimentos de corrente até 50 vezes superiores ao valor de background da região (16 mg kg^{-1}). Ferreira (1994), em estudo na mina do Rocha, demonstrou que o chumbo transportado pelo ribeirão do Rocha, um afluente do rio Ribeira, era proveniente dos rejeitos, constituídos principalmente de partículas finas ($< 2 \text{ }\mu\text{m}$). Moraes (1997) comparou as assinaturas isotópicas dos minerais de Pb da região, com as assinaturas do Pb presente nos sedimentos, e concluiu que a maior parte do Pb nos sedimentos teve como fonte os rejeitos estocados às margens do rio. Moraes (1997), também demonstrou que a concentração de Pb nos sedimentos decresce com a distância em relação à área de mineração e beneficiamento (Alto Vale), e volta a níveis normais ($\sim 26 \text{ mg kg}^{-1}$) perto da sua foz, em Iguape.

Cassiano (2001), em trabalho de avaliação da contaminação das águas pelos rejeitos da mina do Rocha, propõe que o material rico em Pb seja removido para o interior das minas desativadas. Esta ação provavelmente seria muito dispendiosa e não prevê transformações minerais e lixiviação do metal, que poderiam eventualmente contaminar a água subterrânea. Outro método citado por Cassiano (2001) foi o isolamento do material em aterros projetados para conter resíduos tóxicos. Durante trabalho de campo executado em 2004, observou-se que todo o rejeito estava sendo removido do local de estocagem, como pode ser visto na Figura 1.4 e depositado conforme sugerido por Cassiano (2001). As bacias de contenção, de aproximadamente 5 m de profundidade, são previamente preparadas para evitar percolação de água e lixiviação do material rico em Pb para camadas inferiores do solo, lençóis e cursos d'água, e recebem o material em camadas, que por sua vez são recobertas com solo rico em argilominerais (Figura 1.5). O local do aterro provavelmente será utilizado como área de reflorestamento.



Figura 1.4: Vista da área de entrada da mina do Rocha. À esquerda, pilha de rejeitos de mineração e beneficiamento dos minérios extraídos da mina, que foram processados na pequena estação de flotação que existia no local (2002). À direita, a mesma área, livre dos rejeitos (2004).



Figura 1.5: Vista da bacia de contenção de rejeito de minério da mina do Rocha, para isolar os materiais ricos em chumbo. O material acinzentado é o rejeito rico em chumbo, já recoberto com a camada de solo rico em argilominerais. A profundidade da vala é de aproximadamente 5 metros.

1.3 Contaminação humana

Apesar de não ser carcinogênico como outros elementos-traço (p.ex., As, Cd e Cr), o Pb causa efeitos principalmente ao sistema nervoso central do organismo afetado. Em casos de contaminação aguda, além da hipersensibilidade nas mucosas e estômago, o chumbo causa fortes

dores abdominais, diarreia, compromete o funcionamento dos rins, altera o funcionamento do

sistema nervoso central e conduz ao coma e à morte em casos de contaminação extrema (Figueiredo, 2000). Em casos de contaminação crônica, quando pequenas quantidades de Pb são absorvidas constantemente por longos períodos de tempo, o Pb pode causar abortos espontâneos e retardamento mental do feto cuja mãe foi exposta ao Pb. Em crianças em idade escolar, consideradas as mais suscetíveis à contaminação por chumbo, os principais sintomas são déficit no aprendizado, anemia e danos cerebrais. Nos adultos, disfunções renais e intestinais são geralmente relacionadas à contaminação por Pb (Moreira and Moreira, 2004). A Figura 1.6 apresenta os principais efeitos causados pelo Pb no organismo de acordo com a dose deste metal no sangue, em crianças e em adultos.

O chumbo que chega à circulação sanguínea, e que efetivamente causa as reações descritas acima, é absorvido a partir de materiais contaminados e acessíveis para ingestão ou inalação, seja diretamente do ar ou presente em alimentos e bebidas contaminados com micropartículas de Pb, imperceptíveis a olho nu (Paoliello and Chasin, 2001). O mecanismo de absorção do Pb via inalação dá-se pela deposição das partículas de compostos de Pb, presentes no ar, nos sacos alveolares do pulmão humano, com posterior solubilização do Pb e absorção pelo sistema circulatório. Essa é a principal via de contaminação em trabalhadores expostos, ocasionando uma contaminação ocupacional crônica (Moreira e Moreira, 2004).

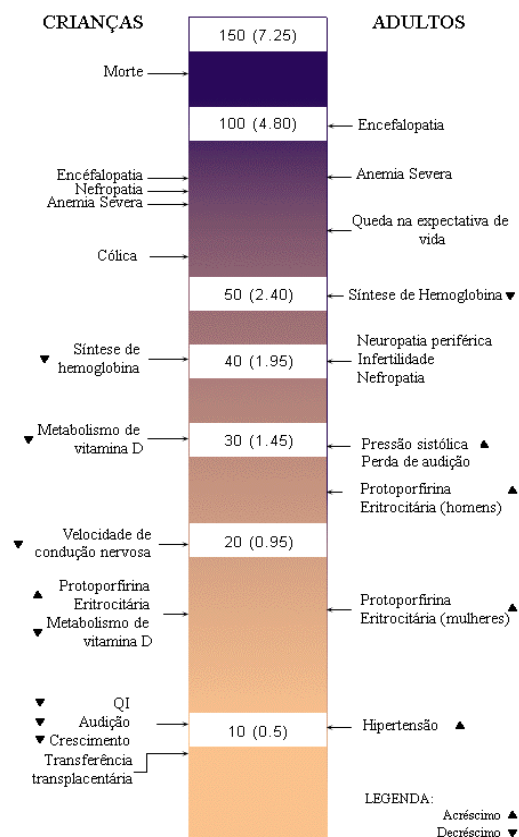


Figura 1.6: Principais efeitos do chumbo no organismo humano relacionados com a concentração deste elemento no sangue de crianças e adultos [$\mu\text{g dL}^{-1}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)] – adaptado de Staundinger and Roth (1998).

A ingestão de partículas ou alimentos com chumbo também é uma via importante de contaminação de pessoas e animais expostos a materiais ou produtos ricos neste metal. A taxa de absorção é bastante variável, pois depende da dieta do indivíduo, estado nutricional e principalmente da espécie química do Pb presente no material contaminado, ou seja, seu estado de oxidação, sua fórmula empírica e sua estrutura molecular (Brown *et al.*, 1999). Estima-se que, em média, 30% do Pb ingerido é absorvido no epitélio gastro-intestinal (EPA, 2002), mas se a ingestão ocorrer logo após períodos de jejum, a quantidade de Pb absorvido pelo organismo pode aumentar significativamente (WHO, 1995). Pessoas, principalmente na fase infanto-juvenil, com deficiência em ferro e cálcio, devido à dieta irregular, também apresentam maior absorção de Pb, pois Fe, Ca e Pb competem entre si em algumas reações metabólicas importantes, como na síntese de hemoglobina e na formação dos ossos (Moreira e Moreira, 2004). O mecanismo de

absorção pelo trato digestivo é praticamente o mesmo da absorção por inalação, porém as reações de solubilização do Pb no interior do estômago e a absorção pelo duodeno já são bastante conhecidas e discutidas na literatura (Oomen *et al.*, 2003a, b).

O município de Adrianópolis, mais precisamente a Vila Mota, passou por um declínio socioeconômico após a exaustão das jazidas minerais, no início dos anos 80, e a maior parte da população local é carente em recursos financeiros e não é atendida por infra-estrutura básica, como saneamento, cobertura asfáltica e tratamento de esgoto doméstico. A região do vale do rio Ribeira foi considerada como uma das menos desenvolvidas do país (Cunha, 2003), onde a população vive em condições abaixo do nível aceitável, principalmente na alimentação.

A concentração média de Pb na crosta terrestre é baixa, cerca de 17 mg kg^{-1} (Wedepohl, 1995), porém concentrações maiores podem ser encontradas naturalmente em localidades onde há jazimentos de minerais de Pb ou quando há contaminação antrópica do meio, causada por atividades industriais, como é o caso da região de estudo. Atividades vulcânicas também contribuem para emissões naturais de Pb, porém a contaminação mais significativa é aquela que acontece em decorrência de atividades humanas (WHO, 1995).

Mineração, metalurgia, processamento, uso, reciclagem, transporte e disposição de compostos de Pb contribuem enormemente para o aumento da concentração desse elemento nos solos. Em outros países, como nos EUA, o uso do tetraetil chumbo como aditivo na gasolina e dos compostos de chumbo como pigmento em tintas residenciais, contribuiu para o aumento nos níveis de Pb em solos urbanos (WHO, 1995), porém o uso de chumbo para essas finalidades não é mais permitido. Paollielo and De Capitani (2005) mostram que os níveis de chumbo no ar das grandes cidades é diretamente proporcional a concentração de Pb na gasolina. No Brasil, com a obrigatoriedade do uso do álcool anidro como aditivo na gasolina desde a década de 80, a adição do Pb não foi mais necessária (Cunha, 2003).

Materiais sólidos ricos em Pb emitidos e transportados por via atmosférica, por sua vez, também podem ser depositados sobre solos. Nestes, o acúmulo de Pb ocorre principalmente nos horizontes mais superficiais, uma vez que o chumbo apresenta grande afinidade pelas frações orgânicas e de argilominerais, que geralmente compõem a camada mais superficial do solo (Claudio *et al.*, 2004). Alguns fatores podem contribuir para aumentar ou diminuir a mobilidade do Pb em solos, tais como: (i) pH, que aumenta a mobilidade do Pb em valores ácidos; (ii) composição mineral, ou seja, a presença de argilominerais, oxi-hidróxidos de Fe e Mn, colóides

orgânicos e materiais de capacidade de troca iônica (CTC) relativamente alta, inibem a mobilidade do Pb; e (iii) a quantidade e a forma química do elemento no solo, pois algumas formas do chumbo, como os fosfatos, são mais estáveis e menos móveis que os minerais de Pb comumente encontrados em solos contaminados (Nriagu, 1974).

Os solos próximos da antiga usina de beneficiamento de Adrianópolis contêm chumbo em concentrações significativas. Cunha (2003) quantificou o Pb em 21 amostras de solo, coletadas desde algumas centenas de metros até 9,5 km de distância da usina Plumbum, em Vila Mota. Os resultados mostraram a influência da usina no acúmulo de Pb nos solos, que apresentaram desde 26 mg kg⁻¹ de chumbo no ponto de coleta mais distante da usina até 916 mg kg⁻¹, em amostra coletada a 900 m de distância da Plumbum. No mesmo estudo, Cunha (2003) analisou sedimentos de corrente e água de abastecimento da população. Na água, a concentração de Pb encontrava-se abaixo do limite de tolerância, não caracterizando um risco às pessoas. Os solos próximos aos locais onde foram empilhados os rejeitos, tanto dos processos de mineração e separação (Figura 1.6), quanto da escória produzida pelos fornos de metalurgia (Figura 1.7), são os mais afetados.



Figura 1.7: Pilha de rejeitos finos de beneficiamento e separação de minério, localizada às margens da única via de acesso à Vila Mota, município de Adrianópolis/PR.



Figura 1.8: Pilha de rejeitos de escória (cinza escuro) do forno de metalurgia da usina Plumbum, localizada às margens da única via de acesso à Vila Mota.

As elevadas concentrações de Pb nos solos, somadas as outras condições já citadas, como a falta de infra-estrutura básica da localidade e a potencial exposição da população local ao chumbo, levaram a realização de estudos pioneiros de contaminação humana na localidade. Paolliello *et al.* (2002) e Cunha (2003) avaliaram os níveis de Pb em sangue de crianças em idade escolar (7-14 anos) que moram próximas às minas, comparando-as com os valores de Pb no sangue de crianças que moram em uma localidade vizinha a Adrianópolis, sem qualquer atividade de mineração pretérita ou presente. Dados adicionais, como o sexo das crianças, hábitos alimentares, contato com materiais contaminados e o consumo de verduras, legumes e peixes coletados na localidade, obtidos por aplicação de um questionário, auxiliaram na interpretação dos resultados. Os resultados do estudo mostraram que cerca de 60%, de um total de 94 crianças avaliadas, apresentaram níveis de Pb em sangue maiores que o limite proposto pela organização mundial de saúde ($10 \mu\text{g dL}^{-1}$ - WHO, 1995), e muito acima da média encontrada na população controle ($2,37 \mu\text{g dL}^{-1}$). Os níveis de Pb em sangue de crianças que responderam positivamente às perguntas sobre se tinham acesso e brincavam nos solos da região, apresentaram correlações positivas na regressão estatística dos resultados, indicando esse comportamento como um dos principais fatores contribuintes para a alta concentração de Pb no sangue.

Paoliello *et al.* (2003) e Paoliello (2006) quantificaram o Pb presente no sangue de 101 adultos, entre 15 e 70 anos de idade, que moram nas proximidades da antiga mina de Pannels e da usina de beneficiamento. Valores de até $48,70 \mu\text{g dL}^{-1}$ de Pb no sangue foram encontrados, com a

mediana em $8,80 \mu\text{g dL}^{-1}$. Um questionário também foi empregado, cujo objetivo foi avaliar o tipo e a frequência de alimentação, ocupação atual e passada, tipo e tempo de habitação na área contaminada, atividades de lazer, entre outras. A comparação dos resultados dos testes de quantificação de Pb no sangue e as respostas dos questionários mostraram que os antigos trabalhadores das minas e da refinaria, que moram nas proximidades da antiga refinaria e que consomem frutas cultivadas nos solos da região, apresentaram maiores valores de Pb no sangue. Os autores atentam para a possível contribuição dos solos na contaminação humana, já que as atividades ligadas ao processamento do Pb cessaram em 1995.

Com o objetivo de avaliar a mobilidade do Pb presente nos solos, Cunha (2003) realizou ensaios de extração do Pb presente nos solos amostrados com EDTA e também avaliou seu potencial toxicológico com o teste TCLP (Toxicity Characteristic Leaching Procedure – método 1311, U.S.EPA). Os resultados mostraram que cerca de 60% do Pb presente nos solos estudados é solúvel nas condições levemente ácidas do teste com EDTA, evidenciando o potencial tóxico dessa matriz. O ácido etileno diamino tetraacético (EDTA) é um ácido fraco, mas é capaz de complexar íons metálicos e geralmente é usado para avaliar a fitodisponibilidade de micronutrientes como Cu, Fe e Zn. O EDTA, quando na presença de compostos de Pb, pode solubilizar o metal associado às frações orgânicas e também as formas adsorvidas na interface das partículas minerais constituintes do solo (Lo and Yang, 1999), portanto o Pb mais fracamente ligado às frações minerais dos solos. Esse tipo de resultado pode auxiliar na avaliação da solubilidade do Pb em condições levemente ácidas, mas não sua biodisponibilidade.

O teste TCLP, proposto pela agência de proteção ambiental americana para avaliar a mobilidade dos metais pesados para horizontes inferiores do solo ou cursos d'água, simula uma lixiviação a partir de uma pilha de rejeitos ou solos. Duas soluções extratoras, preparadas a partir de ácido acético são utilizadas (pH 4,6 e 2,8). O solo contaminado por Pb pode ser definido como tóxico se a concentração do metal solúvel nas soluções extratoras for maior que 5 mg L^{-1} . Os resultados mostraram que apenas 2 amostras, do total de 21, apresentaram valores aceitáveis nos testes de TCLP, enquanto o restante das amostras apresentou valores solubilidade de 5 a 13 vezes maiores que o limite de 5 mg L^{-1} . Portanto, trata-se de uma área bastante contaminada segundo os padrões da agência ambiental americana (U.S.EPA).

Com base nos resultados de Cunha (2003) e Paollielo *et al.* (2002), Lammoglia *et al.* (2005), avaliaram a presença de Pb em alimentos cultivados e/ou coletados na área da Vila Mota,

e consumidos pelos habitantes. Ovos, leite, verduras, raízes e grãos foram amostrados e analisados. A maior parte dos alimentos analisados, exceto leite e grãos, apresentou concentrações de Pb acima dos limites permitidos pela Secretaria de Vigilância Sanitária e Meio Ambiente do estado de São Paulo ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$, $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ para verduras/raízes/grãos, ovos e leite, respectivamente). Em alguns casos, como de raízes como a mandioca, a concentração de chumbo medida foi de 60 vezes superior ao limite sugerido. Os autores propõem orientar a população exposta a consumir moderadamente tais alimentos, para que a ingestão diária de Pb não ultrapasse o valor de $0,025 \text{ mg}$ de Pb por kg de peso corporal, sugerido pelas agências de saúde.

Apesar da presença de Pb em concentração variável nos alimentos, nenhum estudo de biodisponibilidade foi realizado com estes produtos. Alguns estudos de biodisponibilidade feitos com ingestão simultânea de compostos de chumbo e comida (e.g., Heard *et al.* 1983) mostram que a biodisponibilidade pode ser reduzida em até 16 vezes, comparada com a medida na ausência de comida.

Em termos de exposição crônica ao Pb, os solos são considerados como a principal via de contaminação aos seres humanos (Ruby *et al.*, 1993) e assim como mostraram os estudos de Paolliello *et al.*, (2002, 2003), crianças são mais suscetíveis que adultos (Calabrese *et al.*, 1999). Até hoje, nenhuma avaliação de risco foi conduzida com solos da Vila Mota, para determinar a contribuição dos solos superficiais, especialmente da fração mais fina e suscetível de ser movimentada, suspensa ou carregada pelos ventos e pelo movimento de veículos à contaminação da população que habita as proximidades da antiga usina de beneficiamento de Pb, caso esses materiais sejam acidentalmente ingeridos.

Nos últimos anos, alguns métodos foram propostos e usados para avaliar a biodisponibilidade e a bioacessibilidade do chumbo, em condições que simulam a ingestão de materiais contaminados com este elemento. Os testes de biodisponibilidade, também chamados testes *in vivo*, fornecem resultados da quantidade de metal que é absorvido pelo trato gastro-intestinal de mamíferos, e as cobaias usadas nestes experimentos geralmente porcos, coelhos, ratos e macacos. O trato gastro-intestinal desses animais apresenta semelhanças com o trato gastro-intestinal humano e pelo controle da dose de Pb administrada e a quantificação do Pb no sangue, tecidos e órgãos das cobaias, é possível determinar a taxa e a velocidade de absorção das espécies de Pb. Os testes *in vivo* são os únicos capazes de medir a biodisponibilidade de

contaminantes presentes em matrizes naturais (Hettiarachchi and Pierzinsky, 2004).

Apesar de serem os únicos testes padronizados para quantificar a biodisponibilidade de elementos tóxicos em solos, os testes *in vivo* são caros, requerem pessoal especializado no tratamento de animais e necessitam de infra-estrutura própria para serem executados. Uma alternativa, sugerida no início da década de 90 por Ruby *et al.* (1993) são os testes de bioacessibilidade, isto é, ensaios laboratoriais com soluções que simulam as condições físico-químicas do trato gastro-intestinal humano e que permitem avaliar a solubilidade do Pb em solos contaminados. Além da composição das soluções, a temperatura e o tempo de residência do solo nos órgãos do sistema digestório também são considerados. O Pb solúvel após a simulação completa da digestão, é denominado de fração bioacessível e indica a quantidade de metal que pode ser absorvida pelo epitélio intestinal (Oomen *et al.*, 2003). Há vários ensaios de bioacessibilidade descritos e discutidos na literatura e alguns foram validados por ensaios *in vivo*.

Trabalhos recentes (Ma *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1997; Zhang and Ryan, 1998, 1999) investigaram a possibilidade de diminuir a biodisponibilidade de metais tóxicos em solos pela transformação dos minerais e compostos nos quais esses elementos se encontram. No caso do chumbo, muitos estudos se concentraram na formação de piromorfita ($\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$, onde $\text{X}=\text{OH}$, Cl , Br ou F , pela adição de compostos a base de fosfato diretamente nos materiais contaminados. Dentre os minerais de chumbo, a cloropiromorfita $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ é um dos mais insolúveis, conforme os dados de constantes de estabilidade da Tabela 1.1.

Tabela 1.1 Constantes de estabilidade de alguns minerais de Pb encontrados em solos (adaptado de Hettiarachchi and Pierzinsky, 2004)

Nome	Reação de equilíbrio	log K°
Litargírio	$\text{PbO} + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Pb}^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	12,89
Alamosita	$\text{PbSiO}_3 + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Pb}^{2+} + \text{H}_4\text{Si}_4$	5,94
Cerussita	$\text{PbCO}_3 + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Pb}^{2+} + \text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O}$	4,65
Lanarkita	$\text{PbSO}_4.\text{PbO} + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Pb}^{2+} + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{O}$	-0,19
Anglesita	$\text{PbSO}_4 + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Pb}^{2+} + \text{SO}_4^{2-}$	-7,79
Hidroxipiromorfita	$\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH} + 7\text{H}^+ \rightleftharpoons 5\text{Pb}^{2+} + 3\text{H}_2\text{PO}_4^-$	-4,14
Fluoropiromorfita	$\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{F} + 6\text{H}^+ \rightleftharpoons 5\text{Pb}^{2+} + 3\text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{F}^-$	-12,98
Bromopiromorfita	$\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Br} + 6\text{H}^+ \rightleftharpoons 5\text{Pb}^{2+} + 3\text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{Br}^-$	-19,49
Cloropiromorfita	$\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl} + 6\text{H}^+ \rightleftharpoons 5\text{Pb}^{2+} + 3\text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{Cl}^-$	-25,05
Galena	$\text{PbS} \rightleftharpoons \text{Pb}^{2+} + \text{S}^{2-} + \text{H}_2\text{O}$	-27,51

A solubilidade da galena é menor que da cloropiomorfita, o que indica que a sua presença não seria preocupante, mas a galena pode se oxidar e formar anglesita, que é mais solúvel (Porter *et al.*, 2004).

1.4 Objetivos

Este trabalho contempla dois objetivos principais: (a) Avaliar a contribuição dos solos e rejeitos nos níveis de Pb em sangue da população da vila Mota (Adrianópolis/PR) e (b) Propor um método de remediação ambiental para reduzir a exposição humana ao chumbo presente em solos e rejeitos contaminados por atividades de mineração e beneficiamento.

Para atingir o primeiro objetivo, três testes de bioacessibilidade são utilizados para quantificar a solubilidade do chumbo presente em solos e rejeitos de mineração na área de estudo, e com os dados obter informações sobre a solubilidade desses materiais nas condições do trato gastro-intestinal humano, simulando uma ingestão acidental desses materiais.

O segundo objetivo do trabalho consiste em investigar a reatividade do chumbo dos solos e rejeitos com compostos a base de fosfato para obter produtos análogos à piromorfita e, desta forma, reduzir a solubilidade do chumbo.

1.5 Estrutura da tese

Esta tese é composta de três manuscritos de artigos científicos formatados para submissão e apresentados em partes sequenciais, além das conclusões gerais. Nos itens a seguir serão apresentados pequenos resumos dos conteúdos de cada parte.

1.5.1 Ensaio para determinar a (bio)disponibilidade de chumbo em solos contaminados

A Parte 2 contém uma revisão bibliográfica dos principais métodos utilizados para determinar, direta ou indiretamente, a solubilidade do Pb em matrizes geológicas e os respectivos resultados. São revisados e discutidos:

- Métodos instrumentais, como a absorção e difração de raios X, usados para caracterizar as espécies moleculares e minerais, respectivamente, de Pb em amostras naturais. Os resultados junto com dados de concentração relativa podem ser indicar se o chumbo numa dada matriz é potencialmente biodisponível. Nestes métodos a biodisponibilidade não é diretamente avaliada, e a identificação das fases é severamente limitada pela sua concentração na matriz.

A presença simultânea de várias fases também é um fator limitante a estas técnicas.

- Métodos de extração seletiva, que empregam soluções extratoras para transferir seletivamente os metais presentes na amostra testada, de acordo com as frações às quais eles estão associados. Apesar de muito usados para avaliar a distribuição das espécies metálicas em sedimentos e solos, os métodos de extração seletiva, apresentam alguns prós e contras, discutidos na Parte 2, que devem ser avaliados antes da sua utilização. Este tipo de método pode indicar o grau de mobilidade dos contaminantes associados a solos ou sedimentos, mas não permite avaliar a sua biodisponibilidade.
- Métodos *in vivo*, muito utilizados na indústria farmacêutica para avaliar a cinética e os efeitos de fármacos em cobaias, também são utilizados para dosar a solubilidade e a absorção de metais como o Pb em materiais contaminados. A administração controlada de substratos contendo chumbo a cobaias, e sua posterior quantificação em órgãos, tecidos e/ou sangue, permite inferir quanto à absorção, via processos digestivos, de metais como o Pb. Chamados de testes de biodisponibilidade, os testes *in vivo* são os únicos aceitos na determinação da biodisponibilidade absoluta (quantidade total de metal absorvido) ou relativa (quantidade relativa de metal absorvido em comparação a substâncias com comprovada alta solubilidade, como acetato de Pb) e os únicos capazes de validar outros métodos de avaliação de solubilidade em condições gastro-intestinais;
- Métodos *in vitro*, também chamados de testes de bioacessibilidade, são procedimentos laboratoriais capazes de simular as condições gastro-intestinais humanas. Com eles, se pode determinar a quantidade máxima de contaminante solúvel e passível de ser absorvido via ingestão acidental de material contaminado. Nos métodos *in vitro* se utiliza soluções compostas por ácidos e sais orgânicos, proteínas e enzimas, além de temperatura e pH controlados, que imitam as condições físico-químicas do trato digestivo humano. Eles não avaliam a absorção por parte do sistema digestivo, mas podem ser validados por métodos *in vivo* e boas correlações entre os métodos são descritas na literatura. Os métodos de bioacessibilidade são considerados uma boa alternativa caso métodos *in vivo* não possam ser utilizados em avaliações de risco.

1.5.2 - Bioacessibilidade do chumbo em solos e rejeitos

Esta parte da tese, cujo texto principal tem como título “Bioaccessible lead in soils, slag

and mine wastes from an abandoned mining district in Brazil” é redigida em inglês e formatada conforme os padrões exigidos pelo periódico escolhido para submissão. Esta parte trata da caracterização química e mineralógica das amostras coletadas na área de estudo, além da avaliação da bioacessibilidade do chumbo nos solos e rejeitos da área do estudo, e é precedida por informações adicionais como os locais de coleta das amostras e o método de amostragem, que não constam no manuscrito enviado à publicação.

Três métodos de bioacessibilidade foram utilizados para avaliar a solubilidade do chumbo em oito amostras de solo e quatro amostras de rejeito, sendo dois métodos que empregam soluções simples de aminoácidos e enzimas em meio ácido e outro utilizando uma simulação mais próxima das condições encontradas no trato digestivo humano.

Neste manuscrito também foram comparados os resultados alcançados por este trabalho com outros resultados de bioacessibilidade publicados recentemente. Apesar das diferentes condições do solo, da composição mineral dos solos e rejeitos e as diferentes espécies de Pb associadas às amostras utilizadas neste trabalho, a comparação dos resultados obtidos mostrou-se satisfatória.

A comprovada alta solubilidade das formas de Pb presentes nos solos do entorno da antiga usina e dos rejeitos, a falta de pavimentação das ruas, com a conseqüente e constante suspensão de poeiras com Pb, e o livre acesso, em especial de crianças, às pilhas de rejeito, indicam uma inevitável exposição humana ao Pb. Estes aspectos provavelmente contribuem para os níveis de Pb no sangue da população.

1.5.3 – Redução da bioacessibilidade do Pb nos solos rejeitos por tratamento com fosfatos

No manuscrito da quarta parte da tese, intitulado “Lead bioaccessibility in soil and mine wastes after immobilization as phosphate phases”, são descritos os resultados laboratoriais de testes da adição de compostos de fosfato solúveis diretamente a porções de duas amostras de solos e duas amostras de rejeitos. O composto final gerado por esse tipo de reação, geralmente um mineral da família da piromorfita $[Pb_5(PO_4)_3X]$, onde X pode ser F^- , Cl^- , Br^- ou OH^- , apresenta maior estabilidade que outras fases de chumbo. Esta transformação, pela adição de fosfato solúvel, é apresentada em diversos estudos, e foi sugerida originalmente por Nriagu (1974), demonstrou experimentalmente a estabilidade dos produtos, em solos contaminados por

emissões com provenientes da queima de gasolina com tetra etil chumbo.

Três materiais fosfatados, com diferentes graus de solubilidade, foram usados como fonte de fosfato nos experimentos de imobilização. O primeiro material testado foi o dihidrogenofosfato de sódio, NaH_2PO_4 , facilmente solúvel e capaz de disponibilizar o fosfato rapidamente em solução. O segundo composto, o dihidrogenofosfato de cálcio hidratado, $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\text{H}_2\text{O}]$, conhecido como superfosfato, utilizado como fertilizante, é produzido a partir da apatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3]$ por meio de ataque ácido com H_2SO_4 . Por ser um fertilizante, apresenta boa solubilidade, porém inferior à do sal sintético. O terceiro material testado foi uma rocha fosfática, composta majoritariamente por hidroxiapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$, a qual apresenta baixa solubilidade.

A biocessibilidade do chumbo nestas matrizes foi avaliada após um, três e seis meses, e comparada com a medida nas amostras originais. A caracterização das fases neo-formadas após as reações de imobilização não foi conclusiva, porém imagens e mapas elementares obtidos por MEV e análises semi-quantitativas por EDS indicaram que chumbo e fósforo se encontram nas mesmas fases em todas as amostras. As fases com Pb+P apresentaram formas aciculares, típicas de minerais da família da piromorfita, e o cloro também foi identificado, junto com o Pb e o P.

Todos os materiais fonte de fosfato usados apresentaram boa capacidade de imobilizar as fases Pb solúveis nas amostras testadas. A redução média nas frações bioacessíveis de Pb nas amostras de solos foi de 80% após 6 meses de tratamento, nas condições gástricas simuladas, e de 50% nas condições duodenais, em relação às amostras controle. Nos rejeitos sem tratamento, o Pb é mais solúvel que o dos solos, e após o tratamento com fosfato o decréscimo na solubilidade na fase gástrica, alcançou 90%. Na fase duodenal, cerca de 50% do Pb bioacessível foi imobilizado, semelhante ao resultado obtido nas amostras de solo.

A rocha fosfática é sugerida como material mais viável para utilização numa possível tentativa de utilização, já que apresenta o menor custo e que, apesar de apresentar menor solubilidade, após seis meses de contato, apresentou resultados comparáveis às outras fontes de fosfato mais solúveis.

1.6 Referências bibliográficas

- Anjos, J.A.S.A. 2003. *Avaliação da eficiência de uma zona alagadiça (wetland) no controle da poluição por metais pesados: o caso da Plumbum em Santo Amaro da Purificação/BA*. Tese de doutoramento, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 327p.
- Barbour, A.P., Brito Neves, B.B., Medeiros, R.A. 1990. Algumas implicações tectônicas na gênese das mineralizações sulfetadas do tipo Panelas no Vale do Ribeira, SP, PR. *Revista Brasileira Geociências*, **20**:46-54
- Brown, G.E., Foster, A.L., Ostergren, J.D. 1999. Mineral surfaces and bioavailability of heavy metals: A molecular-scale perspective. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América*, **96**:3388-3395
- Calabrese, E.J., Stanek, E.J., James, R.C., Roberts, S.M. 1999. Soil ingestion: a concern for acute toxicity in children. *Journal of Environmental Health* **61**:18-24
- Campanha, G.A.C. 1991. *Tectônica proterozóica no Alto e Médio Vale do Ribeira, Estados de São Paulo e Paraná*. Tese de doutoramento. Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo. 296 p. com anexos
- Cassiano, A.M. 2001. *Fontes de contaminação por metais pesados na bacia do rio Ribeira (SP-PR): Estratégias para remediação de uma área de disposição de rejeitos de mineração de Pb-Ag*. Tese de doutoramento. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo 159 p.
- CETESB - Companhia de tecnologia de saneamento ambiental. Relatório de qualidade de águas interiores do estado de São Paulo. Secretaria de Meio Ambiente de São Paulo. *Série Relatórios*. 1985-1994
- Claudio, E.S., Godwin, H.A., Magyar, J.S. 2003. Fundamental coordination chemistry, environmental chemistry and biochemistry of lead (II) *In*: Karlin, K.D. (ed) *Progress in Inorganic Chemistry*, vol. 51. John Wiley and Sons Inc, USA, pp.:1-144
- CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente. *Resolução nº 20 de 18 de junho de 1986*, Ministério do Meio Ambiente.
- Cunha, F.G. 2003. *Contaminação humana e ambiental por chumbo no vale do Ribeira, nos estados de São Paulo e Paraná, Brasil*. Tese de doutoramento, Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, 111 p. e anexos
- Daitx, E.C. 1996. *Origem e evolução dos depósitos sulfetados tipo Perau (Pb-Zn-Ag), com base nas jazidas Canoas e Perau (vale do Ribeira, PR)*. Tese de doutoramento, Universidade Estadual Paulista, 453 p.
- U.S.EPA-U.S.Environmental Protection Agency. 2002. *Reference manual for the integrated*

exposure uptake biokinetic model for lead in children (IEUBK) Windows® 32-bit version. [EPA 9285.7-44], 22 p.

Eysink, G.G.J., Padua, H.B., Piva-bortoletti, S.A.E., Martins, M.C., Navas-Pereira, D. 1988. Metais pesados no Vale do Ribeira e em Iguape-Cananéia. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo. *Ambiente: Revista CETESB de Tecnologia* **2**:6-13,

Ferreira, N.L.S. 1994. *Aspectos da geoquímica ambiental da mina do Rocha-PR*. Dissertação de mestrado, Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 94 p.

Figueiredo, B.R. 2000. *Minérios e Ambiente*. Editora da Unicamp, Campinas, São Paulo, 401 p.

Fleischer, R. 1976. A pesquisa de chumbo no Brasil. *In: Anais do XXIX Congresso Brasileiro de Geologia*, ed. Sociedade Brasileira de Geologia. Ouro Preto-MG, Brasil, 1, p. 19-32

Heard, M.J., Chamberlain, A.C., Sherlock, J.C. 1983. Uptake of lead by humans and effect of minerals and food. *The Science of the Total Environment*, **30**:245-253

Hettiarachchi, G.M. and Pierzynski, G.M. 2004. Soil Lead bioavailability and *in situ* remediation of lead-contaminated soils: A review. *Environmental Progress*, **23**: 78-92,

Jaworski, J.F., Nriagu, J.O., Denny, P., Hart, B.T., Lasheen, M.R., Subramanian, V., Wong, M.H. 1987. Lead. *In: Hutchinson, T.C. and Meema, K.M. (eds.) Lead, mercury, cadmium and arsenic in the environment*, John Wiley and Sons, USA, pp.: 1-17

Lammoglia T., Figueiredo B.R., Sakuma A.M., Buzzo M.L., Okada I.A., Kira C.S. 2005. Ocorrência de chumbo em alimentos e solos no Alto Vale do Ribeira. *In: Anais do X Congresso Brasileiro de Geoquímica*, Sociedade Brasileira de Geoquímica, Porto de Galinhas/PE, Brasil, digital.

Lo, I.M.C. and Yang, X.Y. 1999. EDTA extraction of heavy metals from different soil fractions and synthetic soils. *Water, Air and Soil Pollution*, **109**: 219–236

Lopes Jr., I. 2005. Atlas geoquímico do vale do Ribeira, CPRM, FAPESP. 47 p.

Moraes, R.P. 1997. *Transporte de chumbo e metais associados no rio Ribeira de Iguape*. Dissertação de mestrado, Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, 94 p.

Moreira, F.R., Moreira, J. C. 2004. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. *Cadernos de Saúde Coletiva*, **9**:167-182

Nriagu, J.O. 1974. Lead orthophosphates—IV Formation and stability in the environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **38**:887-898

Paoliello, M.M.B., Chasin, A.A.M. 2001. *Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. Série Cadernos de Referência Ambiental*, vol. 3. Centro de Recursos Ambientais, Brasil. 144p.

- Paoliello, M.M.B., De Capitani, E.M. 2005 Environmental contamination and human exposure to lead in Brazil. *Reviews of the Environmental Contamination Toxicology*, **184**:59-96
- Paoliello, M.M.B., De Capitani, E.M., Cunha, F.G., Carvalho, M.F., Matsuo, T., Sakuma, A., Figueiredo, B.R. 2003. Determinants of blood lead levels in an adult population from a mining area in Brazil. *Journal de Physique IV*, **107**:127-130
- Paoliello, M.M.B., De Capitani, E.M., Cunha, F.G., Matsuo, T., Carvalho, M.D., Sakuma, A., Figueiredo, B.R. 2002. Exposure of children to lead and cadmium from a mining area of Brazil. *Environmental Research*, **88**:120-128,
- Paoliello, M.M.B., De Capitani, E.M., Sakuma, A.M., Cunha, F.G., Figueiredo, B.R., Carvalho, M.F., Matsuo, T., Dalmolin, F. 2006. Determinants of blood lead levels in children and adults living in a former mining area in Brazil. *Toxicology Letters*, **164**: S203
- Oomen A.G., Tolls J., Sips A.J.A.M., Groten, J.P. 2003. In vitro intestinal lead uptake and transport in relation to speciation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **44**:116-124
- Oomen A.G., Tolls J., Sips A.J.A.M., Van Der Hoop, M.A.G.T. 2003. Lead speciation in artificial human digestive fluid. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **44**:107-115
- Ruby, M.V., Davis, A., Link, T.E., Schoof, R., Chaney, R.L., Freeman, G.B., Bergstron, P.D. 1993. Development of an *in vitro* screening test to evaluate the *in vivo* bioaccessibility of ingested mine-waste lead. *Environmental Science and Technology*, **27**:2870-2877
- Ruby, M.V., Schoof, R., Brattin W., Goldade, M., Post, G., Harnois, M., Mosby, D.E., Casteel, S. W., Berti, W., Carpenter, M., Edwards, D., Cragin, D., Chappel, W. 1999. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environmental Science and Technology*, **33**:3697-3705
- Shepherd, D. 2006. Geologia e geoquímica da região de sete barras, Vale do Ribeira (SP). Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas. 47 p.
- Silvany-Neto, A.M., Carvalho, F.M., Tavares, T.M. 1996. Lead poisoning among children from Santo Amaro, Bahia, Brazil in 1980, 1985 and 1992. *PAHO Bulletin*, **30**:50-62
- Staundinger, K.C., Roth, V.S. Occupational lead poisoning. *American Family Physician* **57**, disponível em <<http://www.aafp.org/afp/980215ap/stauding.html>>, acessado em 01/12/2006
- Wedepohl, K.H. 1995. The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **59**:1217-1232
- WHO - World Health Organization. 1995. Inorganic Lead. Genebra: *In: IPCS – International Programmer on Chemical Safety. Environmental Health Criteria*, **165**, 300p.

Parte 2.

ENSAIOS PARA DETERMINAR A (BIO)DISPONIBILIDADE DE CHUMBO EM SOLOS CONTAMINADOS: REVISÃO

2.1 Introdução

Desde a antiguidade, a mineração e o beneficiamento de minérios de chumbo para os diversos usos do chumbo metálico e de seus compostos produziram a disseminação do chumbo no ambiente. Exemplos ainda recentes são as tintas com pigmentos a base de compostos de chumbo, amplamente usadas, inclusive para a pintura de residências e o tetraetil chumbo usado como anti-detonante na gasolina durante muitas décadas. Felizmente estas duas aplicações de compostos de chumbo foram banidas na maior parte do mundo. No Brasil, elevadas concentrações de Pb podem ser encontradas em solos no entorno de áreas industriais, em atividades de reciclagem de baterias automotivas ou em áreas onde ocorreram atividades industriais de exploração e refino de minérios de chumbo¹.

O reconhecimento dos efeitos tóxicos da exposição ao chumbo redundou na introdução de restrições ao uso de compostos de chumbo, com o objetivo de tornar o ambiente, em geral, mais seguro e saudável. O mesmo é válido para outros compostos de ação tóxica, metálicos ou não. A necessidade de monitorar a presença e o comportamento de elementos tóxicos no ambiente ensejou o desenvolvimento de métodos específicos para determinar a sua concentração e reatividade em diversas matrizes e meios.

O chumbo (Pb) é um elemento-traço com abundância crustal² de 17 mg kg⁻¹ e que substitui elementos como potássio e cálcio em aluminossilicatos, em especial feldspatos, e metais em sulfetos. O chumbo é constituinte essencial de muitos minerais, mas somente alguns são comuns. A galena (PbS) é o principal mineral de minério de chumbo. O chumbo metálico é

produzido por oxidação da galena, seguida pela redução do litargírio (PbO) formado. Alguns minerais importantes de chumbo são formados por transformação da galena. Exemplos são a reação com águas carbonatadas para formar cerussita (PbCO₃), a oxidação que produz a anglesita (PbSO₄) e a reação com fosfatos que resulta na piromorfita [(Pb₅(PO₄)₃X onde X= OH⁻, F⁻, Br⁻ ou Cl⁻].

A ocorrência desses minerais evidencia que o chumbo forma compostos de baixa solubilidade, com algumas poucas exceções (p.x., citrato e acetato). A atividade do chumbo em águas naturais, inclusive as intersticiais, com frequência é menor que a calculada pela saturação das espécies de chumbo precipitadas. Isto ocorre por causa de reações de adsorção em superfícies inorgânicas como óxidos de ferro, argilominerais, apatita e matéria orgânica. A solubilidade das diferentes espécies de chumbo, isto é, de minerais, chumbo adsorvido ou de compostos sintéticos também depende do pH do meio. Em pH ácido (~1,5), como o encontrado no estômago humano, muitas espécies de chumbo são solúveis, e por isto a ingestão de solos ou poeiras contaminadas pode resultar na absorção de chumbo.

O chumbo é um metal não essencial ao organismo e pode ser acumulado primeiramente em tecidos moles, e posteriormente nos ossos³. Na sua interação com organismos, o chumbo apresenta características toxicológicas comuns a outros metais (p.ex., induz anemia e danos ao rim) e também alguns efeitos específicos. A toxicidade do chumbo resulta, principalmente, de sua interferência no funcionamento das membranas celulares e enzimas, pois é capaz de formar complexos estáveis com ligantes que contém enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio (p.ex., grupos -SH, -H₂PO₃, -NH₂, -OH), que funcionam como doadores de elétrons³. Por exemplo, como resultado da interação bioquímica do chumbo com grupos -SH de uma enzima, a atividade desta pode ser afetada e, desta forma, produzir efeitos tóxicos^{3,4}.

Quando a exposição ao chumbo é crônica, efeitos em longo prazo no organismo podem

atingir os ossos, os rins, os sistemas nervoso central, cardiovascular, reprodutivo, endócrino e a formação do feto³. Comparadas com adultos, as crianças são mais suscetíveis aos efeitos toxicológicos do chumbo. Essa maior vulnerabilidade pode ser relacionada aos seguintes fatores^{3,5}: (a) o contínuo crescimento das crianças em idade pré-escolar implica na remodelagem óssea e contribui para a transferência do chumbo dos ossos para o sangue; b) por terem o sistema nervoso ainda em formação, as crianças são mais vulneráveis aos efeitos neurotóxicos provocados pela contaminação por chumbo; (c) freqüentemente, crianças apresentam deficiências metabólicas de Fe e Ca, o que aumenta a absorção e os efeitos colaterais da ingestão do Pb; (d) a eficiência de absorção do Pb no trato gastro-intestinal, em crianças, é maior do que em adultos, devido à formação física e ao metabolismo mais acelerado; e (e) crianças em idade pré-escolar freqüentemente brincam diretamente na terra e tem mais acesso a poeiras e levam mãos e brinquedos sujos à boca e ao nariz, o que aumenta a possibilidade de ingestão (ou inalação) de partículas com chumbo⁶.

A absorção dos metais pesados, como o chumbo, ocorre no estômago (em menor escala) e no duodeno, desde que as condições sejam favoráveis. O metal deve estar solúvel, na sua forma livre (Pb^{2+}) ou complexado por aminoácidos, ácidos ou sais orgânicos e pelos componentes da bile, e desta forma ser transportado através da parede epitelial, onde pode ser absorvido e entrar na circulação sanguínea⁷. O tempo de residência do chumbo no sangue é de menos de um mês e a tendência é dele se acumular nos ossos, donde pode ser liberado novamente.

A ingestão (ou inalação) de partículas com chumbo, sejam elas provenientes diretamente de solos ou de poeiras domésticas, é a principal via de contaminação humana, seja em crianças ou em adultos⁸, exceto trabalhadores envolvidos diretamente em atividades de metalurgia, mineração, separação, refino e reciclagem de materiais e compostos de chumbo, que pela sua

atividade estão mais expostos e propensos à contaminação.

Segundo Brown *et al.*⁹ o risco associado à presença de elementos tóxicos no ambiente é influenciado por três fatores: (a) quantidade total de metal presente no ambiente; (b) sua toxicidade e (c) sua biodisponibilidade. O termo biodisponibilidade oral é definido como a fração da dose administrada que atinge a circulação sanguínea a partir do trato gastro-intestinal. Portanto, a dosagem de chumbo em sangue permite avaliar se o indivíduo teve exposição recente e se absorveu o metal. Para associar estes parâmetros com a sua fonte, diversos meios, como ar, água, solos, sedimentos e alimentos, podem ser amostrados e analisados. Dentre essas matrizes, solos são analisados com grande frequência, principalmente por métodos recomendados para tal finalidade, como os propostos pela agência de proteção ambiental americana (USA-EPA – métodos 3050B e 3051¹⁰). Por outro lado, já foi demonstrado que pode não haver correlação entre a quantidade total de chumbo em solos e a sua concentração no sangue de pessoas a eles expostas^{9,11}. Uma conclusão fundamental deste tipo de estudo é que a biodisponibilidade do chumbo depende também da especiação deste elemento, isto é, das fases em que ele se encontra nos solos, e não somente da sua concentração total. A Tabela 2.1 apresenta uma relação entre biodisponibilidade e a forma de ocorrência de chumbo, que se refere aos minerais em que ele se encontra, tamanho de partícula, se livre ou encapsulado por minerais (p.ex., quartzo) ou materiais provenientes da metalurgia do Pb (escória).

Tabela 2.1. Tipo de ocorrência do Pb, fórmula química e produtos de solubilidade dos minerais e a biodisponibilidade

Ocorrência	Fórmula química	log K _{PS}	Biodisponibilidade
Minerais			
Anglesita	PbSO ₄	7,7	Média
Cerussita	PbCO ₃	12,8	Alta
Galena	PbS	-27,5	Baixa
Fluorpiromorfita	Pb ₅ (PO ₄) ₃ F	-71,6	Baixa
Hidroxipiromorfita	Pb ₃ (PO ₄) ₃ OH	-76,8	Baixa
Cloropiromorfita	Pb ₃ (PO ₄) ₃ Cl	-84,4	Baixa
Hinsdalita	PbAl ₃ (PO ₄)(OH) ₆ SO ₄	-99,1	Baixa
Plumbogumita	PbAl ₃ (PO ₄) ₂ (OH) ₅ H ₂ O	-99,3	Baixa
Corkita	PbFe ₃ (PO ₄)(SO ₄)(OH) ₆	-112,6	Baixa
Tamanho de partícula:			
Grande			Baixa
Pequena			Alta
Encapsulamento*			
Quartzo			Baixa
Material amorfo (escória)			Média
Óxidos de Fe-Pb			Média
PbO			Alta

* Composição do material que recobre partículas de Pb (Adaptado de Ruby *et al.*⁸)

Esta revisão tem como objetivo rever os métodos mais utilizados para avaliar a disponibilidade do chumbo em solos. Ênfase será dada aos ensaios que simulam o trato gastrointestinal humano, os chamados testes *in vitro* ou de bioacessibilidade, que são usados para medir a quantidade de metal dissolvida se um solo contaminado é ingerido acidentalmente e, portanto, passível de absorção pelo organismo.

2.2 Métodos de especiação de chumbo em solos

A composição elementar, o estado físico e de oxidação, a fórmula empírica e a estrutura molecular são os atributos físico-químicos que caracterizam uma dada espécie química⁹. Nos solos, a reatividade e a solubilidade das diferentes espécies de chumbo controlam a biodisponibilidade e a toxicidade deste elemento. Por exemplo, a ordem de estabilidade dos minerais cerussita (PbCO_3) < anglesita (PbSO_4) < cloropiromorfita [$\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$] indica que se o chumbo estiver presente como cloro-fosfato, ele é menos solúvel e menos biodisponível⁸ do que como cerussita. Portanto, a avaliação de riscos associados à presença de elementos ou compostos tóxicos implica na identificação das fases em que se encontra o elemento e na estimativa das suas respectivas reatividades e mobilidades.

A associação de dados de especiação com resultados de biodisponibilidade obtidos em testes com animais (*in vivo*) ou ensaios laboratoriais (*in vitro*) demonstrou a importância da espécie na sua reatividade biológica. Porém, a especiação não é o único fator controlador da solubilidade de chumbo se solos contaminados com este elemento forem acidentalmente ingeridos. Se as fases com chumbo estiverem encapsuladas por outros minerais, a cinética de reatividade destes pode ser determinante à solubilidade⁸. Por exemplo, a solubilidade de carbonatos e óxidos de chumbo tende a ser reduzida quando estes se encontram encapsulados por silicatos ou sulfetos¹².

A caracterização das fases de chumbo em solos às vezes é feita por meio de difração de raios X, microsonda eletrônica e de absorção de raios X (EXAFS – extended X-ray absorption spectroscopy), conforme apresentam Manceau *et al.*¹¹ e Davis *et al.*¹². Porém, essas técnicas somente são eficientes para identificar fases de chumbo quando sua concentração é significativa e/ou se essas fases puderem ser pré-concentradas ou separadas da matriz antes das medidas¹³. Isto

nem sempre é possível, especialmente em solos, pois várias fases diferentes podem co-existir, geralmente em concentrações individuais inferiores aos limites de detecção das técnicas empregadas. A soma de sinais característicos dificulta sua interpretação e a identificação das fases individuais onde o chumbo se encontra¹⁴.

2.3 Métodos de extração seletiva

A caracterização da reatividade química de fases metálicas associadas às frações inorgânicas e orgânicas é uma forma muito rápida e indireta de determinar a disponibilidade de metais em matrizes ambientais. As extrações químicas parciais, sequenciais e seletivas são usadas para determinar em que fases se distribuem os diferentes elementos químicos de uma amostra, em geral de sedimentos ou solos. O método proposto por Tessier *et al.*¹⁵ é um dos mais citados e usados. Nele são empregadas soluções de reagentes seletivos, isto é, capazes de extrair para a fase líquida os elementos presentes em tipos específicos de fases, ou frações, por reações de troca iônica, oxi-redução e dissolução. Os reagentes, em geral, aplicados sequencialmente à fase sólida, após a remoção da fase líquida da etapa anterior, e as frações, cuja composição é determinada são: i) MgCl_2 (1 mol L^{-1} , pH 7) = íons fracamente ligados à matriz e, portanto, mais móveis, também chamada de fração trocável (ii) NaOAc (acetato de sódio) em pH 5 = fração carbonato, à qual se associam elementos cuja solubilidade depende do pH; (iii) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ +citrato de sódio+ácido cítrico = (oxi)hidróxidos de ferro e manganês, que podem reter diversos metais e ânions por adsorção superficial e co-precipitação; (iv) HNO_3 + H_2O_2 , em pH 2 = matéria orgânica (p.ex., ácidos húmicos e fúlvicos, microorganismos e detritos orgânicos diversos) que dentre outros mecanismos, complexa metais e (v) $\text{HF}+\text{HClO}_4$ = fase residual, que geralmente contém silicatos primários e secundários (formados por intemperismo). Se esta última

etapa não for efetuada sob pressão, a permanência de um pequeno resíduo pode ser devida à presença de minerais resistentes ao intemperismo e a ataques químicos (p.ex., zircão).

As extrações seqüenciais são muito utilizadas¹⁶ e, ao longo dos anos, variantes ao método de Tessier *et al.*¹⁵ foram introduzidas e alguns trabalhos de revisão reúnem a maior parte deles¹⁷. A padronização dos diferentes métodos foi proposta num protocolo harmonizado¹⁸, e consiste somente de três etapas. A reprodutibilidade do protocolo harmonizado foi avaliada num estudo interlaboratorial apresentado por Quevauviller *et al.*¹⁹, e posteriormente melhorado²⁰.

Uma das principais críticas aos métodos de extração seqüencial é a falta de seletividade das soluções extratoras usadas. Outra deficiência, apontada por Baffi *et al.*²¹, é a influência da composição mineralógica da amostra na eficiência das extrações. Isto implicaria em validar cada esquema de extração seqüencial em matriz semelhante a que se pretende estudar.

A disponibilidade de metais às vezes é avaliada pelo método TCLP²² (Toxicity Characteristic Leaching Procedure – método 1311), proposto pela EPA-EUA em 1994. Este método consiste em extrações parciais com ácido acético em pH 4,9 e 2,8, isto é, em condições que simulam a lixiviação realizada pela água da chuva ou por efluentes em locais contaminados. Assim como nos métodos de extração seqüencial, o TCLP é utilizado especificamente para determinar a mobilidade de analitos inorgânicos e orgânicos e avaliar seu potencial tóxico de acordo com a quantidade de contaminante que é mobilizado da matriz.

2.4 Ensaios de biodisponibilidade *in vivo*

Os métodos acima discutidos são úteis para avaliar a distribuição de metais em fases sólidas, mas a biodisponibilidade de contaminantes é avaliada por procedimentos mais específicos, capazes de simular uma exposição ao material contaminado. Dentre eles, destacam-

se os testes *in vivo*, que empregam cobaias (ratos, coelhos, porcos e macacos) e humanos, e são muito usados na área biomédica e farmacêutica, para determinar a biodisponibilidade efetiva de medicamentos, drogas ou de materiais contaminados, ao serem administrados diretamente na dieta de cobaias^{23,24}.

Vários testes padronizados de ensaios *in vivo*, para avaliar a absorção de metais pela ingestão de solos contaminados, foram sugeridos a partir de 1977, quando Dacre and Haar²⁵ determinaram a concentração de Pb em sangue e tecidos de ratos alimentados com solos contaminados por Pb. Tais testes abrangem desde a contaminação aguda até longos períodos de exposição²⁶. Nas cobaias, os efeitos tóxicos são avaliados por parâmetros como a mortalidade, observações clínicas, exames funcionais e oftalmológicos, mudanças no peso corporal, mudanças na alimentação e no consumo de água. Já a biodisponibilidade é avaliada pela quantificação do chumbo presente no sangue, tecidos, órgãos, pêlos e ossos das cobaias²⁵, e pelas diferenças na absorção do chumbo quando há variações na composição química e física do solo, como tamanho das partículas, forma química predominante do chumbo na matriz e quantidade administrada.

Ratos, coelhos e porcos são as cobaias usadas nos testes *in vivo*, no intuito de simular a ingestão de materiais contaminados por humanos. Os ratos e os coelhos, devido às suas características de alimentação e pH gástrico, são considerados bons simuladores do trato gastrointestinal infantil²⁶, porém ensaios com porcos são os mais indicados para estimar a biodisponibilidade de Pb em solos. As características fisiológicas e anatômicas dos porcos, semelhantes às dos humanos, torna sua resposta quase idêntica à de um ser humano que ingerisse o mesmo tipo de material²⁷.

A biodisponibilidade média de chumbo presente numa dieta comum (alimentos e água) de crianças varia de 40 a 53% e em adultos de 7-15%⁷. Para a ingestão de solos e poeiras, a EPA (EUA) propõe uma biodisponibilidade média de Pb em torno de 30%, enquanto para a água e a

dieta ela é de 50%. Estes valores encontram-se no guia do software usado para simular a contaminação de seres humanos por ingestão de solos e materiais contaminados com Pb (IEUBK)²⁸. A biodisponibilidade atribuída aos solos provem de resultados de testes *in vivo* executados em porcos não adultos, com solos contendo diferentes fases de Pb, como galena, cerussita e adsorvido em (oxi)hidróxidos de Fe e Mn. Esses valores são apenas aproximações, pois a biodisponibilidade também depende de aspectos sócio-econômicos da população atingida. Por exemplo, a ingestão regular de alimentos contribui para reduzir a absorção de Pb no trato gastro-intestinal²⁹. A faixa etária média da população estudada também deve ser considerada, pois crianças (0-14 anos) absorvem mais Pb que adultos (maiores que 15 anos)⁸, bem como local de moradia³⁰, que influi na acessibilidade a poeiras e solos contaminados. Estas variáveis indicam que cada área pode requerer um estudo detalhado independente³⁰.

Um dos primeiros estudos *in vivo*, realizado com ratos, relacionou a biodisponibilidade com a espécie de Pb em solos³¹. Neste estudo, os ratos foram alimentados por 30 dias com quantidades diferentes de solos contaminados por atividades de mineração do distrito industrial de Butte, em Montana (EUA). Para o cálculo de biodisponibilidade, os valores de Pb encontrados no sangue e tecidos dos ratos foram comparados com valores de biodisponibilidade de um grupo de cobaias alimentadas com acetato de chumbo, $\text{Pb}(\text{OAc})_2$, que é bastante solúvel. Os valores finais correspondem à biodisponibilidade relativa, ou seja, o total absorvido dos solos em relação ao total absorvido do $\text{Pb}(\text{OAc})_2$. Os dados permitiram avaliar a biodisponibilidade relativa média de 10% para os solos daquele distrito e de 68% para o $\text{Pb}(\text{OAc})_2$. O baixo valor de biodisponibilidade dos solos administrados aos ratos, deve-se à preponderância de anglesita e galena, que são fases mais estáveis de chumbo nas condições digestivas. O contrário acontece com o $\text{Pb}(\text{OAc})_2$, já que sua solubilidade é elevada na faixa de pH encontrada nas soluções gastro-intestinais.

Davis *et al.*¹² e Ruby *et al.*²⁴ realizaram ensaios em coelhos, com solos e rejeitos de mineração do mesmo distrito (Butte, MO), e os resultados de biodisponibilidade, com média de 9%, são semelhantes aos de Freeman *et al.*³¹. Os resultados indicam que ratos e coelhos absorvem quantidade semelhante de Pb daqueles materiais e também comprovam que a composição mineralógica dos materiais contaminados controla sua biodisponibilidade.

Em outro estudo, Schoof *et al.*³² administraram amostras de solos e rejeitos de mineração de Sandy, Utah (EUA), além de quantidades controladas de Pb(OAc)₂ junto à alimentação de ratos por 31 dias. Neste estudo, as amostras continham sulfato, carbonato, fosfato, arsenato e uma fase amorfa de chumbo. A biodisponibilidade relativa do Pb nos materiais contaminados avaliados foi, em média, três vezes maior que a encontrada por Freeman *et al.*³¹, Davis *et al.*¹² e Ruby *et al.*²⁴. Os autores³² do estudo atribuíram os valores mais elevados de biodisponibilidade à presença nas amostras de espécies mais solúveis (como carbonatos, arsenatos e a fase amorfa).

A biodisponibilidade do Pb em dois solos do distrito industrial de Aspen, CO (EUA), foi avaliada em porcos por Casteel *et al.*³³. Com concentrações de 3800 mg kg⁻¹ e 14200 mg kg⁻¹, os solos apresentaram resultados de biodisponibilidade relativa, comparados com a biodisponibilidade de Pb(OAc)₂, de 63 e 64%. A alta biodisponibilidade encontrada, em comparação com métodos utilizando ratos e coelhos, é atribuída pelos autores a fatores como a fisiologia dos suínos, que excretam comparativamente menos bile que ratos e coelhos, mas aproximadamente a mesma que crianças. Outra comprovação do estudo é que a quantidade total de Pb não é determinante na sua biodisponibilidade. Apesar da diferença nas concentrações de Pb nos solos testados, os respectivos valores de biodisponibilidade tiveram uma diferença relativa de 1%.

Os testes *in vivo* para avaliar a biodisponibilidade de Pb em solos contaminados são considerados confiáveis, mas eles devem ser realizados por profissionais especializados e com

infra-estrutura específica, que nem sempre se encontram disponíveis. Outros fatores a considerar são os custos elevados e o tempo requerido. Esses aspectos dificultam a aplicação dos ensaios *in vivo* e estimularam o desenvolvimento de uma metodologia mais simplificada, rápida, relativamente confiável e barata, baseada em ensaios laboratoriais *in vitro*.

Sugerido por Ruby *et al.*²⁴, o chamado teste de bioacessibilidade *in vitro* é um ensaio laboratorial que simula as condições físico-químicas das soluções encontradas no estômago e no duodeno humanos e é usado para estimar a quantidade de Pb (ou outro contaminante) absorvida, caso material contaminado seja ingerido. Este tipo de teste reúne características para uma avaliação de risco rápida e confiável. A bioacessibilidade oral de uma substância foi definida como a fração solúvel nas condições do trato gastro-intestinal e que está disponível para absorção⁸. Ainda segundo Ruby *et al.*²⁴ todo o chumbo dissolvido é passível de ser absorvido. Isto inclui o chumbo que permanece solúvel tanto na forma livre ou combinado a ligantes orgânicos pequenos, bem como também o que depois de dissolvido liga-se a espécies de peso molecular elevado ou que ao entrar no duodeno é sorvido à superfície de partículas presentes.

2.5 Ensaios de bioacessibilidade *in vitro*

Os testes de bioacessibilidade *in vitro*, recentemente revisados³⁴, baseiam-se na fisiologia do trato gastro-intestinal²⁴ e simulam as condições da digestão humana. No lugar da saliva e dos sucos gástrico e duodenal naturais, são usadas soluções artificiais que simulam o meio de cada um dos compartimentos digestivos. Alguns autores (e.g. Basta e Gradwohl³⁵) empregam métodos de extração seletiva como ensaios de bioacessibilidade, porém nesta revisão apenas os testes que simulam o trato digestivo humano serão considerados.

Assim como em todos os métodos discutidos acima, há vantagens e desvantagens no uso

dos diversos ensaios de bioacessibilidade *in vitro* propostos a partir do trabalho de Ruby *et al.*²⁴. A escolha de um determinado método baseia-se na sua validação, em geral, com base na comparação de resultados de testes *in vivo*, na fidelidade da simulação das condições fisiológicas humanas e, também, na adequação à infra-estrutura disponível. É importante ressaltar que os testes de bioacessibilidade não incluem os microorganismos presentes no trato digestivo e não consideram os mecanismos de absorção que ocorrem preferencialmente no epitélio duodenal. Uma simulação *in vitro* da absorção de Pb por parte de células do duodeno foi efetuada por Oomen *et al.*³⁶, porém não será escopo desta revisão.

As soluções simuladoras do trato gastro-intestinal, empregadas nos testes de bioacessibilidade, contém enzimas, aminoácidos, sais orgânicos e inorgânicos e ácido clorídrico. Em geral, pepsina e pancreatina são as enzimas usadas. A pepsina é uma enzima ácida cuja função é metabolizar proteínas e a pancreatina, secretada no duodeno, é uma mistura de enzimas capazes de metabolizar proteínas, gorduras e carboidratos complexos³⁷. A glicina, o aminoácido mais simples produzido pelo corpo humano, é utilizada em alguns testes e age tamponando a solução gástrica simulada, devido ao caráter anfótero da sua molécula. Alguns exemplos de sais inorgânicos utilizados são NaCl, KCl, KSCN e Na₂HPO₄, a depender do meio simulado. Os sais orgânicos são utilizados para simular a bile humana, e geralmente são empregados compostos sintéticos derivados do ácido cólico, que funcionam como emulsificantes nas soluções duodenais. Além desses reagentes, outras condições do sistema digestivo humano, como temperatura, tempo de contato entre o sólido e o biofluido e pH do meio também são reproduzidas.

Nos primeiros ensaios de bioacessibilidade, Davis *et al.*¹² e Ruby *et al.*²⁴ estimaram a solubilidade de chumbo dos solos do distrito industrial de Butte, MT (USA), e compararam os resultados de bioacessibilidade com os resultados de biodisponibilidade obtidos em ensaios *in vivo* com coelhos, já mencionados. Davis *et al.*¹² simularam as condições estomacais com uma

mistura aquosa de HCl (pH 1,3) junto com ração de coelhos rica em fibra, e o intestino com uma solução de NaHCO₃ (pH 7,0) e obtiveram valores baixos de solubilidade na solução intestinal, em torno de 0,18% em relação ao Pb total das amostras. Por outro lado, em ensaios *in vivo* executados paralelamente, a solubilidade média de Pb foi quantificada em 5,6%. A diferença entre experimentos *in vivo* e *in vitro* foi atribuída à composição das soluções, que necessitaria ser otimizada com a adição de componentes ao fluido intestinal, capazes de se ligar o Pb e mantê-lo em solução (p.ex., proteínas, enzimas ou ligantes orgânicos).

Ruby *et al.*²⁴ introduziram ácidos orgânicos (acético, málico e láctico) na solução simuladora do fluido gástrico, enquanto na solução duodenal foram adicionados pancreatina, extratos de bile e NaHCO₃. Desta forma conseguiram resultados de solubilidade *in vitro* mais próximos (4%) dos obtidos nos ensaios *in vivo* em coelhos (9%), realizados concomitantemente e com as mesmas amostras. Nesse trabalho²⁴, foi empregada razão sólido/líquido de 1:10, que é considerada a mais próxima da quantidade de fluido gástrico produzido no estômago de coelhos, utilizados para validar o método *in vitro* e o pH inicial de 1,3 foi aumentado gradualmente na transição entre as soluções do estômago e do duodeno. Com os resultados obtidos, Ruby *et al.*²⁴ demonstraram que é possível estimar quantidade de chumbo passível de absorção, a partir da sua solubilidade em fluidos semelhantes ao do trato gastro-intestinal.

O mesmo teste, denominado PBET³⁸ (physiologically based extraction test) foi aplicado às amostras dos estudos *in vivo* de Freeman *et al.*³¹ e Schoof *et al.*³². Foram sugeridas pequenas alterações no método de Davis *et al.*¹², como a adição da pancreatina e os sais de bile ao meio intestinal só após a solução duodenal atingir o equilíbrio em pH 7 com a adição de NaHCO₃, e a razão sólido/líquido, ajustada para 1:100, para empregar a quantidade representativa de amostra (0,4 g) e de fluido gástrico produzido por uma criança em jejum (40 mL). A variação do pH do estômago também foi utilizada para avaliar as condições do estômago quando em jejum (pH 1,3)

e logo após a ingestão de alimentos (pH 4,0), e também em pH 2,5 usado como valor médio. Os resultados foram comparáveis aos de biodisponibilidade obtidos em ratos por Freeman *et al.*³¹ (10%) e Schoof *et al.*³² (36%), principalmente na fase gástrica e com pH 2,5. Para a fase intestinal, devido a maior complexidade, tanto da solução simulada quanto das condições intestinais dos ratos, os resultados apresentam as maiores diferenças relativas entre métodos e pouca reprodutibilidade. Segundo os autores, apesar da falta de precisão, essas diferenças não invalidam o teste *in vitro*, que apesar de superestimar a biodisponibilidade, poderia ser aplicado quando não há possibilidade de uma avaliação *in vivo*.

O consórcio para pesquisas em solubilidade e biodisponibilidade (SBRC), fundado em 1997⁸, com o objetivo de validar um método eficaz de bioacessibilidade, propôs um teste bastante simples, chamado SBET³⁹ (simple bioaccessibility extraction test), uma adaptação simplificada do PBET. O SBET apenas faz a simulação da fase gástrica, com solução de ácido clorídrico e glicina, em pH 1,5. Este teste fornece resultados superestimados de bioacessibilidade, devido ao baixo pH do meio e à ausência de uma fase intestinal. Com este método, cerca de 90% do Pb total presente no material de referência certificado de solo SRM 2711 (NIST) foi dissolvido. Este resultado pode ser interpretado como a quantidade máxima de Pb solúvel deste material, nas condições gástricas.

Hamel *et al.*⁴⁰ avaliaram a influência da razão sólido/líquido nos experimentos de bioacessibilidade, com outro material de referência certificado de solos o SRM 2710 (NIST). Ao simular apenas a fase gástrica, com uma solução simples de pepsina e HCl em pH 1,1, obtiveram valores de solubilidade de chumbo entre 36% (1:100), 34% (1:1000) e 42% (1:5000) no solo certificado para as razões sólido líquido indicadas entre parênteses. Os resultados serviram como base para o desenvolvimento de um novo teste⁴¹, mais detalhado e completo, com mais duas etapas, as soluções da boca e do duodeno.

A composição da solução artificial da saliva humana usada foi a sugerida por Fusayama *et al.*⁴² para avaliar a solubilidade de ouro e amálgama em ensaios odontológicos. A solução contém sais inorgânicos (NaCl, KCl, Na₂HPO₄ e CaCl₂), mucina e uréia em pH 5,5. Já a solução gástrica é simulada apenas com HCl e pepsina em pH 1,5 e a solução duodenal contém apenas Na₂HCO₃. Os autores propõem o uso de um balanço de massas, ou seja, um protocolo de cálculos baseado nas solubilidades do Pb em cada etapa da extração (saliva+gástrica e saliva+gástrica+duodenal) e obtém um valor combinado onde está expressa a massa total solúvel de Pb ao longo da simulação. O teste foi aplicado em amostras de solo, rejeitos de metalurgia de Pb e no SRM 2710. A bioacessibilidade de Pb em amostra de solo de Bunker Hill foi de 70% e de 62% para o SRM 2710. Estes resultados foram comparados com estudos de biodisponibilidade executados em humanos pela escola de saúde pública de Columbia, com a amostra de Bunker Hill, porém houve uma grande diferença entre eles, pois apenas 26%, em média, do Pb presente na amostra é biodisponível. Essa discrepância entre os dados de ensaios *in vivo* e *in vitro*, de acordo com os autores⁴¹, poderia estar associada à absorção incompleta das espécies dissolvidas no epitélio intestinal. Esta diferença entre chumbo dissolvido e absorvido provavelmente é a principal limitação dos testes *in vitro*, como substitutos dos testes *in vivo*.

Com o mesmo método⁴¹ Ellickson *et al.*⁴³ quantificaram apenas 10% do Pb do SRM 2710 como bioacessível. Concomitantemente, em testes realizados com ratos, foi obtida biodisponibilidade máxima de 0,9%. De acordo com os autores⁴³, essa diferença pode ser atribuída à grande quantidade de bile secretada pelos ratos, que poderia interferir na especiação e, conseqüentemente, na absorção do chumbo, o que também foi discutido em outros estudos^{27,31}.

A simulação mais complexa e próxima da composição real do suco gastro-intestinal humano é apresentada por Oomem *et al.*⁴⁴, mas ainda sem a atividade dos microorganismos presentes nas partes superior (boca+estômago) e inferior (duodeno+jejuno+íleo) do sistema

digestivo humano. A saliva é simulada com pequenas quantidades de KCl, KSCN, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaCl, NaOH, uréia, mucina, ácido úrico e α -amilase. O suco gástrico é constituído dos mesmos sais inorgânicos usados na simulação da saliva, acrescido de HCl, glicose, ácido glucorônico, uréia, glucoseamina, albumina, pepsina e mucina. O duodeno é simulado com bile extraída de frangos, sais inorgânicos (NaCl, KCl e MgCl), uréia, albumina, pancreatina e lipase. A bioacessibilidade média do Pb presente nos solos testados foi de 54%. Este resultado é semelhante ao obtido com soluções menos complexas.

A fração bioacessível de chumbo pela ingestão de materiais contaminados também pode ser estimada, pela adição de alimentos no ensaio. Schroder *et al.*⁴⁵, simularam a fase gástrica com uma solução de pepsina e HCl, em pH 1,8 e a fase duodenal com NaHCO_3 , extratos de bile e pancreatina e também extrato de proteínas para avaliar a influência do bolo alimentar na solubilidade do Pb. Os resultados mostraram uma bioacessibilidade máxima, na simulação do organismo em jejum, de 64% (meio gástrico) e 3,2% (meio duodenal), com médias de 36% e 1%, respectivamente, num conjunto de 18 amostras de diferentes concentrações (1270 a 14200 mg.kg^{-1}). A adição do extrato de proteínas reduziu a quantidade média de Pb solúvel na etapa gástrica para 23%, com valor máximo de 36%. Estes resultados foram comparados, no mesmo estudo, com os obtidos em ensaios *in vivo* em porcos, aos quais foi administrada a mesma alimentação e os mesmos solos. Os resultados dos dois ensaios apresentaram correlação forte, exceto os da fase duodenal na ausência do extrato de proteínas. Os autores concluíram que o ensaio *in vitro* pode ser usado para estimar a biodisponibilidade relativa de Pb, As e Cd em solos.

A bioacessibilidade do Pb em poeiras oriundas de solos contaminados também pode ser avaliada com testes *in vitro*. Yu *et al.*⁴⁶ aspiraram poeiras de carpetes de residências próximas a um distrito industrial de New Jersey (EUA) e usaram o método proposto por Hamel *et al.*⁴¹. Os resultados indicam elevada solubilidade relativa de chumbo nessas poeiras, com valor de até 77%

(média de 64%) na solução gástrica e de até 32% (média de 12%) na solução duodenal. Estes dados foram diretamente associados ao risco de exposição crônica a esse tipo de material, e por meio do IEUBK²⁸ foi possível correlacionar os níveis de Pb no sangue de crianças expostas a essas poeiras, com a bioacessibilidade do Pb encontrada na simulação gástrica.

Além dos métodos discutidos e revisados neste trabalho, outros podem ser encontrados na literatura. A Tabela 2.2 resume alguns destes trabalhos, com o nome do método, as soluções empregadas e as condições experimentais de cada um deles. Alguns testes, como o DIN e o SHIME, também avaliam o efeito da adição de alimentos (leite, proteínas ou amido) na bioacessibilidade do Pb, simulando as condições gastro-intestinais após a alimentação.

Tabela 2.2 Principais métodos de bioacessibilidade, tipo de experimento, constituintes das soluções simuladas, pH e tempo de contato de cada simulação. Todos testes são executados em temperatura controlada (37 °C), na proporção sólido:líquido (S/L) indicada. O último (TIM) é realizado em fluxo.

Método	Solução simulada	pH	S/L	Tempo (h)	Referência
SBET	Gástrica – Glicina	1,5	1/100	1	39
PBET	Gástrica – Pepsina, ac. málico, ac. acético, ac. láctico e ac. cítrico	2,5	1/100	1	38
IVG	Intestinal – Pancreatina, sais de bile e NaHCO ₃	7,0		3	45
	Gástrica – Pepsina e NaCl	1,8	1/150	1	
	Intestinal – Pancreatina, extrato de bile e NaHCO ₃	5,5		1	
U.S.P	Gástrica – Pepsina e NaCl	1,2	1/100	2	40
MB and SR	Saliva – Mucina, uréia, Na ₂ HPO ₄ , CaCl ₂ , KCl, NaCl	5,5	1/160	5 s	41
DIN	Gástrica – Pepsina e NaCl	1,5	1/2160	2	48
	Intestinal – NaHCO ₃	7,0	1/4770	4	
	Gástrica – Pepsina, mucina	2,0	1/15	2	
	Intestinal – Tripsina, pancreatina e extrato de bile	7,5	1/50	6	
SHIME	Gástrica – Pectina, Nutrilon plus, mucina, amido, cellobiose, glucose, proteose peptona e leite	5,2	1/2,5	3	39
	Intestinal – Pancreatina, blie bovina e NaHCO ₃	6,5	1/4	5	
RIVM	Saliva – Mucina, amilase, uréia, ac. úrico, NaOH, NaCl, KCl, Na ₂ SO ₄ , NaSCN	6,5	1/15	5 min	39
	Gástrica – Pepsina, glucose, ac. glucorônico, glucoseamina, BSA, mucina	1,1	1,40	2	
	Intestinal – Lípase, pancreatina, uréia, BSA e extratos de bile	5,5	1/100	2	
TIM	Saliva – Não especificado	5,0	1/5	5 min	39
	Gástrica – Lípase, pepsina	2,0	1/30	1,5	
	Intestinal – Pancreatina, extrato de bile, NaHCO ₃	7,2	1/50	6	

SBET- Simple Extraction Bioaccessibility Test

PBET- Physiologically Based Extraction Test

IVG- *In vitro* Gastrointestinal model

U.S.P- U.S. Pharmacopoeia gastric model

MB and SR- Mass Balance and Soil Recapture

DIN- Static Gastrintestinal model

SHIME- Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystems of Infants

RIVM- *In Vitro* Digestion model

TIM- Dynamic Gastrointestinal model

A Tabela 2.3 apresenta uma comparação dos resultados de bioacessibilidade de Pb, em solos, apresentados na literatura. Os trabalhos podem apresentar algumas diferenças quanto à execução do método, como o tipo de agitação da solução+amostra, separação das frações e

técnica analítica usada para determinar o chumbo na fração solúvel, mas de modo geral, apresentam os princípios dos métodos originais.

Tabela 2.3: Comparação de resultados de bioacessibilidade de Pb (valores mínimos e máximos) obtidos em solos contaminados, suas respectivas concentrações e método utilizado.

Tipo de amostra	Concentração (mg kg ⁻¹)	Método	Fluido simulado	Pb bioacessível (%)	Referência
Solo (poeiras)	2600	PBET	Gástrico	77	49
Solos	1600-16200	PBET	Gástrico	11-37	50
Solos	400-4000	PBET	Gástrico + Duodenal	13-64	51
Solos	150-4800	SBET	Gástrico + Duodenal*	0,5-85	52
Solos	4000-7000	W-PBET**	Gástrico + Duodenal	12-27	53
Solos	215-1580	SBET	Gástrico	46-50	54
Solos	500-5000	Hamel ^{40,41}	Gástrico	50-80	55

* Simulação duodenal feita com NaHCO₃

** PBET adaptado para simulação do trato gastro-intestinal de gansos

2.6 Conclusões

A presença de materiais contaminados em locais habitados ou remotos é indesejável à biota. Mas com frequência a sociedade se depara com a presença de concentrações anômalas e elevadas de elementos tóxicos em locais habitados. A origem destas anomalias pode ser geológica, mas muitas vezes é antrópica e, em geral, o risco associado deve ser avaliado. No caso do chumbo, bem como de muitos outros elementos-traço, a presença de elevadas concentrações em solos, por si só não é suficiente para tirar conclusões, pois a biodisponibilidade depende da sua especiação na matriz considerada.

A determinação da(s) fase(s) em que se encontra o chumbo idealmente é feita por meio de técnicas instrumentais, mas muitas vezes a concentração individual das fases não é suficiente para a identificação e a mistura de fases também pode adicionar dificuldades adicionais à caracterização. Apesar disto, a avaliação de risco objetiva responder se a ingestão acidental dos

solos ou de suas poeiras implica em absorção do chumbo pelo organismo humano, especialmente por crianças, que são mais suscetíveis. Extrações sequenciais podem ser úteis na avaliação da solubilidade das frações com chumbo, mas não respondem à questão da solubilidade em condições gastro-intestinais.

Para efeito de avaliação de risco, os órgãos gestores do meio ambiente empregam dados de biodisponibilidade realizados com cobaias. Mas os testes *in vivo*, pelas suas características, requerem infra-estrutura e pessoal especializados, demandam tempo e são caros.

Para superar essas limitações, vários ensaios de bioacessibilidade ou testes *in vitro*, executados em condições que tentam simular as condições físico-químicas do trato gastro-intestinal humano, foram propostos, testados e muitas vezes validados por comparação com resultados de testes *in vivo*. Os resultados destes ensaios são reprodutíveis e apesar de muitas vezes superestimarem a biodisponibilidade, são úteis porque a estimam de maneira confiável e rápida. Os testes de bioacessibilidade *in vitro* despertam grande interesse e empregam materiais e reagentes facilmente encontrados e possibilitam a avaliação de muitas amostras simultaneamente. Apesar disto, vários aspectos ainda devem ser melhorados, principalmente no que se refere às diferenças com os resultados de ensaios *in vivo*, a fim de limitar o uso destes.

2.7 Referências

1. Paoliello, M. M. B.; De Capitani, E. M.; *Rev. Environ. Contam. T.* **2005**, 184, 59
2. Wedepohl, K. H.; *Geochim. Cosmochim. Ac.* **1995**, 59, 1217
3. Moreira, F. R.; Moreira, J. C. *Pan American Journal of Public Health.* **2004**, 15, 119; Barbosa Jr., F.; Tanus-Santos, J.E.; Gerlach, R.F.; Parsons, P.J. *Environ. Health Persp.* **2005**, 113, 1669
4. Strydom, C.; Robinson, C.; Pretorius, E.; Whitcutt, J.M.; Marxand, J.; Bornman, M.S.; *Water SA.* **2006**, 32, 543
5. Claudio, E. S.; Goldwin H. A.; Magyar J. S.; Em *Progress in Inorganic Chemistry* 51, Karlin K. D. ed. John Wiley Sons: Londres, **2003**, 51,1

6. Koller, K.; Brown T.; Spurgeon J.; Levy, L.; *Environ. Health Persp.* **2004**, *112*, 987
7. Oomen, A. G.; Tolls, J.; Sips, A. J. A. M.; Groten, J. P.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, *44*, 116
8. Ruby, M. V.; Schoof, R.; Brattin, W.; Goldade, M.; Post, G.; Harnois, M.; Mosby, D. E.; Casteel, S. W.; Berti, W.; Carpenter, M.; Edwards, D.; Cragin, D. W.; Chappell, W.; *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 3697
9. Brown, G. E. Jr; Foster, A. L.; Ostergren, E.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 3388
10. http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/3_series.htm, acessado em dezembro de 2006
11. Manceau, A.; Boisset M.; Sarret, G.; Hazemann, J.; Mench, M.; Cambier, P.; Prost, R.; *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 1540
12. Davis, A.; Ruby, M. V.; Bergstrom, P. D.; *Environ. Sci. Technol.* **1992**, *26*, 461
13. Ostergren, J. D.; Brown G. E. Jr; Parks, G. A.; Tingle, T. E.; *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 1627
14. Bargar, J. R.; Towle, S. N.; Brown, G. E. Jr; Parks, G. A.; *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *185*, 473
15. Tessier, A.; Campbell, P. G. C.; Bisson, M.; *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 844
16. Kim, N. D.; Fergusson J. E.; *Sci. Total Environ.* **1990**, *105*, 191; Sims, J. T.; Kline, J. S.; *J. Environ. Qual.* **1991**, *20*, 387; Sheppard, M. I.; Thibault D. H.; *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1992**, *56*, 415
17. Gleyzes, C.; Tellier, S.; Astruc, M.; *Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 461; Hlavay, J.; Prohaska, T.; Weisz, M.; Wenzel, W. W.; Stingeder, G.J.; *Pure Appl. Chem.*, **2004**, *76*, 415
18. Ure, A.; Quevauviller, P.; Muntau, H.; Griepink, B.; *Int. J. Environ. An. Ch.* **1993**, *51*, 135
19. Quevauviller, P.; Rauret, G.; Muntau, H.; Ure, A. M.; Rubio, R.; LopezSanchez, J. F.; Fiedler, H. D.; Griepink, B.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1994**, *349*, 808
20. Rauret, G.; Lopez-Sanchez, J. F.; Sahuquillo, A.; Rubio, R.; Davidson, C.; Ure, A.; Quevauviller, P.; *J. Environ. Monitor.* **1999**, *1*, 57
21. Baffi, F.; Ianni, C.; Ravera, M.; Soggia, F.; Magi, E; *Anal. Chem. Acta.* **1998**, *360*, 27
22. Environmental Protection Agency, USA. **1994**. *Method 1311 – Toxicity Characteristic Leaching Procedure*. 35 pp
23. Sandstea, H. H.; *P. Soc. Exp. Biol. Med.* **1967**, *124*, 18
24. Ruby, M. V.; Davis, A.; Link, T. E.; Schoof, R.; Chaney, R. L.; Freeman, G. B.; Bergstrom, P.; *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, 2870
25. Dacre, J. C.; Haar, T.; *Environ. Contaminants Toxicol.* **1977**, *6*, 11
26. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD Guideline 407*. **1995**; *OECD Guideline 408*. **1998**; *OECD Guideline 409*. **1998**
27. Hettiarachchi, G. M.; Pierzynski, G. M.; *Environ. Prog.* **2004**, *23*, 78
28. Environmental Protection Agency, USA. **2002**. *User's guide for the integrated exposure uptake biokinetic model for lead in children (IEUBK)*. 56 pp
29. Heard, M. J.; Chamberlain, A. C.; *Sci. Tot. Environ.* **1983**, *30*, 245
30. Lanphear, B. P.; Matte, T. D.; Rogers, J.; Clickner, R. P.; Dietz, B.; Bornschein, R. L.; Succop, P; Mahaffey, K. R.; Dixon, S.; Galke, W.; Rabinowitz, M.; Farfel, M.; Rohde, C.; Schwartz, J.; Ashley, P.; Jacobs, D. E.; *Environ. Res.* **1998**, *79*, 51

31. Freeman, G. B.; Johnson, J. D.; Killinger, J. M.; Liao, S. C.; Feder, P. I.; Davis, A. O.; Ruby, M. V.; Chaney, R. L.; Lovre, S. C.; Bergstrom, P. D.; *Fund. Appl. Toxicol.* **1992**, *19*, 388
32. Schoof, R. A.; Butcher, M. K.; Sellstone, C.; Ball, R. W.; Fricke, J. R.; Keller, V.; Keen, B.; *Environ. Geochem. Hlth.* **1995**, *17*, 189
33. Casteel, S. W.; Cowart, R. P.; Weis, C. P.; Henningsen, G. M.; Hoffman, E.; Brattin, W. J.; Guzman, R. E.; Starost, M. F.; Payne, J. T.; Stockham, S. L.; Becker, S. V.; Drexler, J. W.; Turk, J. R.; *Fundam. Appl. Toxicol.* **1997**, *36*, 177
34. Intawongse, M.; Dean, J. R.; *Trend. Anal. Chem.* **2006**, *25*, 876
35. Basta, N.; Gradwohl, R. *J. Soil Contam.* **2000**, *9*, 149
36. Oomen, A. G.; Tolls, J.; Sips, A. J. A. M.; Van den Hoop, M. A. G. T. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, *44*, 107.
37. Guyton, A. C., Hall, J. E. **2006**. *Tratado de Fisiologia Humana*, 11^o ed. 1264pp
38. Ruby, M. V., Davis, A., Schoof, R., Eberle, S., Sellstone, C. M. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 422
39. Oomen, A. G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, S. C., Schoeters G., Verstraete, W., Van de Wiele, T., Wragg, J., Rompelberg, C. J. M., Sips, A., Van Wijnen J. H. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 3326
40. Hamel, S. C., Buckeley, B., Lioy, P. J. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 38
41. Hamel, S. C., Ellickson, K. M., Lioy, P. J. *Sci. Tot. Environ.* **1999**, *243*, 273
42. Fusayama, T.; Katayori, T.; Nomoto, S.; *J. Dent. Res.* **1963**, *42*, 1183
43. Ellickson, K. M., Meeker, R. J., Gallo, M. A., Buckley, B. T., Lioy, P. J. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2001**, *40*, 128
44. Oomen, A. G., Rompelberg, C. J. M., Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G, Pereboom, D. P. K. H., Sips, A. J. A. M. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, *44*, 281
45. Schroder, J. L., Basta, N. T., Casteel, S. W., Evans, T. J., Payton, M. E., Si, J. J. *Environ. Qual.*, **2004**, *33*, 513
46. Yu, C. H., Yiin, L., Lioy, P. J. *Risk Analysis.* **2006**, *1*, 125
47. U. S. Environmental Protection Agency. EPA540-K-01-005. Washington, DC: U.S. EPA. **2002**
48. Hack, A.; Selenka, F.; *Toxicol. Lett.* **1996**, *88*, 199
49. Sonmez, O.; Pierzynski, G. M.; *Water Air Soil Poll.* **2005**, *166*, 3
50. Carrizales, L.; Razo, I.; Tellez-Hernandez, J. I.; Torres-Nerioa, R.; Torres, A.; Batres, L. E.; Cubillas, A. C.; Diaz-Barriga, F.; *Environ. Res.* **2006**, *101*, 1
51. Lee, S. W.; Lee, B. T.; Kim, J. Y., Kim, K. W., Lee, J. S. *Environ. Mon. Assess.* **2006**, *119*, 233
52. Navarro, M. C.; Perez-Sirvent, C.; Martinez-Sanchez, M. J.; Vidal, J.; Marimon, J; *Chemosphere*, **2006**, *63*, 484
53. Furman, O; Strawn, D. G.; Heinz, G. H.; Willians, B.; *J. Environ. Qual.* **2006**, *35*, 450
54. Edwin F.; Barth, E. F.; Succop, P. A.; Evans, M. L.; *Environ. Mon. Assess.* **2005**, *110*, 257
55. Kientz, K.; Jimenez, B. D.; Perez, L.; Rodriguez-Sierra, C. J.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, *70*, 927

Parte 3.

BIOACESSIBILIDADE DO CHUMBO EM SOLOS E REJEITOS

Este Capítulo contém um manuscrito de artigo submetido com os dados bioacessibilidade obtidos nas amostras de solos e rejeitos da área do estudo. O manuscrito é precedido de informações adicionais como o mapa com os locais de amostragem e alguns dados analíticos, apresentado a seguir.

As amostras de solo e rejeitos usadas foram coletadas na Vila Mota, município de Adrianópolis/PR, em duas etapas de campo, em agosto de 2002 e março de 2004. Os pontos de amostragem são identificados na Figura 3.1. Das oito amostras de solos, seis foram coletadas tomando pequenas quantidades da camada mais superficial dos solos, entre 0-1 cm de profundidade, livre da vegetação aparente e das frações mais grosseiras (Figura 3.2). Cada amostra composta, retirada de forma aleatória, representa uma área de aproximadamente 100 m². Os pontos de coleta escolhidos foram próximos às casas, ao longo da margem da principal estrada da vila (Figura 3.3) e próximas às pilhas de rejeitos e escória (Figura 3.4)

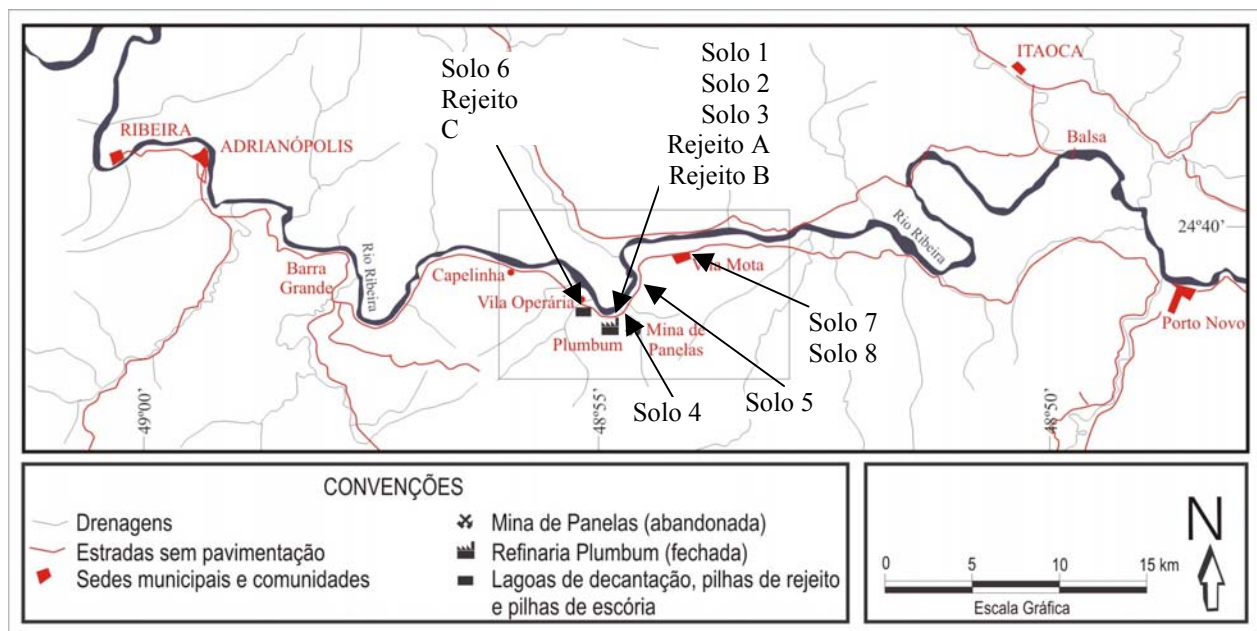


Figura 3.1: Mapa de localização da coleta das amostras de solos e rejeitos.



Figura 3.2: Raspagem da camada mais superficial do solo para a coleta das amostras de solos compostas (Solo 4).



Figura 3.3: Coleta de amostra composta de solos superficiais às margens da principal via de acesso à Vila Mota (a esquerda). No canto superior direito é possível visualizar uma habitação típica da vila, muito próxima à estrada (Solo 5).



Figura 3.4: Ponto de coleta da amostra de solo superficial Solo 6, coletada as margens da estrada de acesso à Vila Mota, que se encontra entre as pilhas de rejeito de mineração e separação mineral e da pilha de escória do forno de metalurgia.

Em dois locais, além das amostras da camada mais superficial, também se coletou amostras de profundidades de 0-15 cm e de 15- 30 cm. A primeira destas amostras (Figura 3.5) foi coletada em um local à frente da usina desativada, próxima à entrada de caminhões e de uma pequena estação de tratamento de efluentes (Figura 3.6); a segunda amostra foi coletada no quintal de uma casa distante 1,2 km da usina desativada (Figura 3.7), utilizado também para o cultivo de hortaliças e frutas pelos moradores.



Figura 3.5: Amostra de solo coletada em frente a usina, denominadas Solo 1, 2 e 3 sendo elas a camada superficial, 1 a 15 cm de profundidade e 15 a 30 cm de profundidade, respectivamente.



Figura 3.6: Vista da estação de tratamento de efluentes da usina Plumbum S.A., localizada em frente a antiga usina (ao fundo), às margens da principal estrada da Vila Mota.



Figura 3.7: Local de coleta da segunda amostra (Solo 7 e 8) pontual de solo (ao fundo).

Quatro amostras de rejeito foram coletadas para avaliação da solubilidade do Pb associado a essas fases, nas condições gastro-intestinais simuladas em laboratório. Duas amostras foram coletadas em uma pequena pilha de rejeitos localizada em frente da usina desativada. O material de cor cinza escuro foi interpretado como o rejeito original (Figura 3.8, Rejeito A), enquanto o material de cor esverdeada, apresenta indícios de alteração (Figura 3.9, Rejeito B). Outras duas amostras foram coletadas nas pilhas de rejeito de mineração e beneficiamento (amostra Rejeito C) e da pilha de escória de metalurgia (amostra Escória), já ilustradas no Cap. 1, nas Figuras 1.7 e 1.8, respectivamente.



Figura 3.8: Pilha de rejeitos localizada a frente da usina Plumbum, com sinais de alteração, em verde (amostra Rejeito B). Ao redor da área alterada, o rejeito inalterado coletado (amostra Rejeito A).



Figura 3.9: Detalhe da área com sinais de alteração na pilha de rejeitos localizada à frente da Usina Plumbum (Rejeito B).

As amostras foram secadas à temperatura ambiente por 15 dias e a fração menor que 180 μm foi separada por peneiramento vibratório. A composição química total das amostras foi determinada por espectrometria de fluorescência de raios X (FRX). A Tabela 3.1 contém dados dos elementos-traço, exceto os de chumbo, que são apresentados no manuscrito a seguir.

Tabela 3.1: Elementos-traço determinados por FRX nas amostras de solos e rejeitos coletados na Vila Mota (Adrianópolis/PR)

Amostra	As	Ba	Cr	Cu	Zn	Cd
(mg kg ⁻¹)						
Solo 1	1370	2850	105	5490	9180	90
Solo 2	407	799	81	1500	2210	50
Solo 3	259	573	88	938	1320	43
Solo 4	130	1250	315	86	299	< 20
Solo 5	162	2140	117	121	2000	< 20
Solo 6	362	9340	106	1280	4310	120
Solo 7	< 12	1450	141	87	122	< 20
Solo 8	< 12	1570	97	35	120	< 20
Rejeito A	4640	2480	122	2,0(%)	9,5(%)	560
Rejeito B	3590	4550	90	19,0(%)	3,2(%)	315
Rejeito C	901	13,9(%)	100	200	6760	< 20
Escória	2330	3680	220	2270	13,1(%)	700

3.1 Bioaccessible lead in soils, slag and mine wastes from an abandoned mining district in Brazil

Abstract: The incidental ingestion of contaminated soils and dusts is considered a major route of Pb uptake by humans. To become bioavailable, lead needs to become bioaccessible, i.e., it must be soluble during digestion. *In vitro* methods, which simulate human gastrointestinal conditions, were used to determine bioaccessible lead in contaminated soils, mining and slag wastes, collected around a smelter plant in a rural area in Southeastern Brazil. During approximately 50 years, this area was continuously contaminated by lead derived from mining and refinery activities. Lead concentrations in soil and solid waste samples ranged from 0.03 to 4.1 % and 1.2 to 15 %, respectively. In average, 70% of the lead was soluble in three different simulated gastric solutions (pH 1.5 and 1.7). In gastrointestinal solutions (pH 6.9), Pb solubility range decreased to 2-22% for all samples. These results indicate that if soils and dusts of the area are ingested, most of it's lead will solubilize in stomach, and a part of it will remain soluble in duodenum, i.e., could be available for absorption. These data may explain Pb levels in blood of residents of the area, measured in a previous study conducted by other authors.

3.1.1 Introduction

The historical widespread use of lead and its compounds yielded one of the most well known records of anthropogenic input of a toxic element (Hong *et al.* 1994). Anthropogenic inputs of lead in the environment are strongly correlated with the use of Pb and associated metals (e.g., Ag and Zn). Since antiquity adverse effects on human health by exposure to lead were known but they were well established during the last century (ATSDR, 2000). For this reason, sources of contamination require monitoring and decision makers need risk assessment data.

Soils are repositories for lead (WHO, 1995) and high levels of this element should be

scrutinized and evaluated regarding availability. The incidental ingestion of fine particles of contaminated soils is believed to be the major route for human Pb intake (Calabrese *et al.*, 1999), especially by children, because of their hand-to-mouth behavior (Ruby *et al.*, 1993). According to the U.S. Environmental Protection Agency (EPA), a typical child can swallow 100 mg of contaminated soil/day. This is a reference value when lead uptake is modeled for children up to 84 months age (U.S. EPA, 2002). But uptakes are variable and depend on children age and surrounding environment (LaGoy, 1995). In extreme cases, like pica behavior, 50 g of soil can be ingested per day (Calabrese *et al.*, 1999). Older children rarely present pica behavior, but in poor and highly contaminated areas, sub-nutrition and direct contact with wastes and soils are common, so incidental ingestion must also be considered.

If ingested, lead minerals and compounds are partial or totally soluble, depending on their reactivity under gastrointestinal (GI) conditions. The fraction of bioavailable lead is given by the total amount of lead that reaches the blood stream and human organs (Ruby *et al.*, 1999) and depends on the speciation of lead in the system under concern (Brown *et al.*, 1999).

Since it was realized that oral lead intake is so relevant to human contamination, this exposure route has been extensively studied (Ruby *et al.*, 1999). *In vivo* experiments were carried out to evaluate the degree of lead absorption, similarly to tests used to estimate the bioavailable fraction of toxic compounds or drugs. Specifically for lead, the results of *in vivo* tests measure the fraction of lead that reaches organs like kidneys, liver, bones and blood, after oral administration to mammals [(e.g., rats (Freeman *et al.*, 1992), rabbits (Ruby *et al.*, 1993), monkeys (Freeman *et al.*, 1995) and pigs (Schroder *et al.*, 2004). *In vivo* tests are considered the best way to assess bioavailability and risk evaluation, but they are expensive, time consuming and demand specialized people and infra-structure to deal with animals.

Instead of experiments with animals, Ruby *et al.* (1993, 1996) used *in vitro* tests which

simulate the conditions of the human digestion and measured the amount of lead soluble if contaminated soils are ingested. These bioaccessibility tests allow the rapid and cost effective risk assessment of soil ingestion from contaminated sites.

The bioaccessibility tests are chemical extractions performed with solutions that mimic the composition of biofluids active during digestion. Other conditions, like pH, temperature, solid/liquid ratio, GI fluid composition and transit time are also considered (Ruby *et al.* 1996, Hamel *et al.*, 1998, Oomen *et al.*, 2003). Results of these tests can provide preliminary information and guidance for more complex analysis, e.g., *in vivo* assessment methods. Bioaccessibility tests are also used to evaluate the results of *in situ* lead amendment techniques. For example, lead present in soils can become less bioavailable by reaction with phosphate compounds (Hettiarachchi and Pierzynski, 2004).

Comparisons between results of *in vitro* and *in vivo* tests showed that the first overestimate bioavailability, i.e., the amount of soluble lead tends to be higher than the absorbed amount (Ruby *et al.*, 1993, Schroder *et al.*, 2004, Ellickson *et al.*, 2001). Data from bioaccessibility tests can be regarded as the maximum amount of lead soluble under gastrointestinal conditions are useful when *in vivo* tests cannot be carried out. The *in vitro* methods are fast, relatively inexpensive and can be applied to several matrices, like soils (Oomen *et al.*, 2002), house dusts (Oliver *et al.*, 1999, Yu *et al.*, 2006) and industrial wastes (Gasser *et al.*, 1996, Davis *et al.*, 1997).

In Brazil, lead is widely used like elsewhere but soils with high concentration are mainly reported close to few smelting/mining plants or recycling battery factories. Scientific reports about Pb impacted areas and possible health effects are scarce (Paoliello and De Capitani, 2005). No bioavailability study was conducted up to now in any of known impacted areas.

One of these areas, the focus of the present study, is located in the Southeast of the country, at the border between Paraná and São Paulo states, where during decades lead mining, smelting and refining activities produced soilborne particles, mine tailings and solid wastes containing high levels of Pb and also related elements. During the last years of activity of this plant, which was closed in 1995, wastes were piled up beside the road which gives access to the nearby village and also close to the margin of the local river. Before that, wastes were disposed directly in the river and while the plant was active, gases were emitted to the atmosphere.

Anomalous concentrations of Pb in water and sediments of the area were reported since the 80's decade (Eysink, 1988). Pb-blood levels of inhabitants of the village close to the former plant were measured in two studies carried out by Paoliello *et al.* (2002, 2003). In the first work, 60% of children at school age (7-14 years old) from the community near the lead refinery had Pb blood levels above 10 $\mu\text{g dL}^{-1}$. High blood levels in adults (Paoliello *et al.* 2003) showed significant association with living close to lead refinery, former occupational activities at the refinery village, male gender, smoking habits and consumption of fruits from home backyards. Soils analysis showed concentrations of lead up to 916 mg kg^{-1} (Cunha 2003), and much higher values for wastes, but no clear contamination route to local inhabitants was established. Some household dusts, collected in local residences where children presented blood levels above 20 $\mu\text{g dL}^{-1}$, contained concentrations of lead varying from 218 to 3268 mg kg^{-1} (De Capitani, 2001 - personal communication). It is known that the shell of a building provides little, if any, filtration of airborne particles present in ambient air (Thatcher and Layton 1995). Additionally, in the area of the study, the doors and windows of the houses are frequently kept open and soils are not covered with pavement and also children frequently play outside. The frequent contact with soil borne materials suggests that this media has to be investigated regarding bioavailability.

In this study, we measure the bioaccessibility fraction of lead in soils collected on the side of unpaved road, on backyards of some houses and also of wastes deposited beside the road, near the abandoned smelting and refining plant, in order to provide evidence about the probable sources for reported high blood Pb levels. Three different bioaccessibility tests are used (Ruby *et al.*, 1996, Hamel *et al.*, 1998, Oomen *et al.*, 2002), sometimes with minor modifications.

3.1.2 Materials and Methods

Soils and wastes were collected considering that four types of Pb-bearing materials impacted the area and contribute to the samples complexity: (i) wastes from Pb-rich carbonate rock with the sulfide ore; (ii) tailings from the flotation process; (iii) slag from smelting and (iv) wet and dry deposition originated from emissions of smelter and refinery.

Eight samples of soils, either comprising composite top-soils (0-1 cm) and deeper layers (up to 30 cm) were collected. During sampling of the composite top-soil, only the finest fraction of the soils was taken, assuming that this fraction is more easily suspended, during motion, like walking, children playing and by wind or vehicle movement. Deeper layers were sampled in order to compare their lead concentration with that of top-soils. Four smelter and mine waste samples were collected directly from the piles where they are deposited (Fig. 1). For comparison, two lead minerals [PbS (galena) and $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ (pyromorphite)] and three synthetic compounds of lead (PbCO_3 , PbNO_3 and Pb_3O_4) were also tested in the bioaccessibility study. NIST certified soil reference material SRM 2710 was also used in order to compare Pb bioaccessibility results with data formerly published in literature.



Figure 3.10: Waste C and slag pile close to the abandoned smelting plant. The picture shows the sampled unpaved road between the two waste piles and that gives access to the village.

3.1.2.1 Sample pretreatment and characterization.

All samples were air-dried at 298 K to prevent dehydration of the surface-bound metal species and to reduce artifacts from sample processing. Samples were thoroughly mixed and sieved to separate the $<180\ \mu\text{m}$ fraction, except for soil certified reference material (SRM 2710, NIST), which is provided in $<75\ \mu\text{m}$ particle size, and the slag sample, a coarser vitrified material, which had to be grinded to $<180\ \mu\text{m}$. This size fraction was chosen because it has been shown that smaller particle sizes adhere more easily to children's hands (Hettiarachchi and Pierzynski, 2004).

Whole elemental analysis was made by wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry (WD-XRF) on pressed pellets (Enzweiler and Vendemiatto, 2004). Total extractable lead was obtained after hot plate aqua regia digestion (Chen and Ma, 2001) and atomic absorption spectrometry measurement. Portions of the samples were examined by backscattering scanning electron microscopy (SEM) and analyzed with the coupled energy dispersive detector (EDS). Main mineral phases were identified by X-ray diffraction (XRD).

3.1.2.2 Bioaccessibility tests

The first oral bioaccessibility test used in this work is similar to the Simple Bioaccessibility Extraction Test (SBET) used by Oomen *et al.* (2002) and mimics a fasting condition of stomach media. It consists in determining the amount of soluble lead when the sample reacts with an acidic single aminoacid solution. In Teflon bottles, 1.0 g of sample were mixed with 100 ml 0.4 mol L⁻¹ glycine solution, previously acidified to pH 1.5 with HCl. The bottles were closed with their lids, placed in a thermostatic bath at 37 °C and left under a very low (100 rpm) constant orbital agitation, during 1 h. This is the average transit time of chyme, i.e., the complex digestive slurry after food ingestion in human stomach.

The second test used also simulates fasting conditions and mimics the GI fluid with a solution that contains 3.2 g pepsin, 7.0 mL of concentrated HCl and 2.0 g NaCl in 1 L of ultrapure water (Hamel *et al.*, 1998). The solutions obtained after the acidic extraction simulations (glycine and pepsin) were neutralized to pH 7.0 by adding a 0.2 mol.L⁻¹ of NaHCO₃ solution. This is the pH of human duodenum, after the secretion of buffering substances like bicarbonate and organic bile salts (Oomen *et al.*, 2003). The vessels with the slurry were left under orbital agitation for 2 h, at 37 °C. Liquid phases were separated by centrifugation, at 5000 rpm for 20 min, and the amount soluble lead was determined by atomic absorption spectrometry (AAS) with appropriate matrix matching.

The third method employed in this work is a more complex solution and more realistic GI *in vitro* simulation, proposed by Ruby *et al.* (1993, 1996) and known as physiological based extraction test (PBET). This test provides results of lead solubility in human-like biofluids, constituted by organic acids, enzymes and bile salts. The experimental arrangement was modified, i.e., some simplifications were introduced. Teflon vessels, slow orbital rotation in a thermostatic bath and titration of sodium bicarbonate solution were used instead of separation

funnels, argon flux to mimic peristaltic movements and dialysis bags to increase pH, respectively. Gastric solution was prepared using with 1 L of deionized water, 1.25 g of pepsin (Vetec), 0.5 g of citric acid (Merck), 0.5 g of malic acid (Merck), 420 μL of syrup lactic acid (Merck) and 500 μL of glacial acetic acid (Merck). Final pH was adjusted to 1.7 with HCl. Intestinal solution was prepared by titrating the gastric solution to pH 7.0 with a supersaturated NaHCO_3 solution and 70 mg of bile salts (Aldrich Chemical) and 20 mg of pancreatin (porcine - Nuclear). Reaction time in stomach and intestinal simulations (1 and 2 hour, respectively), solid-solution ratio (1:100), separation and soluble lead quantification (AAS) were the same of used in the previous conducted tests. Bioaccessibility tests are schematically presented in Figure 3.11.

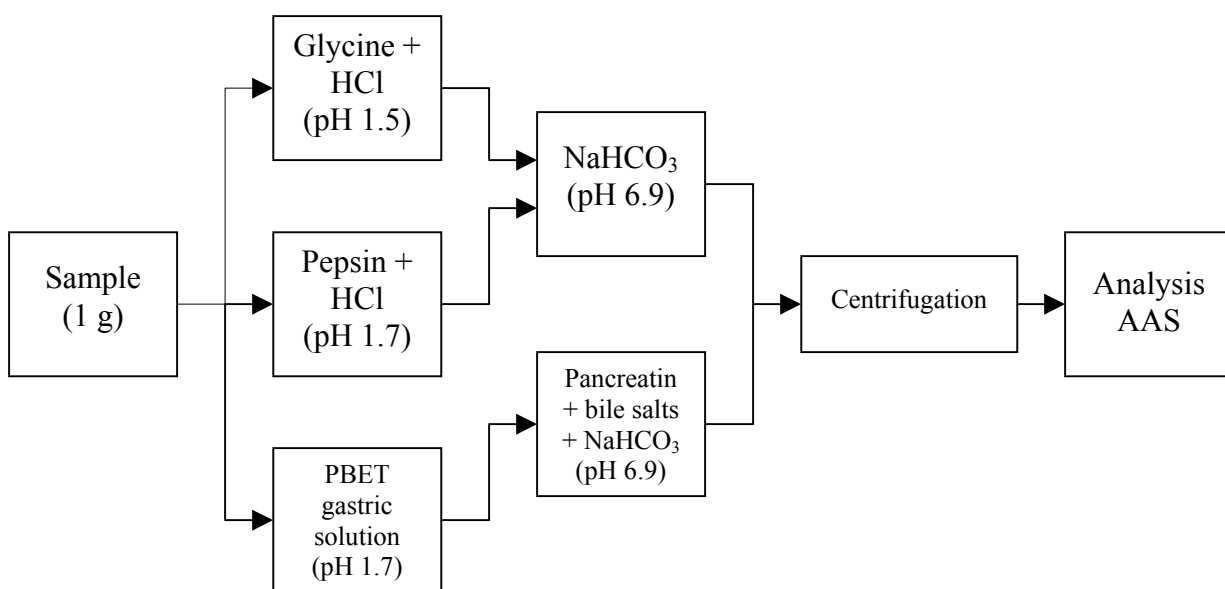


Figure 3.11 Schematic representation of the procedure of bioaccessibility tests, separation and soluble metal quantification methods

All tests were conducted in triplicate, except when indicated, and all chemicals were

analytical grade. The method detection limits (MDL) for *in vitro* tests was calculated with $n=12$. The standard deviation (SD) of blank readings was $\pm 0.45 \text{ mg L}^{-1}$ in average, so $\text{MDL} = 1.4 \text{ mg L}^{-1}$. Precision was evaluated by analysis of quadruplicates in selected samples, and method accuracy after aqua regia extraction was evaluated by lead determination in the certified reference materials SRM 2710 and SRM 2711.

3.1.3 Results and Discussion

3.1.3.1 Chemical and mineral characterization

Table 3.2 contains data of total amount of Pb from soils (S1-S8), wastes and slag samples by FRX, the approximate distance from the former plant to where they were collected, sampling depth and main mineralogical composition obtained by XRD. All results refer to the fraction $< 180 \text{ }\mu\text{m}$. Composite top soils (0-1 cm depth) were collected along the sidewalk of the unpaved road, which is subject to vehicle traffic, in front of smelting plant (S4), inside village streets (S5) and on waste pile (S6), which is deposited beside the road, in opposite direction of worker's village. All composite soils contain high lead concentration, with a mean of 16000 mg kg^{-1} . Samples S1, S2, S3, S7 and S8 were collected at depths up to 15 cm and from 15 cm to 30 cm, to compare their amount of lead with top-soils (0-2 cm depth). S1, S2 and S3 are samples collected at the same place, but at different depths. The top-soil (S1) contains more Pb (4.1 %) than the deeper samples S2 and S3 (1.3 % and 0.82 %, respectively). A similar relation was found for S7 and S8 samples, a top-soil and its respective deeper counterpart.

Table 3.2: Soil (S1-S8), waste and slag samples total Pb concentration, the distance from the former plant, a short description and main minerals phases detected by XRD.

Sample ID	Pb content (mg kg ⁻¹)	Distance to source (m)	Sample description (depth)	Main phases
Soil 1	41200	50	Top-soil (0-1 cm)	Smectite, tremolite, hornblende, cordierite
Soil 2	13100	50	Core sample (15 cm)	Smectite, actinolite, hornblende
Soil 3	8200	50	Core sample (30 cm)	Smectite, microcline, orthoclase
Soil 4	17550	100	Composite top-soil*	Smectite, quartz, biotite
Soil 5	11950	200	Composite top-soil*	Smectite, albite, biotite
Soil 6	19500	500	Composite top-soil*	Albite, biotite, hornblende, quartz
Soil 7	680	1200	Top-soil (0-2 cm)	Smectite, quartz, tremolite, biotite
Soil 8	390	1200	Core sample (15 cm)	Calcite, albite, hornblende, biotite
Waste A	15.0 (% m/m)	20	Concentrated waste	Cerussite (PbCO ₃), PbO, jarosite
Waste B	8.7 (% m/m)	20	Upper, weathered layer of a concentrated waste pile	PbO, plumbojarosite [PbFe ₆ (SO ₄) ₄ (OH) ₁₂], beudantite [PbFe ₃ (AsO ₄)(SO ₄)(OH) ₆], plumbogummite [PbAl ₃ (PO ₄) ₂ (OH) ₅ ·(H ₂ O)]
Waste C	1200	500	Flotation waste	Barite, lanarkite (PbSO ₄ ·PbO), calcite
Slag	3.3 (% m/w)	500	Slag	PbO, Fe ₂ O ₃ , TiO ₂

*Composite soil sample refers to the most surface and fine fraction of the soil. Samples were collected at very shallow depths (0 to 1 cm), and only the finer fraction was taken, representing the particles which contributes to street and house dusts.

Aqua regia attack resulted in 91% and 98% Pb recoveries for S1-S8 soil samples, while for wastes and slag the whole Pb of the samples was extracted, compared to total amount quantified by FRX. Mean (n=2) recoveries of 97% and 98% were obtained for SRM 2710 and SRM 2711 reference materials.

Beside lead, in waste and slag samples high levels of other toxic elements were also detected by XRF. For example, 3600 mg kg⁻¹ of arsenic was determined in Waste B, which explains the identification of an arsenic phase (beudantite) in this sample. The slag sample has As (1200 mg kg⁻¹) and Cd (700 mg kg⁻¹). These elements were not determined in the bioaccessibility test solutions.

S1 sample showed high lead concentration (4.1% w/w) and by XRD uncommon minerals soils (e.g. cordierite) were detected. S1 was taken in front of refining plant, and S2 and S3 are

deeper soil layers taken at the same place. Probably these materials are a complex mixture, i.e., formed by local soil and waste materials from the flotation and the roasting process, to convert galena into PbO. No Pb-phases could be identified by XRD in the soil samples, but by SEM backscattered images and EDS analysis, particles with Pb were identified in all samples, except in S7 and S8 aliquots, probably due to their lower whole Pb concentration ($< 1\%$ w/w). In general, it is accepted that individual phases in complex mixtures can just be identified by common XRD, if their concentration is more than 5%. Sample heterogeneity can explain the identification of lead phases in some test portions, like in Waste C, which contains just 0.12% Pb. In Waste A, cerussite (PbCO_3) and by-products from the pyrometallurgical process (PbO) were identified by XRD. Lead phases in Waste B consisted of lead oxide (PbO) and secondary lead phases, like plumbojarosite, beudantite and plumbogummite, probably derived from weathering reactions in the waste piles. In Waste C just a secondary lead mineral (lanarkite = $\text{PbSO}_4 \cdot \text{PbO}$) was identified by XRD, but other lead phases are probably present. The slag material, also derived from pyrometallurgy, consisted of metallic oxides (e.g., PbO, Fe_2O_3 , TiO_2).

The main lead species in the soils could not be identified by XRD, but from SEM-EDS semi-quantitative results it seems that lead appears to be mostly associated to clay-minerals particles (Figure 3.12) and no isolated lead phase could be identified, in the examined portions of the sample. In Waste A (Figure 3.13), particles with Pb were easily identified, together with other minerals, with composition similar to those detected by XRD (Table 3.2). In the slag sample (Figure 3.14), Pb-oxide is the major species found in the SEM-EDS analysis, as well as by XRD. Metallic Pb was also identified in slag sample.

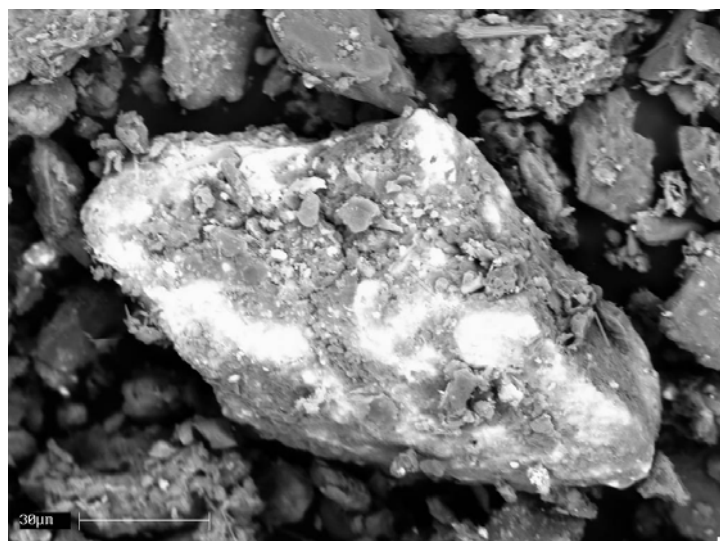


Figure 3.12: SEM image of grains of S1 with a Pb bearing phase (in white). With the EDS spectra, beside Pb, also Ca, Si, Al and Fe were identified.

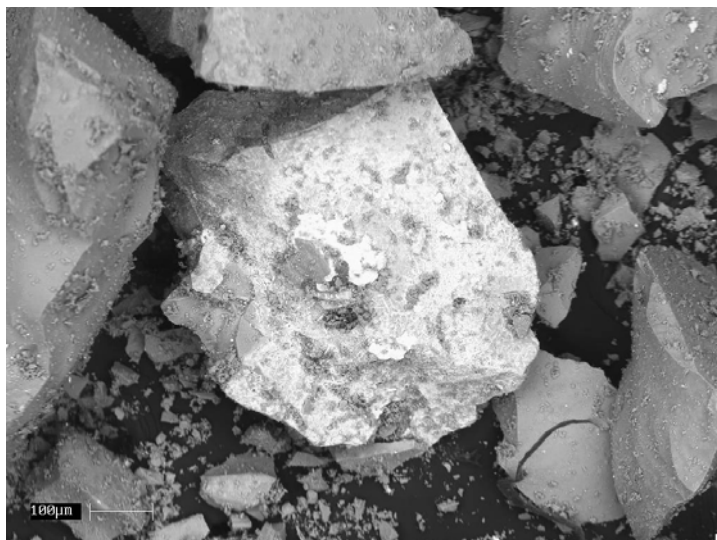


Figure 3.13: Waste A particle with Pb bearing phase (in white). EDS also shows Si, Al, Ca and Fe.

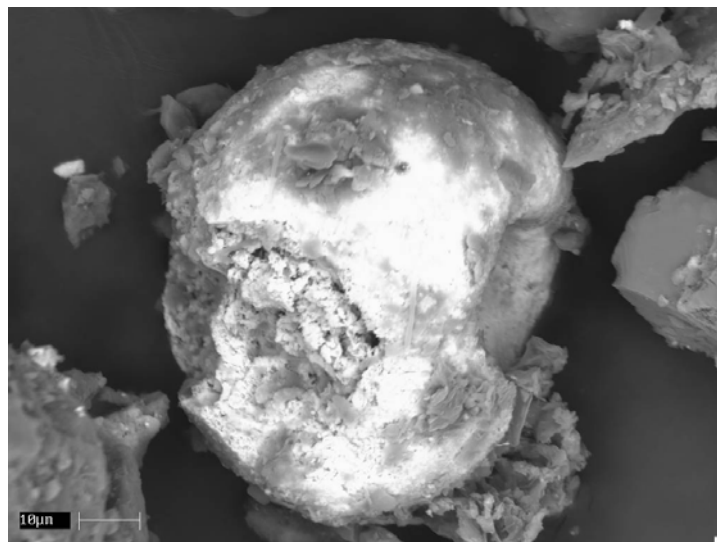


Figure 3.14: Slag particle with Pb bearing phase (in white), probably a PbO phase, according XRD and EDS analysis.

3.1.3.2 Bioaccessibility results – Gastric simulation

The results of the bioaccessibility tests for soil samples are shown in Figure 3.15. For each sample, the average and respective one standard deviation (error bar) of three or four results, obtained respectively in glycine, pepsine and PBET solutions are displayed. The bioaccessible lead (%) was calculated as the fraction of lead extracted in the test against the results obtained in aqua regia digestion. Reproducibility, given by the relative standard deviations (RSD), was better than 10% for most essays.

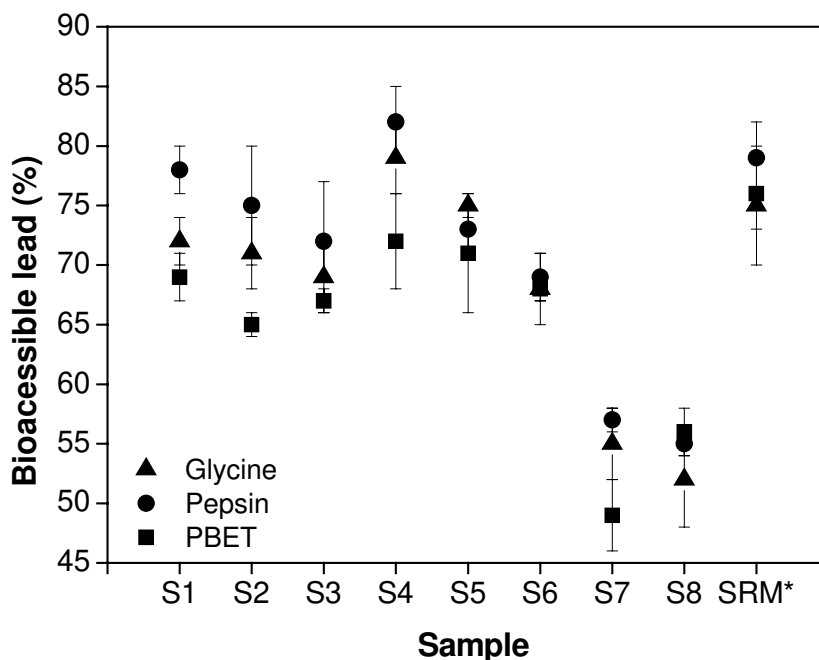


Figure 3.15: Lead bioaccessible fraction of soils samples, in glycine, pepsin and PBET acidic solutions. Error bar=one standard deviation, with n=4 for all samples in glycine and pepsin tests, n=3 for PBET tests. *SRM refers to SRM 2710.

The mean solubility of Pb of soil samples in glycine, pepsin and PBET gastric simulated solutions was 67%, 70% and 64%, respectively, while samples S7 and S8 presented a slightly lower Pb solubility compared to S1-S6 samples. Despite the complex matrix of S1, S2, S3 samples, since they were taken in front of former plant and may have a strong contribution from raw and processed materials, bioaccessibility results were similar to those found for S4, S5 and S6, which do not present the same high matrix complexity. Bioaccessible Pb fraction in S7-S8 samples was also high, but lower compared to the other samples, suggesting that soluble Pb species, possibly originated in metallurgical processes, are widely distributed in the area.

Lead concentration in S7 and S8 is much lower than the S1-S6 samples. S7 and S8 were collected at about ~1200 m from the former plant and at about 400 m away from the road. These

samples were probably less impacted by mining and refining activities or material transportation by trucks. The Pb bearing phases in S7-S8 presented lower solubility in the reagents which simulate gastric conditions, but in aqua regia most of their Pb was recovered, which excludes the possibility of Pb being as inclusions in silicate mineral phases (Link *et al.*, 1994). The topsoil (S7) contains almost twice the amount of Pb than the immediate 15 cm below it (S8), but their relative Pb solubilities are the same, indicating that they probably contain the same Pb phases.

The results obtained in this work are comparable to Pb bioaccessibility data in soils reported by other authors. Ruby *et al.* (1996), applying the PBET test to samples of contaminated soils found 69% and 83% bioaccessible lead in acidic medium (pH 1.3), but solubility is strongly dependent on pH, i.e., solubility decreases significantly when the experiments are conducted in pH 2.5-4. Schroder *et al.* (2004) obtained 64% as maximum bioaccessible Pb in acidic media (pH 1.8) and at fasting conditions, for soils from different hazardous wastes sites.

The mean lead solubility in certified reference material SRM 2710 ranged between 75-80% in gastric conditions. These results are close to data published in last years. Ellickson *et al.* (2001) simulated the whole digestive system (saliva, gastric and intestinal fluids), at different solid-liquid ratios and obtained 76% soluble lead in SRM 2710 in acidic medium. Rodriguez *et al.* (1999) measured 60% bioaccessible Pb for SRM 2710, with gastric extraction and fasting conditions. For the same material, Hamel *et al.* (1998) extracted 46 % ($\pm$ 29%) lead in pepsin containing gastric fluid at 1:200 solid-liquid ratios, but this parameter does not affect final results substantially.

Bioaccessibility results obtained for waste and slag samples are presented in Figure 3.166. The average bioaccessible lead in Wastes A, C and slag samples, considering all extractions, is 80%, which is higher compared than results obtained in soil samples. Such high solubility is

expected according to the lead phases identified by XRD. Waste A contains cerussite and lead oxide, which are very soluble in acidic media (Hettiarachchi and Pierzynski 2004).

The lower bioaccessible lead fraction in Waste B, with average of 18 %, was attributed to the presence of more stable mineral phases (e.g. plumbogummite and plumbojarosite). Davis *et al.* (1993) identified plumbojarosite in waste piles from Butte, Montana, formed by alteration of primary species (PbS). In relation to bioavailability, lead phosphate and plumbojarosite have very low solubility products (Porter *et al.*, 2004, Davis *et al.* 1993), and are mostly stable in acidic media, as shown by results of Waste B.

Waste C contains 75 % of bioaccessible lead, if data of all extractions are averaged. The only Pb phase clearly identified by XRD was lanarkite. The equilibrium constant of lanarkite dissolution in acid is 0.64 (Hettiarachchi and Pierzynski 2004), which means an intermediate solubility compared with other Pb minerals. But the presence of other Pb-phases in Waste C cannot be precluded. The slag sample high Pb solubility (80%) results can be explained by the presence of soluble lead oxide, which is formed during processing of galena for Pb production.

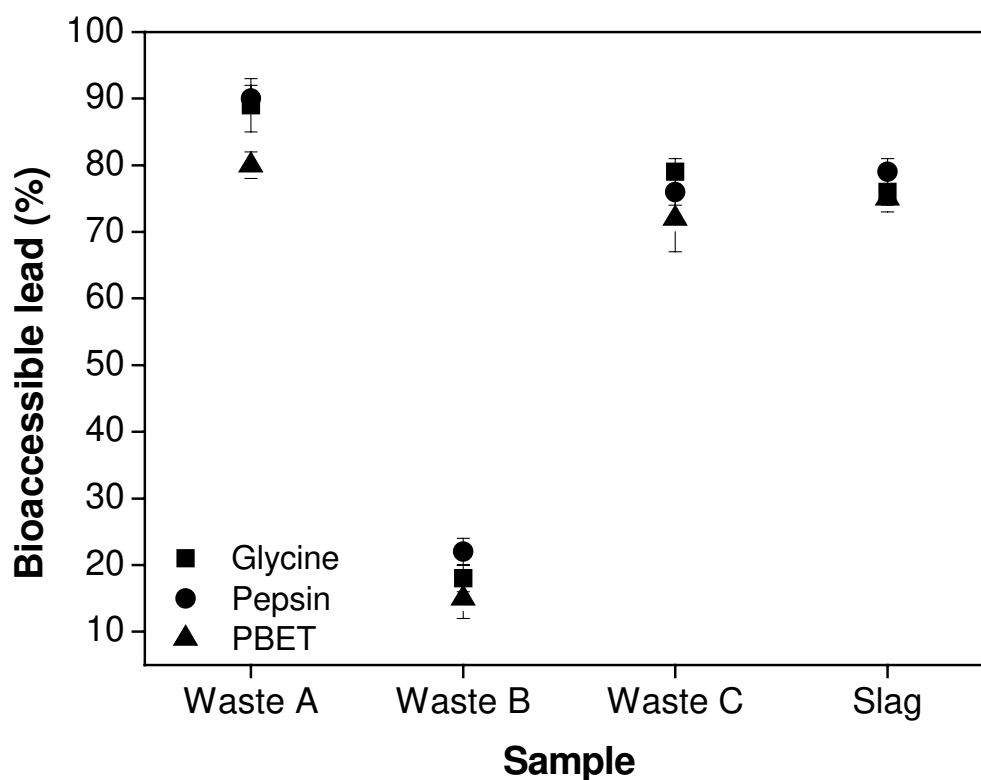


Figure 3.16: Lead bioaccessible fraction in waste and slag samples, in glycine, pepsin and PBET acidic solutions. Error bar=one standard deviation, n=3 (Waste A and B); n=4 (Waste C and slag).

The bioaccessibility of lead in slag and waste samples is comparable to data presented by Gasser *et al.* (1996), which evaluated lead solubility kinetics in six waste and slag samples. The lead phases described by Gasser *et al.* (1996) differ slightly from the materials of present study, but they were able to extract up to 71% of lead from a mining waste sample, in the first 10 minutes of reaction, with a solution of HCl+NaCl, at pH 1. For tailing and mine waste samples, the total amount of lead released was lower compared to our results, due to the presence of primary lead minerals in all samples.

Ruby *et al.* (1993) and Davis *et al.* (1997) obtained very lower solubility (7% maximum)

for mine wastes with PbS and PbSO₄, from Butte district (MT-USA). The differences in solubility can be explained by Pb speciation in the waste materials. In samples of present study, Pb is present mainly as oxide and carbonate phases, with small amount of sulfates, which explains the high Pb solubility. According to Ruby *et al.* (1999), from all Pb species, lead oxide and carbonate present larger fraction of bioaccessible Pb, while sulfate, sulfide and phosphate phases are more stable under gastric conditions. The last were the predominant Pb phases in the wastes tested by those authors and some of them were also present in our Waste B, which presented lower solubility.

The proportion of bioaccessible Pb (pH 1.5) for galena and pyromorphite is less than 7%, in average, in acidic solutions, as shown in Fig. 3.17. The lower solubility of these Pb phases, in low pH was already reported by Ruby *et al.* (1993), but the presence of galena in soils is undesirable, since on the long term, PbS will oxidize, specially in tropical soils, and form anglesite, which is several orders of magnitude more soluble than galena (Porter *et al.*, 2004). The synthetic compounds PbCO₃, Pb(NO₃)₂ and Pb₃O₄ were fully soluble in acidic conditions, as expected.

Fig. 3.17 Lead solubility in human gastric juice (pH 1.5) for different Pb phases. The data were obtained from the present study and compared with the data from Ruby *et al.* (1993).

The solubility of lead species depends strongly on gastric pH. Human stomach pH values range from about 1.3 to 6.0, depending on fast or fed state. The effect of pH on lead solubility was not evaluated in present study, but is discussed by several authors. For example, Ruby *et al.* (1996) showed that the amount of soluble Pb decreases about 60% when pH is raised from 1.3 to 2.5, which is common when food is ingested (Dressman *et al.*, 1990). Yang *et al.* (2003) also

measured the decrease in Pb solubility (81% to 11%) when pH was raised from 1.5 to 4.0, using a simple simulated gastric solution and lead and arsenic spiked soils.

The effect of gastric pH on Pb solubility may be of relevance for risk assessment if the nutritional conditions of the population are considered. The area of this study is mostly inhabited by people with poor social and economic conditions, which can imply in irregular food intake and long fasting periods, like the absence of breakfast and/or of regular meals. It can be expected that the low pH of the stomach will increase Pb solubility, if soils or other materials with high levels of lead are incidentally swallowed, especially by children at school age.

The measurement of Pb solubility in acidic conditions is a rapid and inexpensive assay for Pb bioaccessibility evaluation in solids such as soils, dusts and mine wastes but lead absorption does not occur in stomach (Oomen *et al.*, 2003b). In human GI tract, absorption of metals occurs predominantly at near neutral pH, in small intestine cells (Oomen *et al.*, 2003a). These cells are quimio-selective, and few chemical species can cross the cell barriers, as shown by Oomen *et al.* (2003b). At neutral pH, lead speciation changes and the most bioavailable free Pb^{2+} are transformed to less soluble species. Near neutral pH also favors lead re-sorption on remaining soil particles present in chyme (Davis *et al.*, 1997), which can attenuate solubility and reduce absorption. Lead precipitation reactions by the presence of alkaline compounds as carbonates, phosphates and sulfate phases, secreted by gallbladder and pancreas, also contribute to decrease lead solubility (Oomen *et al.*, 2003b). All these lead forms can be easily eliminated and causes no harm to human organs and tissues, but particle size and chyme transit time in duodenum still influence absorption. Oomen *et al.* (2003a) show that a minor fraction of micrometric particles of lead phosphates, i.e., stable chemical species of lead, can be absorbed by dissociation in cell-chyme interface. This absorption reaction increases with residence time in upper intestine. Lead

can also form complexes in bile, which are bioavailable, since they are easily transported through intestinal lumen and can be absorbed (Oomen *et al.*, 2003a)

The effect of neutralization, which occurs in the small intestine, was simulated with synthetic salts and compounds found in bile and pancreas, after the gastric extraction.

3.1.3.3 Gastrointestinal simulation

Results of the bioaccessible lead fraction in soil samples obtained in the gastrointestinal simulation are shown in Fig. 3.18. In near neutral conditions, lead solubility decreased to less than 10% for S1-S3, and less than 20% for remaining samples, except S4. For same conditions, the amount of bioaccessible lead was less than 6% in Waste A and C and 2% for Waste B and Slag sample.

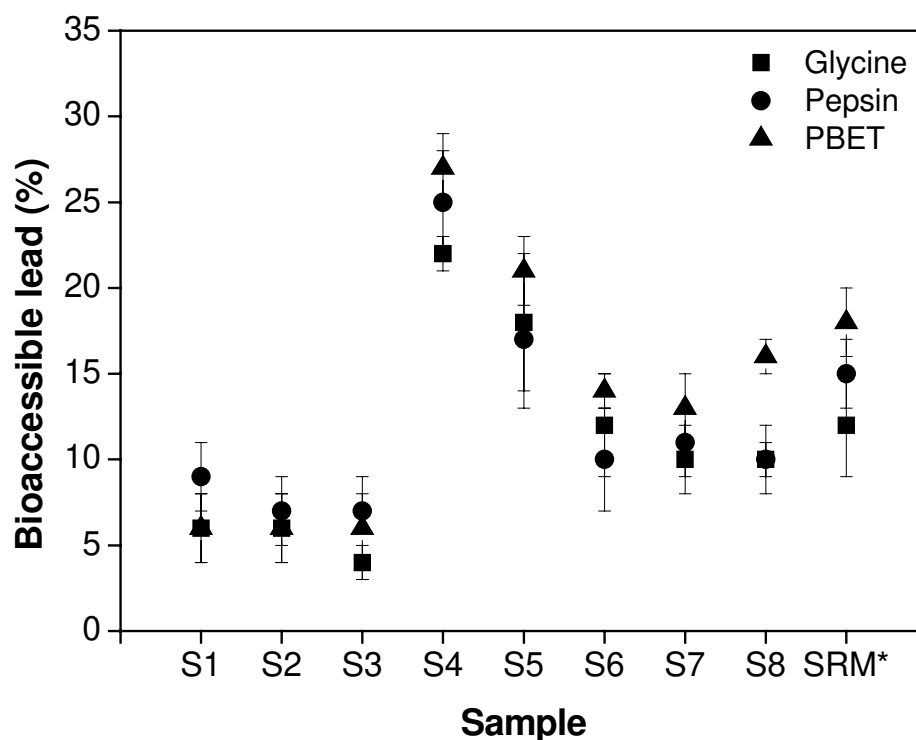


Figure 3.18: Percentage of lead from selected samples, which remains in solution when the acid gastric solution is neutralized to pH~7 with sodium bicarbonate solution, for glycine and pepsine solutions, and by sodium bicarbonate, bile and pancreatin addition for PBET.

The bioaccessibility data are comparable both to *in vitro* and *in vivo* results available in literature. For example, Ruby *et al.* (1993, 1996) and Schroder *et al.* (2004) found that 8-30% of total lead in soils orally administered to rabbits and rats is bioavailable at fasting conditions. The Columbia School of Public Health (Madalloni *et al.*, 1998) measured the proportion of Pb absorbed by humans after ingestion of mine-tailing contaminated soil borne particles and found 26% of lead bioavailability at fasting conditions. When food is administered, lead solubility decreases to less than 3%.

The intestinal phase can provide information regarding lead solubility in near neutral

conditions, especially with the PBET, which contains organic compounds to match bile salts. But it has been observed that correlations by linear regression, between *in vitro* and *in vivo* tests, are only successful when just gastric results are considered (Ruby *et al.*, 1996, Schroder *et al.*, 2004). The complexity of the environment of duodenum and the mechanisms of absorption, precipitation and interaction with dietary or enzymatic compounds, including the high metabolic activity of bacteria, are not easily simulated (Schroder *et al.*, 2004). Marschner *et al.* (2006), compared data of sequential extraction, *in vitro* and *in vivo* methods and observed that relative bioavailability in liver, kidney and total uptake were highly correlated to Pb in the third fraction of their sequential extraction, i.e., easily reducible Mn oxides. They concluded that reductive processes in the intestine may be more relevant for Pb absorption than the initial dissolution in stomach. They also suggest that the concentration of soluble Pb in the intestinal phase depends on the availability of ligands rather than on Pb solubilized during the gastric phase and would explain the poor correlation between gastric phase Pb and intestinal phase Pb found in several studies (Marschner *et al.* (2006), and also observed in present study.

The description of absolute lead intake routes by adults and children require the evaluation of some exposure pathways (Bacon *et al.*, 2003): (a) inhalation of atmospheric indoor and outdoor particulates; (b) direct intake of fruit and vegetables and (c) consumption of meat and animal organs with high metal concentrations; (d) intake of contaminated water from local supplies; (e) ingestion of foodstuffs contaminated with soil and dust particles; and (f) ingestion of contaminated dust via hand to mouth transference.

The present high Pb blood levels found in the area of the study can be partially related to the inhalation of fine suspended particulate materials, since mining and refining activities ceased in 1995. Just particles < 3 μm can reach and react in alveolar media (Bright *et al.*, 2006), but the

absorption rate of metals in lungs is about 3 to 5 times more efficient than in duodenum (O'Flaherty, 1993). Dusts of the area weren't still studied regarding detailed composition and bioaccessibility and this would be important, since unpaved roads, sidewalks, gardens and playgrounds can contribute substantially to formation of fine dusts, which can remain suspended, especially during the dry season.

The possible ingestion of contaminated food was evaluated by Lammoglia *et al.* (2005). The amount of lead in eggs, milk, tubercles, grains and vegetables, was determined in samples collected at the area of this study. Lead concentration in manioc, lettuce and marjoram were above the allowed limits proposed by the Brazilian environmental legislation, while eggs, milk, grains and other vegetables were considered safe regarding Pb concentrations. Animal meat was not evaluated. Lammoglia *et al.* (2005) suggested moderate consumption of those species with high Pb content, to avoid toxicity complications.

Water consumed by population does not contribute to lead intake. Cunha (2003) reported that water from wells, river as well as residential potable water, offered by municipality sanitation service, were safe regarding lead maximum allowed limits.

The finest fraction of surface soil is the main source to street dusts and the major component of indoor dusts and probably is the principal route to human contamination in the area of the study. Risk assessment studies have assumed that in urban residential areas, 40-70% of the total indoor house dust is derived from outdoor soil dusts (Calabrese *et al.*, 1999, LaGoy, 1995). The lack of public infra-structure, such as paved streets, can increase the outdoor soil contribution to indoor dust.

In the same way, it can be expected that the top soils of the area also get inputs of new particles from the waste piles, especially from that where Waste C was collected. This waste pile

is deposited on the margin of road and contains large amount of fine particles ($< 63 \mu\text{m}$). The smaller particles can be carried by the wind and air movement derived from transit of vehicles.

The bioaccessibility data obtained for soils and wastes showed that a large proportion of lead present in these materials is soluble under gastric conditions. The risk associated to the presence of these wastes and contaminated soils, has to be addressed and should be reduced. Remediation methods, like the application of phosphate materials to induce the formation of more stable lead compounds, as revised by Hettiarachchi and Pierzynski (2004), road and street paving and removal of waste piles, must all be considered.

3.1.4 References

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2000). Lead Toxicity. U.S. department of health and human services. ATSDR publication n.: ATSDR-HE-CS-2001-0001

Bacon, J. R., Dinev, N., Stanislavova, L., Penkov, D., Willeke-Wetstein, C. (2003). The route of transfer to the human population of lead from contaminated soil close to a smelter in Bulgaria. *Journal of Physique IV*, **107**, 91-94

Bright, D. A., Richardson, G. M., Dodd, M. (2006). Do current standards of practice in Canada measure what is relevant to human exposure at contaminated sites? I: A discussion of soil particle size and contaminant partitioning in soil. *Human Ecological Risk Assessment*, **12**, 591-605

Brown, G. E., Foster, A. L., Ostergren, J. D. (1999). Mineral surfaces and bioavailability of

heavy metals: A molecular-scale perspective. Proceedings of the National Academy of Science, USA, **96**, 3388-3395

Calabrese, E. J., Stanek, E. J., James, R. C., Roberts, S. M. (1999) Soil ingestion: a concern for acute toxicity in children. *Journal of Environmental Health*, **61**, 1354-1358

Chen, M., Ma, L. Q. (2001). Comparison of three aqua regia digestion methods for twenty florida soils. *Soil Science Society of America Journal*, **65**, 491-499

Cunha, F. G. (2003). Human and environmental lead contamination in Ribeira river valley, São Paulo and Paraná state. Doctorate Thesis, Geosciences Institute, State University of Campinas. Brazil

Davis, A., Drexler, J. W., Ruby, M. V., Nicholson, A. (1993). Micromineralogy of mine waste in relation to lead bioavailability, Butte, Montana. *Environmental Science and Technology*, **27**, 1415-1425

Davis, A., Ruby, M. V., Goad, P., Eberle, S., Chrysosoulis, S. (1997). Mass balance on surface-bound, mineralogic, and total lead concentrations as related to industrial aggregate bioaccessibility. *Environmental Science and Technology*, **31**, 37-44

Dressman, J. B., Berardi, R. R., Dermentzoglou, L. C., Russell, T. L., Schmaltz, S. P., Barnett, J. L., Jarvenpaa, K. M. (1990). Upper Gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharmacological Research*, **7**, 756-761

Ellickson, K. M., Meeker, R. J., Gallo, M. A., Buckeley, B. T., Lioy, P. J. (2001). Oral bioavailability of lead and arsenic from a NIST Standard Reference Soil material. *Archives of the Environmental Contamination Toxicology*, **40**, 128-135

Enzweiler, J., Vendemiato, M. A. (2004). Analysis of sediments and soils by X-ray fluorescence spectrometry using matrix corrections based on fundamental parameters. *Geostandard and Geoanalysis Research*, **28**, 103-112

Eysink, G. G. J., de Pádua H. B., Piva-Bertoletti, S. A. E., Martins, C. D., Pereira, D. N. (1988). Metais pesados no Vale do Ribeira e em Iguape-Cananéia. *Ambiente*, **2**, 6-13

Freeman, G. B., Johnson, J. D., Killinger, J. M., Liao, S. C., Feder, P. I., Davis, A. O., Ruby, M. V., Chamey, R. L., Lovre, S. C., Bergstrom, P. D. (1992). Relative bioavailability of lead from mining waste soil in rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, **19**, 388-398

Freeman, G. B., Schoof, R. A., Ruby, M. V., Davis, A. O., Dill, J. A., Liao, S. C., Lapin, C. A., Bergstrom, P. D. (1995). Bioavailability of arsenic in soil and house dust impacted by smelter activities following oral administration in cynomolgus monkeys. *Fundamental and Applied Toxicology*, **28**, 215-222

Gasser, U. G., Walker, W. J., Dahlgren, R. A., Borch, R. S., Burau, R. G. (1996). Lead release from smelter and mine waste impacted materials under simulated gastric conditions and relation to speciation. *Environmental Science and Technology*, **30**, 761-769

Hamel, S. C., Buckley, B., Lioy, P. J. (1998). Bioaccessibility of metals in soil for different liquid

to solid ratios in synthetic fluid. *Environmental Science Technology*, **32**, 358-362

Hettiarachchi, G. M., Pierzynski, G. M. (2004). Soil lead bioavailability and in situ remediation of lead-contaminated soils: A review. *Environmental Progress*, **23**, 78-93

Hong, S., Candelone, J. P., Patterson, C. C., Boutron, C. F. (1994). Greenland ice evidence of hemispheric lead pollution two millennia ago by Greek and Roman civilizations. *Science*, **265**, 1841-1843.

Hunt, A., Johnson, D.L., Griffith, D.A. (2006) Mass transfer of soil indoors by track-in on footwear. *Science of the Total Environment*, **370**, 360-371.

LaGoy, P. (1987). Estimated soil ingestion rates for use in risk assessment. *Risk Analysis*, **7**, 355-360

Lammoglia, T., Figueiredo, B. R., Sakuma, A. M., Buzzo, M. L., Okada, I. A., Kira, C. S. (2005) Ocorrência de chumbo em alimentos e solos no alto vale do Ribeira. *In: X Congresso Brasileiro de Geoquímica e II Simpósio de Geoquímica dos Países do Mercosul*. Pernambuco, Brazil

Link, T. E., Ruby, M. V., Davis, A., Nicholson, A. D. (1994) Soil lead mineralogy by microprobe: An interlaboratory comparison. *Environmental Science and Technology*, **28**, 985-988

Maddaloni, M., Lolocono, N., Manton, W., Blum, C., Drexler, J., Graziano, J. (1998). Bioavailability of soilborne lead in adults, by stable isotope dilution. *Environmental Health Perspective*, **106**, 1589-1594

Marschner, B., Welge, P., Hack, A., Wittsiepe, J., Wilhelm, M. (2006). Comparison of soil Pb in vitro bioaccessibility and in vivo bioavailability with Pb pools from a sequential soil extraction. *Environmental Science Technology*, **40**, 2812-2818

O'Flaherty, E.J. (1993). Physiologically based models for bone-seeking elements IV. Kinetics of lead disposition in humans. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **118**, 16-29

Oliver, D. P., McLaughlin, M. J., Naidu, R., Smith, L. H., Maynard, E. J., Calder, I. C. (1999). Measuring Pb bioavailability from household dusts using an *in vitro* model. *Environmental Science and Technology*, **33**, 4434-4439

Oomen, A. G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, S. C., Schoeters, G., Verstraete, W., Van de Wiele, T., Wragg, J., Rompelberg, C. J. M., Sips, A., Van Wijnen, J. H. (2002). Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environmental Science Technology*, **36**, 3326-3334

Oomen, A. G., Rompelberg, C. J. M., Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D. P. K. H., Sips, A. J. A. M. (2003). Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminant. *Archives of the Environmental Contamination and Toxicology*, **44**, 281-287

Oomen, A. G., Tolls, J., Sips, A. J. A. M., Groten, J. P. (2003a) In vitro intestinal lead uptake and transport in relation to speciation. *Archives of the Environmental Contamination Toxicology*, **44**,

Oomen, A. G., Tolls, J., Sips, A. J. A. M., Van den Hoop, M. A. G. T. (2003b). Lead speciation in artificial human digestive fluid. *Archives of the Environmental Contamination Toxicology*, **44**, 107-115

Paoliello, M. M. B., De Capitani, E. M. (2005). Environmental contamination and human exposure to lead in Brazil. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **184**, 59-96

Paoliello, M. M. B., De Capitani, E. M., Cunha, F. G. A., Carvalho, M. D., Matsuo, T., Sakuma, A., Figueiredo, B. R. (2003). Determinants of blood lead levels in an adult population from a mining area in Brazil. *Journal of Physique IV*, **107**, 127-130

Paoliello, M. M. B., De Capitani, E. M., Cunha, F. G. A., Matsuo, T., Carvalho, M. D., Sakuma, A., Figueiredo, B. R. (2002). Exposure of children to lead and cadmium from a mining area of Brazil. *Environmental Research*, **88**, 120-128

Porter, S. K., Scheckel, K. G., Impellitteri, C. A., Ryan, J. A. (2004). Toxic metals in the environment: Thermodynamic considerations for possible immobilization strategies for Pb, Cd, As and Hg. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **34**, 495-604

Ruby, M. V., Davis, A., Link, T. E., Schoof, R., Chaney, R. L., Freeman, G. B., Bergstrom, P. (1993). Development of an *in vitro* screening test to evaluate the *in vivo* bioaccessibility of ingested mine-waste lead. *Environmental Science Technology*, **27**, 2870-2877

Ruby, M. V., Davis, A., Schoof, R., Eberle, S., Sellstone, C. M. (1996). Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environmental Science Technology*, **30**, 422-430

Ruby, M. V., Schoof, R., Brattin, W., Goldade, M., Post, G., Harnois, M., Mosby, D. E., Casteel, S.W., Berti, W., Carpenter, M., Edwards, D., Cragin, D., Chappell, W. (1999). Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environmental Science Technology*, **33**, 3697-3705

Schroder, J. L., Basta, N. T., Casteel, S. W., Evans, T. J., Payton, M. E., Si, J. (2004). Validation of the *in vitro* gastrointestinal (IVG) method to estimate relative bioavailable lead in contaminated soils. *Journal of the Environmental Quality*, **33**, 513-521

Thatcher, T. L., Layton, D.W. (1995). Deposition, resuspension, and penetration of particles within a residence. *Atmospheric Environment*, **29**, 1487-1497

U.S. Environmental Protection Agency. (2002). User's guide for the Integrated Exposure uptake biokinetic model for lead in children (IEUBK) Windows® Version. EPA 540-K-01-005. Washington, DC.

WHO - World Health Organization. (1995). *Inorganic Lead*. Geneva: IPCS – International Programmer on Chemical Safety. Environmental Health Criteria, 165

Yang, J. K., Barnett, M. O., Jardine, P. M., Brooks, S. C. (2003) Factors controlling the

bioaccessibility of arsenic(V) and lead(II) in soil. Soil and Sediment Contamination, **12**, 165-173

Yu, C. H., Yiin, L. M., Liou, P. J. (2006). The bioaccessibility of lead (Pb) from vacuumed house dust on carpets in urban residences. Risk Analysis, **26**, 125-134

Parte 4.

LEAD BIOACCESSIBILITY IN SOIL AND MINE WASTES AFTER IMMOBILIZATION AS PHOSPHATE PHASES

Abstract

The *in situ* transformation of soluble lead species, of highly contaminated soils, to more stable phases, by the addition of phosphate bearing materials, may be a cost-effective strategy for soil remediation. Due to their low solubility rates, neo-formed lead-phosphate phases, as pyromorphite-like $[Pb_5(PO_4)_3X]$ species, can effectively control availability and mobility of lead in environment, and also reduce human exposure, if soils are the main pathway for human

contamination. In this work, three phosphate materials [$\text{NaH}_2(\text{PO}_4)_3$, commercial super phosphate and phosphate rock] were used as phosphate source for lead immobilization in soils and mining waste samples. Total time of phosphate induced reaction was 6 months. The samples were collected in a heavily contaminated lead area, from former mining and smelting activities, in southeastern Brazil. Other authors showed the high lead blood content of local population (children and adults). In order to predict the reduction on lead exposure, PBET bioaccessibility test was used to simulate the ingestion of treated soil by local population. Results show that the most efficient phosphate source materials was $\text{NaH}_2(\text{PO}_4)_3$, which reduces lead solubility in 92% in acidic gastric conditions on the first month of treatment. Super phosphate and phosphate rock also show high capacity of immobilization, but reactions were time dependent. No Pb-phosphate phases were identified by XRD after the treatment, but the Pb-Ca-P elemental associations, acquired by SEM images and EDS spectra, in examined portions of the samples, and combined with reduced solubility, indicates that stable lead phases were formed on treated samples. Based in these results, the *in situ* phosphate induced treatment for lead immobilization seems to be a reliable alternative for reducing human exposure at the area.

4.1 Introduction

The bioavailability of toxic elements, as lead, is strongly dependent on their chemical form(s) found in the environment (Brown *et al.* 1999; Ruby *et al.* 1999). The stability of Pb-bearing minerals and solids is affected by the individual phase solubility, but also by other conditions, like pH, pe, other species and time. For example, the primary lead ore mineral galena (PbS) is very insoluble, but under atmospheric conditions will ultimately weather to anglesite (PbSO_4), which is several orders of magnitude more soluble than PbS .

In some situations, weathering favors the transformation of lead soil species to very stable and insoluble lead phosphates (Nriagu, 1973; Nriagu, 1974), like pyromorphite $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$ ($\text{X}=\text{OH}$, Cl , Br , F) and plumbogummite ($\text{PbAl}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_5\cdot\text{H}_2\text{O}$). The last is the main lead mineral found in some soil profiles (Morin *et al.* 2001). This type of geological time scale transformation is the basis of some methods proposed to reduce the solubility of lead in contaminated soils. The *in situ* lead phosphates formation is favored when phosphate is readily available. This has been tested by adding phosphate bearing materials to the soils and following the phase transformations (Ma *et al.* 1993, Zhang *et al.* 1998, Brown *et al.* 2004, Geysen *et al.* 2004, Scheckel and Ryan 2004).

Lead immobilization by reaction with phosphates has been tested in several ways, in laboratory and in field experiments, and most results show that soluble forms of lead can be altered and bioavailability of Pb in products reduced. The stability of the reaction products and the low cost of phosphate materials suggest that this approach has great merit for cost-effective *in situ* long term remediation of lead in contaminated soils and wastes (Ryan *et al.* 2004, Basta and McGowen, 2004, Hettiarachchi and Pierzinsky 2004, Eusden *et al.* 2002).

The potential effect of increased soil phosphate levels upon the solubility of Pb in contaminated soils can be predicted using theoretical solubility equilibrium data, but the estimated solubility products may not apply satisfactorily over wider range of pH, phosphate and Pb activities in soils (Sauvé *et al.* 1998). If conducted in natural soils, Pb-immobilization needs the identification of the new phases and/or the measurement of solubility in final Pb-P products for evaluation efficiency.

Several instrumental techniques have been used to identify and quantify new formed Pb-P phases, like X-ray powder diffraction (XRD), X-ray absorption (Cotter-Howells and Capron, 1996; Ryan *et al.*, 2001, Scheckel and Ryan, 2002; Scheckel and Ryan, 2004), transmission electron microscopy (TEM - Mavropoulos *et al.* 2004, Stack *et al.* 2004), scanning electron microscopy (SEM - Laperche *et al.* 1997, Melamed *et al.* 2003) and atomic force microscopy (AFM – Lower *et al.* 1998). However, the diversity of species and the relative low Pb content in soils (e.g., mostly less than 10,000 mg kg⁻¹) make species identification and quantification difficult (Ryan *et al.*, 2001).

The solubility of the neo-formed phosphate phases is verified with different types of essays. Nriagu (1974), Ma *et al.* (1994), Scheckel and Ryan (2002), Zhang and Ryan (1998, 1999a, b) have shown the high stability of neo-formed Pb-P species in aqueous solutions or column leachate experiments over a wide range of pH. Regarding human and environmental

contamination, laboratorial tests able to determine the bioavailability are preferred, and combined with instrumental analysis, can evaluate if the addition of phosphate to soils is able to reduce Pb solubility, specially when this matrix appears to be the main exposure pathway for human lead contamination, due to soil borne dusts ingestion (Ruby *et al.* 1993).

In vivo methods, which are conducted by feeding mammals with contaminated samples, are frequently considered the more reliable for bioavailability evaluation (Freeman *et al.* 1992). However, *in vivo* assays are expensive, time consuming and demand specialized people and infrastructure to deal with animals (Hettiarachchi and Pierzynski, 2004). Instead, *in vitro* or bioaccessibility tests, which consist in measuring the amount of soluble lead in solutions that match the human gastrointestinal fluids composition (Ruby *et al.* 1996) are used. Hettiarachchi *et al.* (2003) found correlation between results of *in vitro* and *in vivo* tests and based on bone and liver tissue of rats fed with untreated and amended soil, concluded that *in vitro* test can successfully predict Pb bioavailability.

Lead ore processing produces large amounts of solid wastes contaminated with toxic metals and emissions of particulate matter with high Pb levels, mainly in oxide form (Clevenger *et al.* 1991). Lead species in wastewaters, from wet air scrubbers and cooling water systems, depend on pH value, but in acidic media they are predominantly free and sulfate forms. Solid wastes generated during smelting contains 0.5-0.7% of Pb, mainly in oxide form. Leaching and flotation activities also generate solid and liquid wastes, but lead forms and concentration can vary (WBG, 1998). In short, areas nearby lead processing plants can be heavily impacted by soluble forms of lead. When in contact, wastes and soils can interact and new phases can result.

The aim of this work is to evaluate the efficiency of lead-soil immobilization by addition of three different phosphate sources to soils and wastes samples, from a former mining and refining impacted area in the southeastern part of Brazil. Mining and refining activities in the area

ceased completely in 1995, but the toxic metal burden is still of concern for local population. In previous studies conducted in the area, blood lead levels of up to 60% of children in scholar age were above $10 \mu\text{g dL}^{-1}$ (Paoliello *et al.* 2002). Blood lead levels were also evaluated on adults and values of up to $48 \mu\text{g dL}^{-1}$ were measured but former occupation and smoking habits can contribute to these levels (Paoliello *et al.* 2003). *In vitro* gastrointestinal tests applied to soil sample and waste materials showed that most of lead in these matrices is bioaccessible (Bosso and Enzweiler, submitted).

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Description of the samples

Two soil samples collected on side of the unpaved road which passes in front of the former Pb-processing plant and waste piles and also conducts to the nearby village. Soil A was collected at about 50 m from former plant. Soil B is a composite sample, collected along 200 m on the road side, starting at about 200 m from former plant, in front of the first inhabited house. Just topsoil (0-1 cm depth) was taken, because it contains the finer particles, the most probably suspended and transported, and consequently present in dusts.

Two solid waste samples, collected directly from the piles deposited beside the road, were also used in the experiments. Waste A and B are respectively residues from the metallurgical and flotation processes of the ore material. Pile of Waste A is deposited in front of the former plant wastewater treatment station, a few meters from the refinery entrance. Pile of Waste B is about 500 m away from the plant, on the margin of the same road where the composite soils were collected, but in opposite direction. These piles remain unprotected and frequently children use them as playground.

4.2.2 Sample characterization

Whole lead was determined by X-ray fluorescence spectrometry (WD-XRF) on pressed pellets (Enzweiler and Vendemiatto, 2004). Total extractable lead was determined by aqua regia digestion on hot plate (Chen and Ma, 2001) and atomic absorption spectrometry. A soil certified reference material was also analyzed (SRM 2710-NIST). Before and after treatment with phosphate, samples were examined and analyzed by scanning electron microscopy (EDS-SEM). Main phases in samples and in phosphate source materials were identified by X-ray powder diffraction (XRD).

4.2.3 Phosphate immobilization

Laboratory experiments for lead immobilization were made with three phosphate materials: a) sodium dihydrogen phosphate ($\text{NaH}_2(\text{PO}_4)_3$, p.a., Merck), b) commercial super phosphate (SP) [$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$], provided as powder with particle size $< 250 \mu\text{m}$ and c) phosphate rock (PR) with particle size $< 250 \mu\text{m}$. The three materials present large differences in P solubility rates and also in cost, which are factors to be considered in amendment proposals. Soil particle size used in this study was $< 180 \mu\text{m}$, which was the main fraction present on collected top-soils. Waste treatments were conducted on samples without sieving.

In a large-mouth 125 mL PFA bottles (Savillex), 10 g of sample was added to a mixture of 30 mL deionized water, 0.1 g of NaCl (p.a. Nuclear) and the amount of P source necessary to reach a PO_4/Pb molar ratio above 5:3, the same of pyromorphite minerals (Ryan *et al.* 2001). Also a P:Ca ratio above 3/5 is suggested by Porter *et al.* (2004) due to the preferential apatite formation in soils. Solution and slurry pH was checked before and after sample addition. Bottles were capped and manually shaken once per week, during 6 months. For each P source, six bottles were prepared. Two of the bottles were taken for tests after 1, 3 and 6 months and were

labeled NaP1, NaP3 NaP6 [$\text{NaH}_2(\text{PO}_4)_3$], SP1, SP3 and SP6 (super phosphate) and PR1, PR3 and PR6 (phosphate rock). Samples pH was determined in a 1:1 aqueous solution before PO_4 addition and slurry pH was measured, after PO_4 addition, directly in the PFA bottle.

4.2.4 Lead solubility evaluation

Bioaccessible lead in soils and waste samples was determined before and after the treatment with P, with a slightly modified version of the PBET (Physiological based extraction test), (Ruby *et al.* 1996). In this test, the composition of gastric and duodenal solutions is simulated to infer the total lead solubility, if such materials are incidentally ingested.

Gastric solution was prepared using with 1 L of deionized water, 1.25 g of pepsin (Vetec), 0.5 g of citric acid (Merck), 0.5 g of malic acid (Merck), 420 μL of syrup lactic acid (Merck) and 500 μL of glacial acetic acid (Merck). Final pH was adjusted to 1.7 with HCl. Intestinal solution was prepared titrating gastric solution to pH 7.0 with a supersaturated NaHCO_3 solution, 70 mg of bile salts (Aldrich Chemical) and 20 mg of pancreatin (porcine - Nuclear) were added. Solid-solution ratio 1:100 was used and a thermostatic bath, at 37 °C, with slow orbital agitation with reaction times of 1 and 2 h, respectively, for stomach and intestinal simulations. Liquid phase was separated by centrifugation, at 5000 rpm for 20 min, and concentration of lead in the supernatant was determined by atomic absorption spectrometry (AAS) with appropriate matrix matching.

The method detection limits (MDL) for *in vitro* tests was calculated according U.S.EPA (1991), where $n=12$, and the standard deviation (SD) of blank readings was $\pm 0.45 \text{ mg L}^{-1}$ in average (MDL= 1.35 mg L^{-1}). Precision was evaluated by analysis of quadruplicates in selected samples, and relative deviation was less than $\pm 5\%$.

4.3 Results and Discussion

Table 4.1 presents the total lead concentration determined by XRF, the amount of lead dissolved by aqua regia, a short description of the samples and the main phases identified by XRD. Soils grain size is mainly (60%) constituted by smaller particles ($< 250 \mu\text{m}$). Soil particles with less than $100 \mu\text{m}$ is the fraction that adheres to children's hands (Yamamoto *et al.*, 2006), and main components of dusts. Waste A is a vitrified course ($\sim 1 \text{ mm}$) slagged material, and waste B is also constituted mainly by smaller than $250 \mu\text{m}$ particle size, with 20% of total content smaller than $63 \mu\text{m}$.

Table 4.1 Total lead concentration (% m/m) determined by XRF, lead dissolved by aqua regia (% m/m), a description of each sample and main phases identified by XRD

Sample ID	Total Pb (%)	Pb extracted by aqua regia (%)	Sample description (depth)	Main phases
Soil A	4.12	3.60	Top-soil (0-2 cm)	Smectite, hornblende, quartz, tremolite
Soil B	1.19	1.01	Composite top-soil (0-2 cm)	Smectite, microcline, orthoclase, quartz
Waste A	15.0	14.8	Concentrated waste	Cerussite (PbCO_3), PbO, jarosite $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$
Waste B	1.20	1.20	Flotation waste	Barite, lanarkite ($\text{PbSO}_4 \cdot \text{PbO}$), calcite

Lead concentration in all samples is high, particularly in soil A (4.1 % m/m) and waste A (15.0 % m/m). Soil A sample was taken very close (20 m) of the former plant, and it probably contains a strong input from wastes of different sort, especially Waste A which is very close from the plant (20 m, in opposite direction). The composite Soil B also presents high lead concentration, and it was taken a little farther from the former plant ($\sim 200 \text{ m}$) and pile of Waste B ($\sim 1000 \text{ m}$). In the soil samples, none individual Pb phases were detected by XRD, and probably lead is in several different phases. Cerussite and lead oxide were identified in Waste A by XRD,

but probably it also contains other phases. In Waste B, lanarkite was identified, probably a product of galena weathering.

During electron scanning microscope examination of portions of soil samples, lead compounds adhered to the surface of soil particles (Figure 4.1) were observed and confirmed by qualitative EDS analysis. In Waste A individual particles of lead oxide were detected by EDS-SEM and in Waste B is has a lead phase agglomerated with particles of carbonate, possibly calcite.

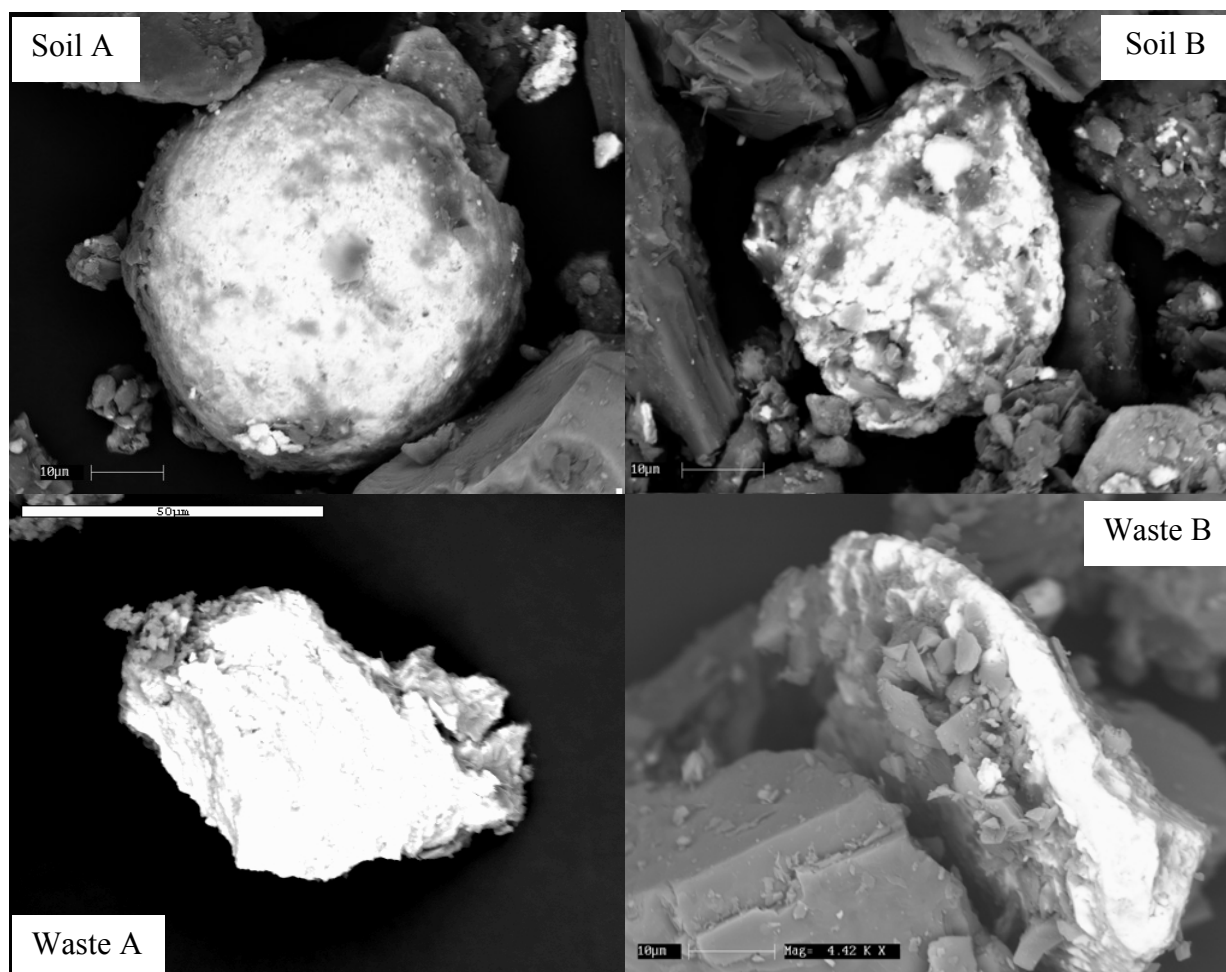


Figure 4.1: SEM images of particles of Soil A and B and Waste A and B. Soil A and B show lead (in white) on the surface of other minerals. The particle of Waste A is lead oxide and Waste B shows a lead phase encapsulated by a carbonate mineral, possibly a calcite

The phosphate phases present in selected P source materials were also analyzed by XRD. In the super phosphate (SP) sample, calcium dihydrogen phosphate [$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] was identified. Super phosphate, a common commercial P fertilizer, is produced by reaction between apatite and sulfuric acid. SP is very soluble and when applied to soils for agricultural purposes, it decreases the soil pH and lime application may be required (Brown *et al.* 2004). The low pH after SP application can help to dissolve Pb from soils and wastes, increasing Pb-P immobilization reactions. Phosphate rock (PR) was identified as a mixture of hydroxyapatite [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$] and very small amount of ankerite [$\text{Fe}(\text{CO}_3)_2$]. Hydroxyapatite slowly dissolves under neutral

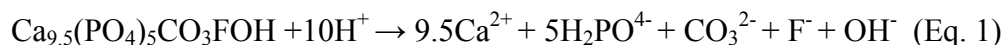
conditions (Porter *et al.* 2004), but is successfully used as P source in soil treatment for Pb amendment (Hettiarachchi and Pierzynski, 2004).

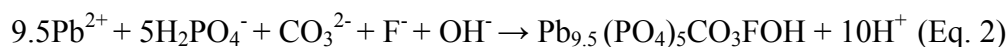
4.3.1 Formation of lead-phosphate phases

The effectiveness of P source materials in transforming Pb phases in contaminated soils and wastes, to form more stable lead compounds, depends primarily on its ability to provide soluble P (Ma *et al.* 1993, 1995; Mench *et al.*, 1994; Cao *et al.* 2002a, b). Pyromorphite minerals are considered the most stable lead minerals in soils due to their low solubility ($K_{SP} \approx 10^{-75}$ – Nriagu, 1973) compared to other lead species found in contaminated soils, like anglesite ($PbSO_4$ – $K_{SP} \approx 10^{-7}$), cerussite ($PbCO_3$ – $K_{SP} \approx 10^{-12}$) and lead oxide (PbO – $K_{SP} \approx 10^{12}$ – Ruby *et al.*, 1994).

The products of the reactions between soils and waste samples, after each period of contact, were characterized by XRD and EDS-SEM. Due to the low lead concentration in soil samples and in Waste B, none neo-formed Pb-P phases could be identified after P-treatment by XRD. In Waste A, despite its high Pb concentration, also no identifiable peaks of pyromorphite-like minerals were acquired by XRD. Two hypotheses could explain such findings for Waste A (i) the crystallinity of neo-formed Pb-P phases was not sufficient for a successful XRD phase identification or (ii) the characteristic diffraction peaks of the new phases with low crystallinity were hidden by the high background of the mostly amorphous matrix.

Several mechanisms of pyromorphite-like minerals formation after P addition have been proposed. Ma *et al.* (1993, 1995) show that phosphate rock effectively immobilized Pb from aqueous solutions. The primary mechanism would involve dissolution of apatite mineral from PR (Eq. 1) and subsequent precipitation of a pyromorphite-like mineral (Eq. 2).





Equations 1 and 2 are based on the stoichiometric consumption of Pb and P and Ca release to solution, but the precipitation of Pb as hydrocerussite also occurred in presence of carbonate. Mavropoulos *et al.* (2005) also identify cerussite after Pb uptake by Brazilian phosphate rock.

Mavropoulos *et al.* (2002) and Mavropoulos *et al.* (2004), by means of XRD, TEM and Rietveld-XRD analysis demonstrated that an intermediary phase, characterized as a Ca-Pb-P solid solution, was formed before the pyromorphite complete crystallization, meaning that both apatite dissolution-pyromorphite precipitation involved Pb sorption onto apatite surface. Evidence of Pb sequestration by nucleation was shown by atomic force microscopy by Lower *et al.* (1998), during the formation of pyromorphite-like minerals.

The reaction mechanism responsible for the pyromorphite-like minerals formation in soils is unknown, but studies mentioned above point to highly complex and time dependent reactions between Pb-P, which are barely affected by other cations commonly present on soils. Ma *et al.* (1994) reported that the presence of Cd, Fe and Cu only affect pyromorphite formation when in high concentrations. Mavropoulos *et al.* (2005) show that the presence of Cu and Cd in aqueous solution does not interfere with the Pb-P phases formation, and the uptake of these elements by Brazilian phosphate rocks is diminished when Pb is present. However, thermodynamic calculations (Porter *et al.* 2004) indicate that Ca can inhibit Pb-P formation and for an efficient immobilization by P, excess of P needs to be available to react with all soluble Ca in soils.

SEM images and EDS analysis confirm the presence of Pb-P phases in soil and waste samples, with SP and PR treatments, after 6 months of contact. Soil A (Fig. 4.2), Soil B (Fig. 4.3) and Waste B samples (Fig. 4.4) present phases with both Pb and P, identified by EDS spectra, despite the absence of crystalline particles with the characteristic habit of pyromorphite-like minerals. The formation of an intermediary phase of Ca-Pb-P was shown by Mavropoulos *et al.*

(2002, 2004) and was also identified in some samples, by EDS-SEM, specially in Soil A, which suggests the influence of Ca on pyromorphite formation (Porter *et al.* 2004). Apatite-like $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3]$ minerals were also identified on samples treated with NaH_2PO_4 (not shown), which confirms the interference of Ca on Pb-phosphate phases formation. Spectrum of Soil A (Fig. 4.2) also shows a relatively intense peak of Mn, which can be related to the formation of MnHPO_4 , predicted by Porter *et al.* (2004), when enough P is present in the system.

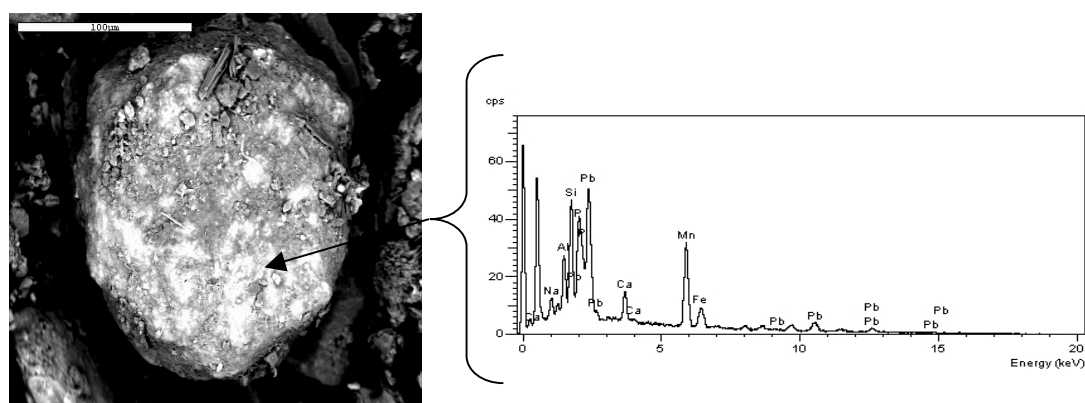


Figure 4.2: SEM image of particles of Soil A and EDS spectrum showing Pb-P phase association (in white) in a soil particle after 6 months treatment with super phosphate (SP6) (bar=100 μm).

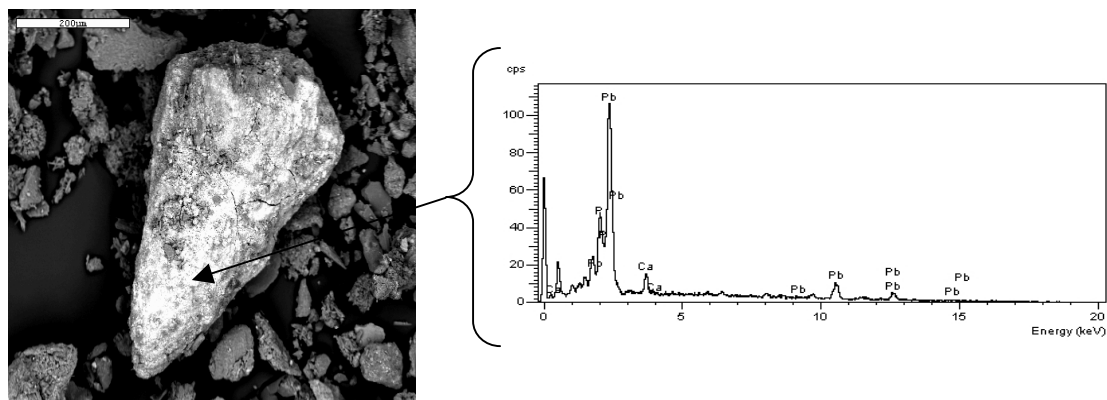


Figure 4.3: SEM image of particles of Soil B and EDS spectrum showing Pb-P phase association (in white) in a soil particle after SP6 treatment (bar= 200 μm).

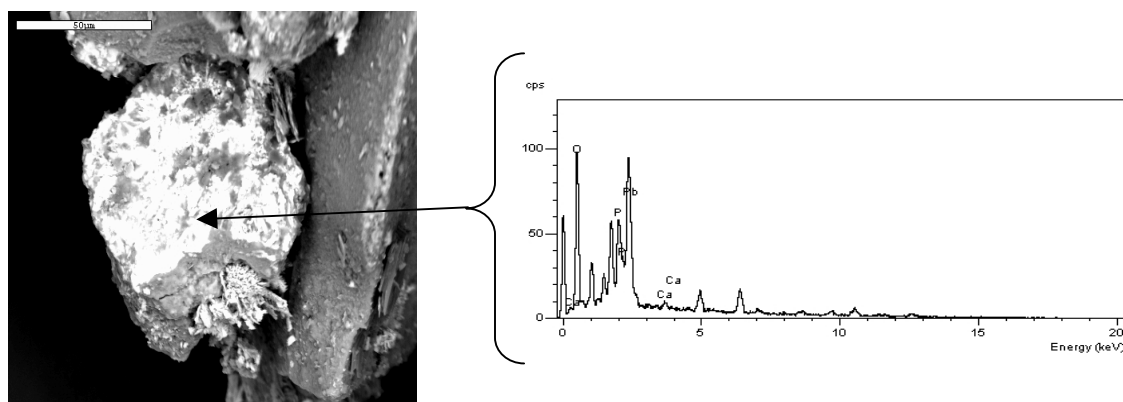


Figure 4.4: SEM image of Waste B sample and EDS spectrum showing Pb-P (in white)

association and the incipient formation of needles, after SP6 treatment (bar= 50 μm).

Images and spectra of Waste A particles after 6 months of contact with NaP, SP and PR are shown in Figures 4.5, 4.6 and 4.7, respectively. In the three images acicular particles are visualized, corresponding to the prismatic habit of pyromorphite. The relative intensities of P and Pb peaks in the EDS spectra also suggest the presence of a lead phosphate.

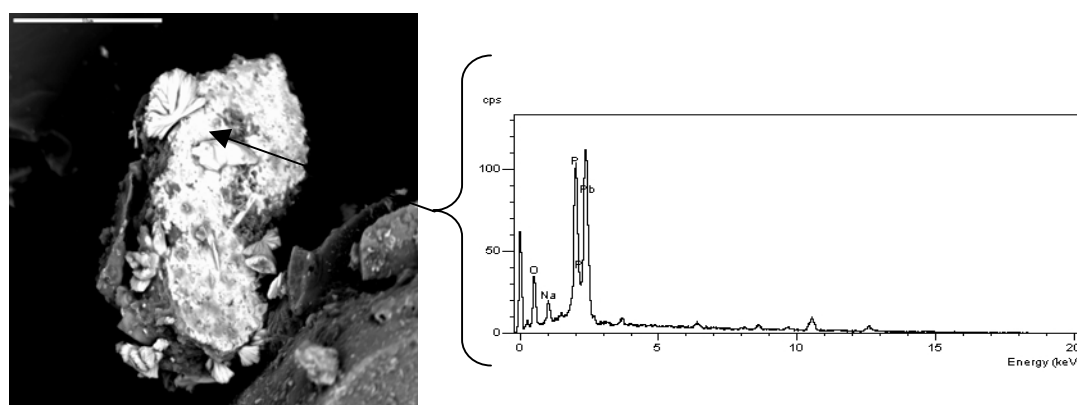


Figure 4.5: SEM image of Waste A particles with typical habit of pyromorphite-like minerals and EDS spectrum showing Pb-P (in white), NaP6 treatment (bar= 50 μm).

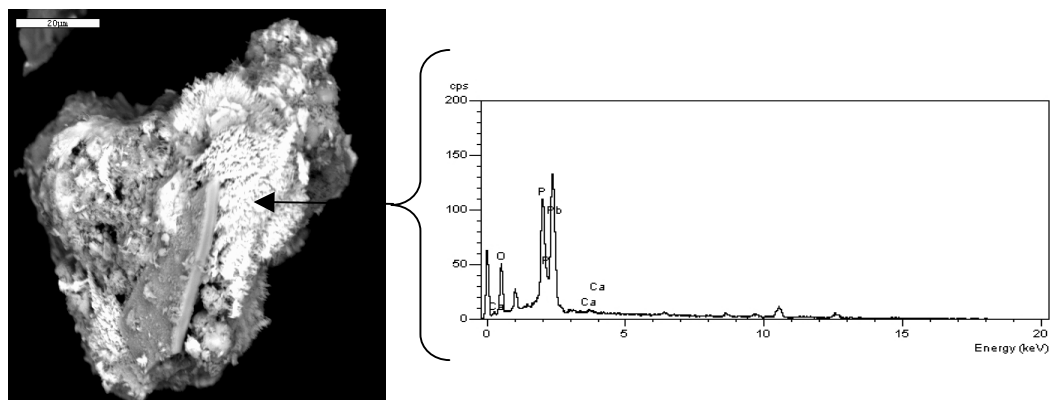


Figure 4.6: SEM image of Waste A particles with typical habit of pyromorphite-like minerals and EDS spectrum showing Pb-P (in white), SP6 treatment (bar= 20 μm).

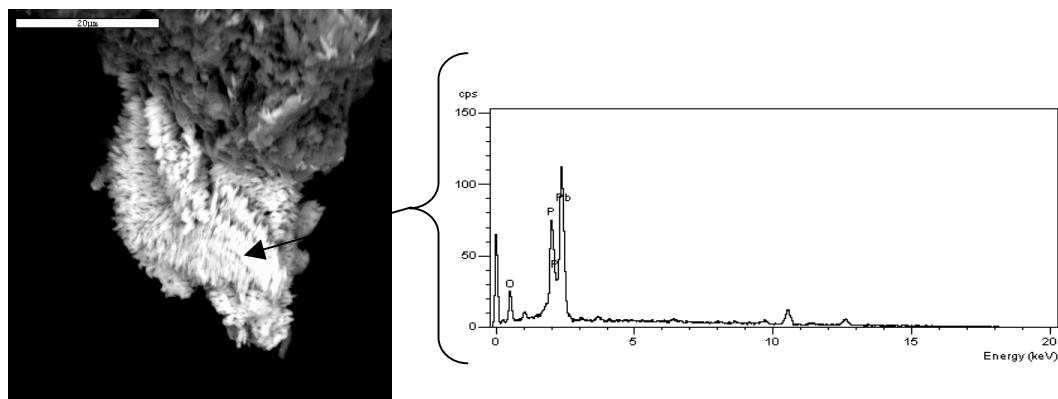


Figure 4.7: SEM image of Waste A particles, after PR6 treatment, with typical habit of pyromorphite-like minerals and EDS spectrum showing Pb-P (in white), (bar= 20 μm).

Figure 4.8 shows the elemental map chart of a grain of Waste A sample, obtained by EDS after 6 months of treatment with superphosphate. Lead, phosphorus and chlorine are present at the same spots, indicating the presence of compound with these elements. In the same grain, calcium is absent while the association of Pb-P-Cl suggests the formation of pyromorphite-like phase in this sample. Soil A, Soil B and Waste B elemental maps (not shown) also had the kind of elemental association observed in Waste A.

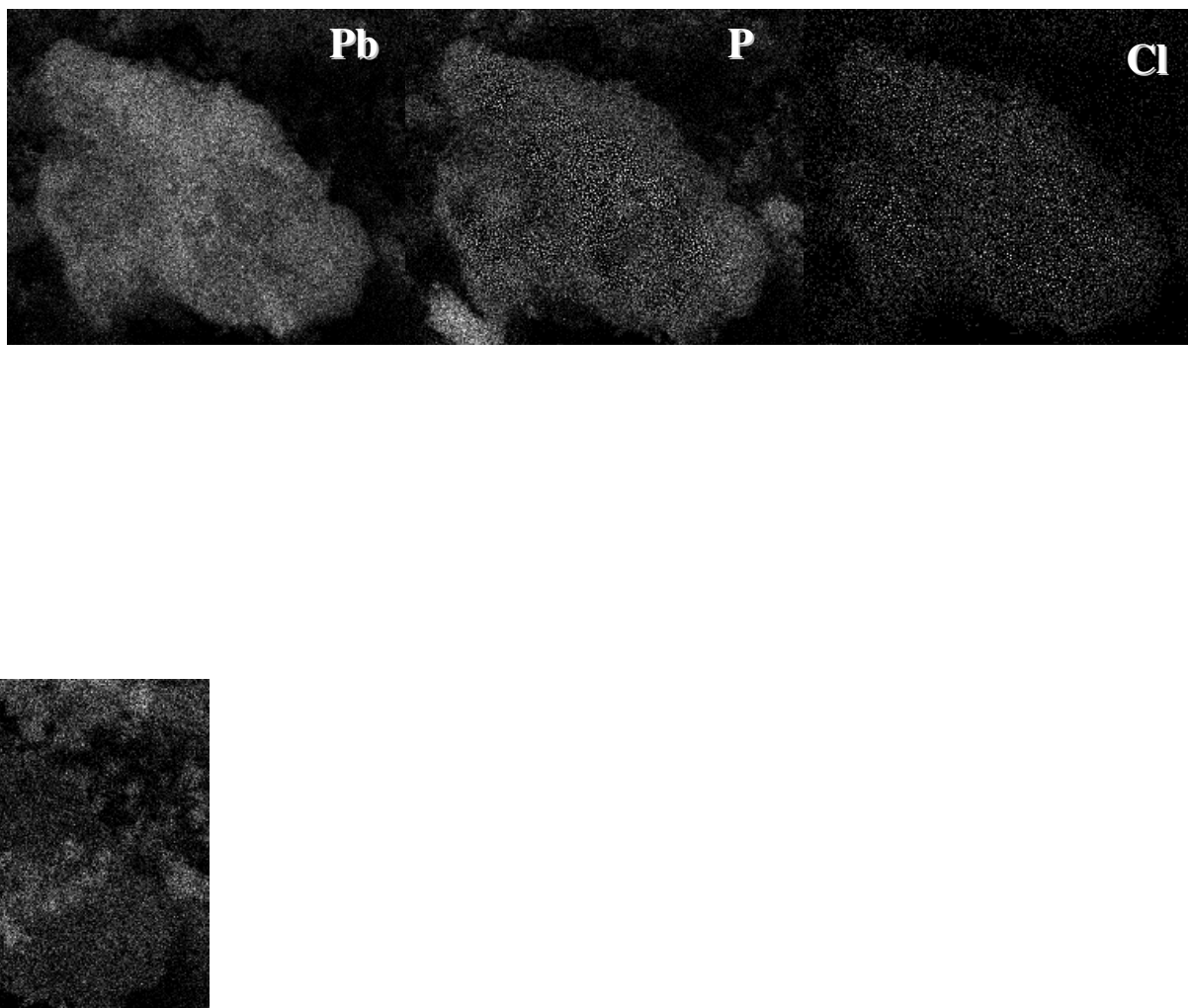


Figure 4.8: Elemental map chart (EDS) and electron backscattering (BS) image of a grain of Waste A showing the association between Pb-P-Cl in a Pb bearing phase after 6 moths of treatment with superphosphate.

The reaction with Pb depends on the release of P. The PR contains quite insoluble apatite ($K_{sp} \approx 10^{-60}$), that needs relatively low pH to dissolve. The addition of H_3PO_4 has been proposed by some authors (Laperche *et al.* 1996, 1997, Hettiarachchi *et al.* 2001), but acidification of the soil can increase P leaching and favor eutrophication of surface waters, an undesirable by-product of these remediation methods (Basta and McGowen, 2004). The pH of Soils A and B was 5.4 and 5.8, which contributes to slow P dissolution. The addition of P sources to the samples slightly decreased the pH. The pH of the slurries (sample + P compound + water) values were always

between 4.0 and 5.0, which is considered the best pH value for lead immobilization reactions (Chen *et al.*, 2003, Zhang and Ryan 1998). The solubility of Pb-P phases, including Pb-Ca-P association, is lower in this pH range as shown by Zhang and Ryan (1999a,b). In alkaline pH values, lead dissolution is controlled by dissolved organic matter in solution, as showed Martinez *et al.* (2004).

4.3.2 Bioaccessible lead

Data of bioaccessible lead in Soil A, Soil B, Waste A and Waste B before P treatment, using the modified PBET are shown in Table 4.2. The absolute amounts of lead soluble in gastric and duodenal conditions are shown and percent fractions are relative to the amount of lead dissolved in aqua regia. All samples present high solubility in simulated gastric conditions. In a previous study, not published yet, the bioaccessible lead fraction was determined in eight soils samples (composite and core samples) from the same area, and for all, high solubility (50-80 % m/m) in acidic (gastric) conditions was observed. In near neutral conditions (duodenum) 12% in average, of total lead remained soluble. Waste samples presented high Pb solubility in acidic solution.

Table 4.2: Bioaccessible lead fraction in gastric (pH 1.7) and duodenal (pH 6.9) simulated conditions of selected samples before P treatment

Sample	Pb soluble (pH 1.5) (mg.kg ⁻¹)	Bioaccessible fraction (%)	Pb soluble (pH 6.9) (mg.kg ⁻¹)	Bioaccessible fraction (%)
Soil A	24,500	68	2,520	7
Soil B	7,300	72	1,730	17
Waste A	131,700	89	8,880	6
Waste B	9,500	79	720	6

4.3.3 Bioaccessible lead after phosphate treatment

The bioaccessible lead fractions determined in Soil A and Soil B, after one, three and six months of each phosphate treatment are depicted in Figures 4.9 and 4.10, respectively. Control

sample refers to the results of lead bioaccessible fraction of untreated soil and waste samples.

Pronounced reduction in the amount of bioaccessible lead was observed after NaP treatment. Almost 100% of bioaccessible lead was immobilized in the first month (NaP1) of treatment in the two soil samples, probably due to the acidic media (pH ~ 4.5) of the slurry and the high solubility of the P compound (99.9%). The treatment of the soils with SP showed time

dependence, i.e., the solubility of lead decreased more slowly. After 6 months (SP6) the amount of bioaccessible lead was reduced in 70%, for gastric conditions. With the PR treatment, the solubility of lead decreased more slowly and it was more pronounced only after 6 months (PR6), when solubility could be compared to that of the SP6 treatment.

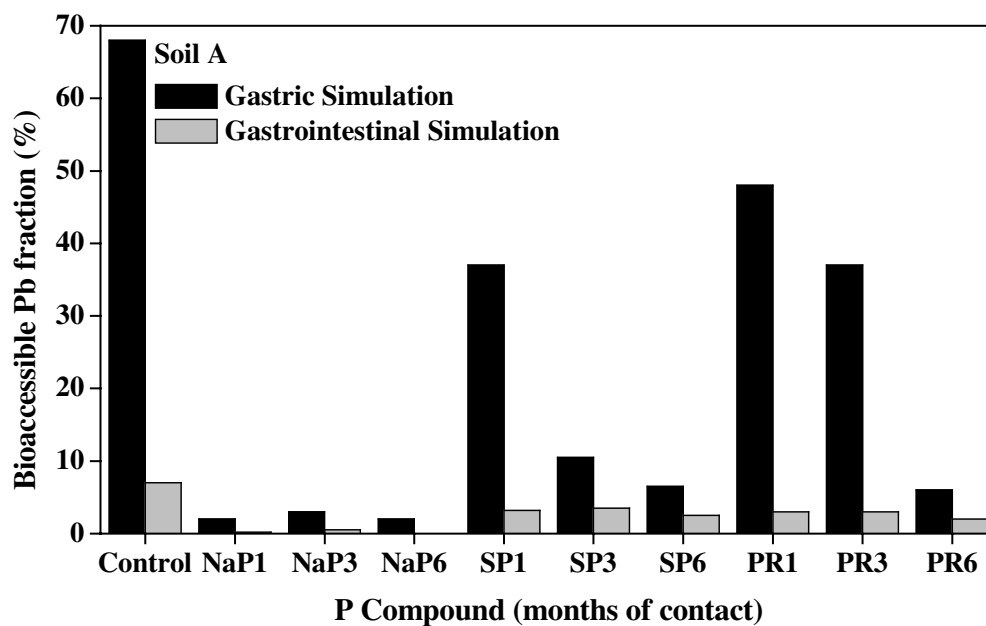


Figure 4.9: Bioaccessible Pb fraction in Soil A after each P-compound treatment, compared to the untreated sample (control)

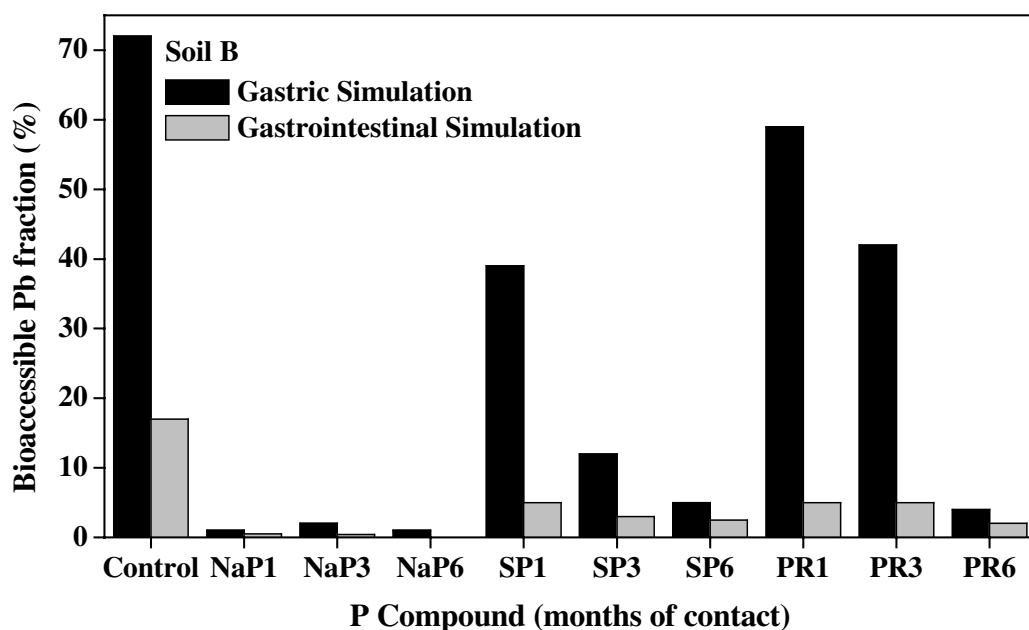


Figure 4.10: Bioaccessible Pb fraction in Soil B after each P-compound treatment, compared to the untreated sample (control)

The bioaccessible lead fractions determined in Waste A and Waste B, after one, three and six months of each phosphate treatment are depicted in Figures 4.10 and 4.11, respectively. The rationale in treating the wastes with P and evaluating bioaccessible lead is because particles from the waste piles probably contribute to the high content of Pb in soils. Answers about the reactivity of P sources and Pb in wastes can provide information for future proposals for amendment of the soils, after removal of the waste piles.

As for soils results, data of Figures 4.11 and 4.12 show that the soluble Pb fraction of the wastes was rapid and significantly reduced after the NaP treatment. Samples treated with SP and PR reacted more slowly, and the amount of soluble lead in acidic media was significantly reduced just after six months of treatment. Under the conditions of the experiments, the three sources presented similar capacity for lead immobilization after 6 months.

The theoretical solubility of lead phosphate compounds (Nriagu 1973, Ruby *et al.* 1994, Porter *et al.* 2004) may not represent their real solubility when the components are in more complex media, like is soil solutions (Martinez *et al.* 2004, Sauvé *et al.* 1998). Martinez *et al.* (2004) show that the activity of Pb^{2+} in aqueous solutions containing three years aged lead-phosphates [$\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, PbHPO_4 and $\beta\text{-Pb}_9(\text{PO}_4)_6$] is 1-2 orders of magnitude higher than predicted by K_{sp} values. This non equilibrium in natural media, like soils, sediments and waters, was attributed to the presence of soluble ligands that dissolve Pb from lead-phosphate minerals and enhance biological availability and mobility of Pb in the environment. Such difficulty may partially be overcome by testing bioaccessibility as done in present work and by others (e.g., Ryan *et al.* 2004).

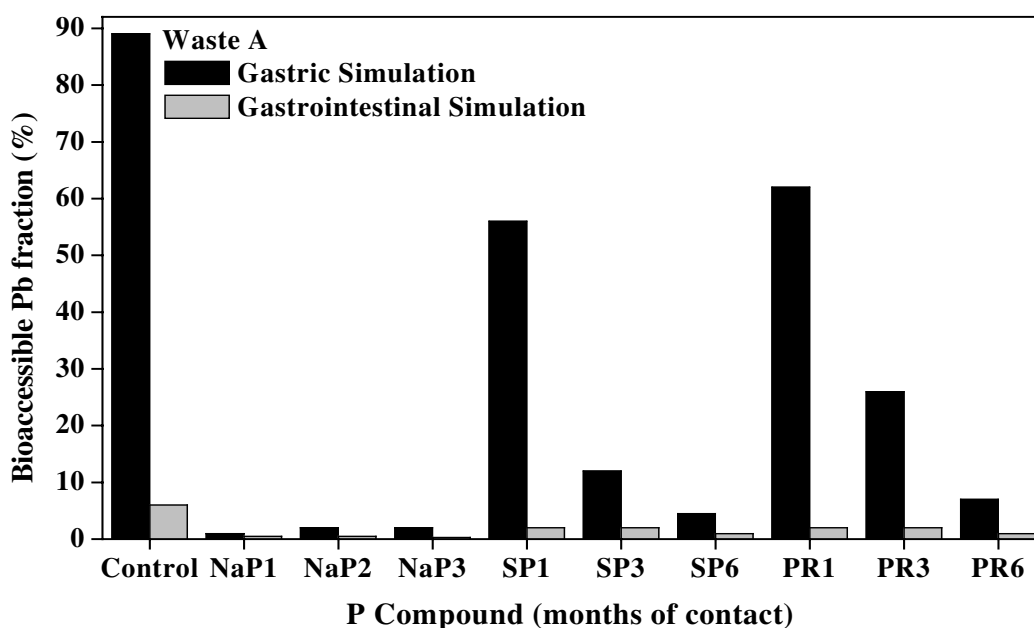


Figure 4.11: Bioaccessible Pb fraction in Waste A after each P-compound treatment, compared to the untreated sample (control)

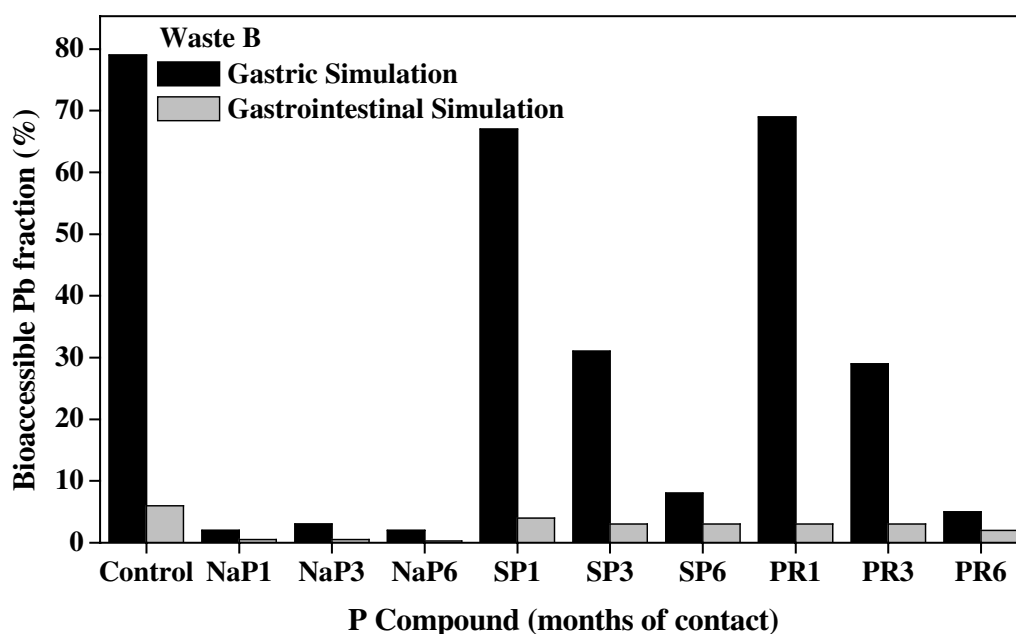


Figure 4.12: Bioaccessible Pb fraction in Waste B after each P-compound treatment, compared to the untreated sample (control)

The results of reduction in lead solubility and formation of Pb-P phases are comparable to most others already cited, but few studies evaluated Pb bioaccessibility of the products. The presence of pyromorphite-like minerals in aqueous solutions, after Pb and soluble P addition, in acidic media ($\text{pH} > 3$) were identified, as shown by Ma *et al.* (1993), Zhang *et al.* (1998) and Zhang and Ryan, 1998, 1999a,b). Arnich *et al.* (2003), using a solution of apatite and synthetic lead salts, did not identify pyromorphite-like minerals by XRD, but results of an *in vivo* experiment, conducted on rats, show that when apatite and lead were present in water chronically administered to rats, the reduction in lead bioavailability was 60%. The authors also reported that intestinal and renal cells and calcium-phosphate metabolism of rats were not affected.

Ideally an *in situ* amendment of metal-contaminated soils should be made with inexpensive, abundant materials as stabilizing agents and the long-term efficiency, regarding mobility, bioavailability and toxicity of metals and should be conducted. Despite the fast

reduction on lead solubility with NaP, an immobilization treatment with this compound has poor cost-benefit, due to the high cost of NaP compounds compared to SP and PR materials. Considered the only significant global resource for phosphorus (Knox *et al.*, 2006), phosphate rocks have relative low cost, are relatively abundant, and according to our results, are very effective in lead immobilization, but the pH and time dependences should be taken into account. Super phosphate, a common commercial fertilizer, appears to be the most effective and low cost material for P amendment. The reaction is not as fast as with NaP, but after 3 months of SP addition to the soils, the lead soluble fraction was reduced up to 70% in gastric conditions.

The bioaccessibility tests showed a significant reduction in Pb solubility in the samples after the treatment with the phosphate materials and are in agreement with other studies published in past years. The acidic conditions (pH~1.5) of *in vitro* tests can dissolve neo-formed Pb-P phases specially when organic ligands are present (Martinez *et al.* 2004) as occurs with the complex solutions used to simulate gastric and duodenal media. This artifact would underestimate the amount of Pb-P compounds in the treated materials. The data of this work do not confirm the observation of Martinez *et al.* (2004). The bioaccessible Pb after the NaP treatment is low and does not change with time, while lead solubility, with SP and PR treatments decreases with time.

Sheckel *et al.* (2005) suggested that selective sequential extraction and physiologically bases extraction test methods induced the precipitation of pyromorphite during the extraction procedures and recommended the application of spectroscopic methods to identify the products. In present study, results of EDS and SEM indicate the Pb-phosphate was already formed before the PBET was applied to the samples. On the other side, according to Oomen *et al.* (2003), compared to the bioaccessible fraction that is easily transported, as lead-bile complexes, across intestinal cells, only a minor fraction of Pb-P phases can be transported. This observation

suggests that even in the absence of well formed Pb-P compounds, the presence of phosphate would inhibit Pb absorption. According to Porter *et al.* (2004), any application of dissolved phosphate to Pb contaminated soil will change some of it to chloropyromorphite, meaning that bioavailability will necessarily decrease. If it could provide a permanent reduction to acceptable is still an open question. It must be remembered that most studies do not considered the role of microorganisms which can make insoluble soil phosphate bioavailable as well as the dissolution metal phosphates by free living and symbiotic fungi, as noted by Sayer et al. (1999). The same authors demonstrated the biogenic transformation of pyromorphite to lead oxalate dihydrate by *A. niger*.

A field study at the site, as done by others (e.g., Yang *et al.* 2002) and ideally considering an integrated approach would be a necessary next step before any recommendation can be made.

4.4 Conclusions

Addition of soluble P phases on contaminated soils reduced significantly the soluble lead fraction by precipitation of lead phosphate minerals. The reaction kinetics is controlled by P solubility. The identification of neo-formed stable phases was difficult by instrumental analysis, but mineralogical habit and chemical composition indicate the formation of new and more stable phases. The P-treated soils and waste materials showed significant reduction in solubility in the PBET as compared to the control. The formation of stable phases by super phosphate and phosphate rock addition to the samples indicate that the application of these materials on the soils is a promising remediation method. *In situ* experiments could be conducted and other toxic elements could be included in the evaluation.

Due to the lack of protection around waste piles and the high solubility of lead in these materials, their presence represents high risk to the inhabitants of the area and requires some

action. The best would be the removal of waste piles and phosphate amendment of soils.

4.5 References

- Arnich, N., Lanhers, M.C., Laurensot, F., Podor, R., Montiel, A., Burnel, D. 2003. In vitro and in vivo studies of lead immobilization by synthetic hydroxyapatite. *Environmental Pollution*, 124, 139-149
- Basta, N.T. and McGowen, S.L. 2004. Evaluation of chemical immobilization treatments for reducing heavy metal transport in a smelter-contaminated soil. *Environmental Pollution*, 127, 73-82
- Brown, G. E., Foster, A. L., Ostergren, E. 1999. Mineral surfaces and bioavailability of heavy metals: A molecular-scale perspective. *Proceedings of the National Academy of Science*, 96, 3388-3395
- Brown, S., Chaney, R., Hallfrisch, J., Ryan, J., Berti, W. 2004. In situ soil treatment to reduce phyto- and bioavailability of lead, zinc and cadmium. *Journal of Environmental Quality*, 33, 522-531
- Cao, X., Ma, L.Q., Chen, M., Singh, S.P., Harris, W.G., 2002a. Phosphate induced metal immobilization in a contaminated site. *Environmental Pollution*, 122, 19-28.
- Cao, X., Ma, L.Q., Chen, M., Singh, S.P., Harris, W.G., 2002b. Impacts of Phosphate amendments on lead biogeochemistry at a contaminated site. *Environmental Science and Technology*, 36, 5296-5304
- Chen M, Ma L. Q. 2001. Comparison of Three Aqua Regia Digestion Methods for Twenty Florida Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 65, 491–499
- Chen, M., Ma, L. Q., Singh, S. P, Cao, R. X., Melamed, R. 2003. Field demonstration of in situ immobilization of soil Pb using P amendments. *Advances in Environmental Research*, 8, 93-102
- Clevenger, T.E., Salwan, C., Koirtiyohann, S.R. 1991. Lead speciation of particle on air filters collected in the vicinity of a lead smelter. *Environmental Science and Technology*, 25, 1128-1133
- Enzweiler J, Vendemiatto MA. 2004. Analysis of sediments and soils by X-ray fluorescence spectrometry using matrix corrections based on fundamental parameters. *Geostandard*

Geoanalysis Research, 28, 103-112

- Eusden JD, Gallagher L, Eighmy TT, Crannell BS, Krzanowski JR, Butler LG, Cartledge FK, Emery EF, Shaw EL, Francis CA 2002 Petrographic and spectroscopic characterization of phosphate-stabilized mine tailings from Leadville, Colorado. *Waste Management* 22: 117-135
- Freeman, G. B., Johnson, J. D., Killinger, J. M., Liao, S. C., Feder, P. I., Davis, A. O., Ruby, M. V., Chaney, R. L., Lovre, S. C., Bergstrom, P. D. 1992. Relative bioavailability of lead from mining waste soil in rats. *Toxicological Science*, 19, 388-398
- Geysen, D., Imbrechts, K., Vandecasteele, C., Jaspers, M., Wauters, G. 2004. Immobilization of lead and zinc in scrubbers residues from MSW combustion using soluble phosphates. *Waste Management* 24, 471-481
- Hettiarachchi, G. M., Pierzynski, G. M., Ransom, M. D. 2000. *In situ* stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide. *Environmental Science and Technology*, 34, 4614-4619
- Hettiarachchi, G. M., Pierzynski, G. M., Ransom, M. D. 2001. *In situ* stabilization of soil lead using phosphorus. *Journal of Environmental Quality*, 30, 1214-1221
- Hettiarachchi, G. M., Pierzynski, G. M., Oheme, F. W., Sonmez, O., Ryan, J. A. 2003. Treatment of contaminated soil with phosphorus and manganese oxides reduces lead absorption by Sprague-Dawley rats. *Journal of Environmental Quality*, 32, 1335-1345
- Hettiarachchi, G. M., Pierzynski, G. M. 2004. Soil lead bioavailability and *in situ* remediation of lead-contaminated soils: A review. *Environmental Progress*, 23, 78-92
- Knox, A. S., Kaplan, D. I., Paller, M. H. 2006. Phosphate sources and their suitability for remediation of contaminated soils. *Science of the Total Environment*, 357, 271– 279
- Laperche V., Traina S. J., Gaddam F., Logan T. J. 1996. Chemical and mineralogical characterization of Pb in a contaminated soil: reactions with synthetic apatite. *Environmental Science and Technology*, 30, 3321-3326
- Laperche V., Logan T. J., Gaddam F., Traina S. J. 1997. Effect of apatite amendments on plant uptake of lead from contaminated soil. *Environmental Science and Technology*, 31, 2745-2753
- Ma, Q. Y., Traina, S. J., Logan, T. J. 1993. In-situ lead immobilization by apatite. *Environmental Science and Technology*, 27, 1803-1810
- Ma, Q. Y., Traina, S. J., Logan, T. J., Ryan, J. A. 1994. Effects of aqueous Al, Cd, Cu, Fe(II), Ni

- and Zn on Pb immobilization by hidroxiapatite. *Environmental Science and Technology*, 28, 1219-1228
- Ma, Q. Y., Logan, T. J., Traina, S. J. 1995. Lead immobilization from aqueous solutions and contaminated soils using phosphate rocks. *Environmental Science and Technology*, 29, 1118-1126.
- Martinez, C. E., Jacobson, A. R., McBride, M. B. 2004. Lead phosphate minerals: solubility and dissolution by model and natural ligands. *Environmental Science and Technology*, 38, 5584-5590
- Mavropoulos, E., Rossi, A. M., Costa, A. M., Perez, C. A. C., Moreira, J. C., Saldanha, M. 2002. Studies on the mechanisms of lead immobilization by hidroxiapatite. *Environmental Science and Technology*, 36, 1625-1629
- Mavropoulos, E., Rocha N. C. C., Moreira, J. C., Rossi, A. M., Soares, G. A. 2004. Characterization of phase evolution during lead immobilization by synthetic hydroxiapatite. *Materials Characterization*, 53, 71-78.
- Mavropoulos, E., Rocha, N. C. C., Moreira, J. C., Bertolino, L. C., Rossi, A., M. 2005. Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} ions uptake by brazilian phosphate rocks. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 16, 62-68
- Melamed, R., Cao, X.D., Chen, M., Ma, L.Q. 2003. Field assessment of lead immobilization in a contaminated soil after phosphate application. *Science of the Total Environmental*, 305, 117-127
- Mench, M., Vangronsveld, J., Didier, V., Clijsters, H. 1994. Evaluation of metal mobility, plant availability and immobilization by chemical agents in a limed-silty soil. *Environmental Pollution*, 86, 279-286.
- Morin, G., Juillot, F., Ildefonse, P., Calas, G., Samama, J.C., Chevallier, P., Brown, G.E. 2001. Mineralogy of lead in a soil developed on a Pb-mineralized sandstone (Largentiere, France). *American Mineralogist*, 86, 92-104
- Nriagu, J.O. 1973. Lead orthophosphates II. Stability of chloropyromorphite at 25 °C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 37: 367-377
- Nriagu, J.O. 1974. Lead orthophosphates IV. Formation and stability of chloropyromorphite in the environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 38: 887-898
- Paoliello, M.M.B., De Capitani, E.M., Da Cunha, F.G.A., Matsuo, T., Carvalho, M.D., Sakuma,

- A., Figueiredo, B.R. 2002. Exposure of children to lead and cadmium from a mining area of Brazil. *Environmental Research*, 88, 120-128
- Paoliello, M.M.B., De Capitani, E.M., Cunha, F.G., Carvalho, M.F., Matsuo, T., Sakuma, A., Figueiredo, B.R. 2003. Determinants of blood lead levels in an adult population from a mining area in Brazil. *Journal de Physique IV*, 107, 127-130
- Oomen, A. G., Tolls, J., Sipes, A.J. A. M., Groten, J. P. 2003. *In vitro* intestinal lead uptake and transport in relation to speciation. *Archives of the Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 116-124
- Ruby, M. V., Davis, A., Link, T. E., Schoof, R., Chaney, R. L., Freeman, G. B., Bergstrom, P. 1993. Development of an *in vitro* screening test to evaluate the *in vivo* bioaccessibility of ingested mine wastes lead. *Environmental Science and Technology*, 27, 2870-2877
- Ruby, M. V., Davis, A., Nicholson, A. 1994. *In situ* formation of lead phosphates in soils as a method to immobilize lead. *Environmental Science and Technology*, 28, 646-654
- Ruby M. V., Davis A., Schoof R., Eberle S., Sellstone C.M. 1996. Estimation Of Lead And Arsenic Bioavailability Using A Physiologically Based Extraction Test. *Environmental Science and Technology*, 30, 422-430
- Ruby M. V., Schoof R., Brattin W., M. Goldade M., Post G., Harnois M., Mosby D. E., Casteel S. W., Berti W., Carpenter M., Edwards D., Cragin D., And W. Chappell W. 1999. Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganics in Soil for Use in Human Health Risk Assessment. *Environmental Science and Technology*, 33: 3697-3705
- Ryan J. A., Zhang P., Hesterberg D., Chou J., Sayers, D. 2001. Formation of chloropyromorphite in lead-contaminated soil amended with hydroxiapatite. *Environmental Science and Technology*, 35, 3798-3803
- Ryan N. J. A., Scheckel K. G., Berti W. R., Brown S.L., Casteel S. W., Chaney R. L., Hallfrisch J., Doolan M., Grevat P., Maddaloni M., Mosby D. 2004. Reducing children's risk from lead in soil. *Environmental Science and Technology*, 38, 19A-24A
- Sauvé, S., McBride, M., Hendershot, W. 1998. Lead phosphate solubility in water and soil suspensions. *Environmental Science and Technology*, 32, 388-393
- Sayer, J. A., Cotter-Howells, J. D., Watson, C., Hillier, S., Gadd, G. M. 1999 Lead mineral transformation by fungi. *Current Biology*, 9, 691-694
- Scheckel, K.G and Ryan, J.A. 2002. Effects of aging and pH on dissolution kinetics and stability

- of chloropyromorphite. *Environmental Science and Technology*, 36, 2198-2204
- Scheckel, K.G and Ryan, J.A. 2004. Spectroscopic speciation and quantification of lead in phosphate-amended soils. *Journal of Environmental Quality* 33: 1288-1295
- U.S. Environmental Protection Agency. 1991. Guidance for data usability in risk assessment, part A. EPA/540/R-92/003, US EPA. Washington, DC. 281 pp
- World Bank Group. 1998. *Lead and zinc smelting*. In: *Pollution Prevention and Abatement Handbook*. World Bank Group, 332-336
- Zhang, P.C., Ryan, J.A., Yang, J. 1998. In vitro soil Pb solubility in the presence of hydroxyapatite. *Environmental Science and Technology* 36, 2763-2768.
- Zhang P.C., Ryan, J. A. 1998. Formation of pyromorphite in anglesite-hydroxiapatite suspension under varying pH conditions. *Environmental Science and Technology*, 32, 3318-3324
- Zhang, P., Ryan, J.A., 1999a. Formation of chloropyromorphite from galena (PbS) in the presence of hydroxyapatite. *Environmental Science and Technology*, 33, 618-624
- Zhang, P., Ryan, J.A., 1999b. Transformation of Pb(II) from cerrusite to chloropyromorphite in the presence of hydroxyapatite under varying conditions of pH. *Environmental Science and Technology*, 33, 625-630
- Yamamoto, N., Takahashi, Y., Yoshinaga, J., Tanaka, A., Shibata, Y. 2006. Size distributions of soil particles adhered to children's hands. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51, 157-163
- Yang, J., Mosby, D. E., Casteel, S. W., Blanchar, R. W, 2002. *In vitro* lead bioaccessibility and phosphate leaching as affected by surface application of phosphoric acid in lead-contaminated soil. *Archives of the Environmental Contamination Toxicology*, 43, 399–405

PARTE 5.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados apresentados por este trabalho confirmaram o passivo ambiental deixado por décadas de exploração de minerais de chumbo na cidade de Adrianópolis/PR. Apesar do fechamento da usina de beneficiamento e o fim da exploração mineral há mais de 10 anos, os solos do entorno da antiga refinaria ainda apresentam altas concentrações de chumbo e as pilhas de rejeito ainda encontram-se na localidade, sem proteção adequada. Por ser uma área com pouca infra-estrutura urbana e social básicas, a população local está constantemente exposta a esse tipo de material, contribuindo para a elevação dos níveis de chumbo no organismo.

A avaliação da bioacessibilidade do chumbo nos solos e rejeitos mostraram que este metal é bastante solúvel nas condições gastro-intestinais, indicando que a ingestão, acidental ou não, dos solos e dos rejeitos pode ser considerada a principal via de exposição ao chumbo à população. Os diferentes testes *in vitro* aqui utilizados apresentaram resultados bastante semelhantes entre si, apesar das diferentes soluções simuladoras empregadas, indicando que testes mais simples podem ser utilizados com sucesso no lugar de soluções complexas na avaliação da bioacessibilidade de chumbo em análises de risco. Devido as suas características de extração, os testes *in vitro* podem ser uma boa e rápida alternativa para avaliações de risco. O desenvolvimento de testes *in vitro* padronizados, junto com materiais de referência específicos para esse tipo de extração, podem ajudar a validar este tipo de procedimento na determinação da biodisponibilidade de metais em materiais contaminados por chumbo.

A imobilização das fases solúveis de chumbo nos solos, pela adição de compostos fosfatados *in situ*, é uma tecnologia emergente de remediação de solos contaminados. A adição de diferentes compostos contendo fosfato às amostras coletadas na localidade, em escala laboratorial, mostraram que há uma redução pronunciada na solubilidade do chumbo avaliada por testes de bioacessibilidade após 6 meses de tratamento. A bioacessibilidade final dos produtos formados apresenta valores bastante comparáveis com a bioacessibilidade da piromorfita, indicando a formação de fases semelhantes nos solos e rejeitos tratados. Superfosfatos e rocha fosfática, por serem materiais relativamente baratos, de fácil aquisição e, conforme os resultados alcançados por este trabalho, apresentarem grande capacidade de imobilização, podem ser boas alternativas para estudos mais detalhados de remediação. Além da avaliação da viabilidade

econômica do método e dos materiais utilizados na imobilização, um estudo de campo em pequena escala, com avaliações da biogeoquímica dos solos após o tratamento com fosfatos, podem viabilizar a execução e garantir a eficiência do método de remediação proposto por este trabalho.