

Sensibilidade de *Lytechinus variegatus*: comparação entre três populações do Estado de São Paulo

Denis M. S. Abessa¹, Camilo D. S. Pereira^{1,2}, Leticia P. Zaroni¹; Marcia R. Gasparro¹ & Eduinetty C. P. M. Sousa¹

Resumo ? Neste trabalho foi avaliada a sensibilidade de embriões de ouriço do mar *Lytechinus variegatus* provenientes de Santos, Ubatuba e São Sebastião, a partir de testes de toxicidade com sulfato de zinco e o tensoativo DSS. As CE50 estimadas variaram de 0,09 a 0,15 mg/l de ZnSO₄ e de 1,35 a 2,945 mg/l ao DSS, indicando que as três populações testadas possuem sensibilidade semelhante. Assim, resultados de testes de toxicidade com organismos originários de qualquer um dos três locais podem ser comparados sem necessidade de ajuste.

Palavras chave ? *Lytechinus variegatus*, Zinco, DSS, São Paulo.

I. INTRODUÇÃO

Testes de toxicidade são usados com diferentes e importantes finalidades, tais como estabelecimento de limites máximos para emissão de efluentes líquidos, monitoramento ambiental de corpos hídricos receptores e determinação de áreas críticas, entre outros.

No Estado de São Paulo, testes com gametas e embriões do ouriço do mar *Lytechinus variegatus* estão entre os mais empregados, e vêm sendo utilizados rotineiramente por diversos laboratórios desde a década de 90 [1]. Estes laboratórios geralmente adotam procedimento experimental descrito na norma CETESB L5.250 [2], ou adaptado de normas similares internacionais [3]. No entanto, cada laboratório utiliza em seus experimentos embriões provenientes de populações coletadas em locais diferentes. Este fato implica na introdução, ou na existência, de uma variável espacial que deve necessariamente ser considerada na interpretação dos resultados de ensaios ecotoxicológicos. Uma vez que os testes de toxicidade são interpretados de forma comparativa em relação a controles positivos (existência de efeito) e/ou negativos (ausência de efeito), e que muitas vezes os resultados produzidos por um teste são extrapolados para locais diversos daqueles onde a população teste foi coletada, é imprescindível que algumas perguntas sejam respondidas antes que os resultados sejam aplicados de forma extensiva.

Assim, questões primordiais a serem respondidas são: Resultados obtidos com populações provenientes de locais diferentes são comparáveis? Se forem comparáveis, os resultados são equivalentes ou necessitam de ajuste? Uma possível resposta pode ser obtida pelo conhecimento da sensibilidade das populações testadas em laboratório a diferentes substâncias com toxicidade conhecida, seguida da comparação dos resultados. Essa comparação é necessária para que dados produzidos com organismos de origens

diferentes possam ser interpretados partindo de um ponto em comum.

Em estudos ecotoxicológicos, a sensibilidade do lote de organismos utilizados é estimada a partir de ensaios com substâncias padrão, pré-definidas nos protocolos, e denominadas substâncias de referência. Os manuais recomendam uma série de substâncias de referência possíveis, de modo que a situação atual entre os laboratórios paulistas é a de que cada um utiliza uma substância diferente, impossibilitando comparações de resultados entre laboratórios.

O presente trabalho foi delineado visando comparar a sensibilidade de embriões de *L. variegatus* provenientes de três populações normalmente utilizadas em estudos ecotoxicológicos no estado de São Paulo (Santos, São Sebastião e Ubatuba), a partir de testes com duas substâncias de referência. A análise dos resultados permitiu ainda a realização de uma comparação interlaboratorial preliminar entre os procedimentos adotados nos laboratórios de ecotoxicologia do Instituto Oceanográfico da USP (IOUSP) e da Universidade Santa Cecília (Unisantia).

II. MATERIAL E MÉTODOS

Em cada experimento, foram coletados por meio de mergulho livre cerca de 20 exemplares adultos de *L. variegatus*, em três diferentes pontos da costa do Estado de São Paulo (Fig. 1), normalmente utilizados como sítios de coleta por alguns laboratórios localizados no estado: 1- Ilha das Palmas, Santos, utilizado por pesquisadores da Unisantia; 2- Praia Preta, São Sebastião, utilizado por pesquisadores da CETESB e CEBIMAR-USP; e 3- Enseada do Flamengo, Ubatuba, utilizado por pesquisadores do IOUSP. Após a coleta, os animais foram transferidos para o laboratório, onde

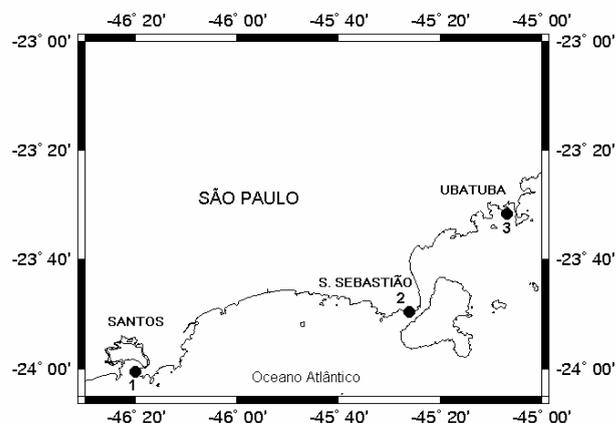


Fig. 1. Sítios de coleta de *L. variegatus* na costa centro norte de São Paulo.

¹ Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. dmabessa@usp.br
Proc. Fapesp. 98/00808-6

² Universidade Santa Cecília. lecotox@stcecilia.br

foram mantidos em tanques com água do mar filtrada e aeração constante até sua utilização.

Os gametas foram obtidos por meio de indução osmótica (populações de Ubatuba e São Sebastião) ou elétrica (população de Santos). A indução osmótica consistiu na injeção de cerca de 3 ml de solução de cloreto de potássio 0,5M na cavidade celomática do ouriço, enquanto a indução elétrica consistiu na estimulação por meio de choques utilizando-se um circuito elétrico de corrente alternada com transformador de 35V.

O esperma foi coletado a seco com auxílio de conta-gotas e transferido para um béquer mantido dentro de uma caixa com gelo. Os óvulos foram coletados por precipitação, colocando-se as fêmeas sobre béqueres, com a região aboral em contato com a água. Foram coletados gametas de pelo menos 3 indivíduos de cada sexo.

Em seguida os óvulos foram gentilmente lavados e então se procedeu à fecundação, pela adição de uma solução de esperma à solução de óvulos. Após 15 minutos, o sucesso da fecundação foi confirmado pela presença de membrana de fertilização em pelo menos 80% dos ovos.

A água utilizada em cada teste, como controle, água de diluição e no procedimento de obtenção dos óvulos, foi coletada em local afastado da costa no respectivo sítio de coleta dos ouriços e filtrada em membrana Millipore 0,45 µm.

Como substâncias de referência testadas, foram utilizados o tensoativo aniônico dodecil sulfonato de sódio (DSS) e o sulfato de zinco (ZnSO₄). Para as duas substâncias, foram preparadas soluções estoque de 100 mg/l, pela diluição de sais puros em água do mar filtrada.

A partir das soluções estoque de cada substância, foram preparadas as respectivas soluções teste. Para o DSS foram utilizadas as concentrações de 25,0; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625 mg/l; enquanto para o ZnSO₄, foram preparadas as seguintes concentrações: 0,02; 0,06; 0,10; 0,14; 0,18 e 0,22 mg/l.

Os experimentos foram conduzidos em tubos de ensaio contendo 10 ml de solução teste. Para cada tratamento, foram utilizadas 4 réplicas. Em cada réplica foram introduzidos cerca de 300 ovos, e o conjunto foi mantido sob temperatura constante de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h/12h, com auxílio de câmara incubadora ou sala climatizada. Após cerca de 24h, os experimentos foram finalizados e os embriões fixados pela adição de 0,5 ml de formaldeído aos frascos testes.

Posteriormente, o conteúdo de cada réplica foi observado sob microscópio em lâmina de Sedgewick-Rafter. Os primeiros 100 embriões foram contados e seu grau de desenvolvimento foi analisado. Embriões que atingiram estágio de larva pluteus bem desenvolvido foram considerados normais, enquanto que aqueles apresentando alteração morfológica e/ou retardo no desenvolvimento foram considerados afetados.

Para as populações da Ilha das Palmas e Enseada do Flamengo, foram realizados quatro experimentos com DSS e ZnSO₄. Estes testes foram realizados nos laboratórios da Unisanta e da Base Norte do IOUSP, respectivamente. Já com organismos provenientes de São Sebastião, foram

realizados dois experimentos com DSS (no CEBIMAR-USP) e um experimento com zinco (na Unisanta).

Em cada experimento, os resultados obtidos para cada substância foram analisados pelo método estatístico Trimmed Spearman-Kärber com correção de Abbott [4], para cálculo da concentração efetiva a 50% dos organismos (CE50). Em seguida, para animais de um mesmo local, foi calculada uma CE50 média por substância. As médias obtidas para as populações de Ubatuba e Santos foram então comparadas por teste t' Student.

III. RESULTADOS

Os resultados obtidos para a sensibilidade ao sulfato de zinco e DSS estão representados nas tabelas I e II, respectivamente.

TABELA I
RESULTADO DOS TESTES DE TOXICIDADE COM SULFATO DE ZINCO E DA CE50 MÉDIA PARA CADA SÍTIO DE COLETA.

	CE _{50-24h} – ZnSO ₄ (mg/l)		
	Santos	Ubatuba	São Sebastião
Teste 1	0,06	0,19	0,1302
Teste 2	0,11	0,11	-
Teste 3	0,11	0,19	-
Teste 4	0,09	0,12	-
Média + 2 DP	0,0925 ± 0,02	0,1525 ± 0,04	0,1302
CV (%)	25,54	28,52	não calculável

TABELA II
RESULTADO DOS TESTES DE TOXICIDADE COM DSS E DA CE50 MÉDIA PARA CADA SÍTIO DE COLETA.

	CE _{50-24h} – DSS (mg/l)		
	Santos	Ubatuba	São Sebastião
Teste 1	1,50	2,22	2,35
Teste 2	3,03	1,60	3,54
Teste 3	1,97	0,77	1,63
Teste 4	1,15	0,81	-
Média + 2 DP	1,91 ± 0,817	1,35 ± 0,695	2,5067 ± 0,965
CV (%)	42,73	51,45	38,29

IV. DISCUSSÃO

Atualmente, testes de toxicidade vêm sendo aplicados crescentemente e, ocasionalmente seus resultados têm sido utilizados como principal componente de estudos ambientais, muitas vezes sem o conhecimento adequado da sensibilidade dos organismos ou sem informações prévias a respeito da possibilidade dos resultados serem extrapolados para a natureza.

No Brasil, um exemplo clássico que ilustra esta questão é a respeito do tanaidáceo *Kalliapseudes schubartii*. Organismos naturais do estuário do Rio Cubatão (SP) foram considerados muito resistentes a poluentes tóxicos e inviáveis para uso em ensaios ecotoxicológicos [5], enquanto animais provenientes da Lagoa dos Patos foram sensíveis a diversas substâncias, sendo utilizados em testes com sedimentos estuarinos [6].

No presente estudo, as três populações apresentaram sensibilidade semelhante para as duas substâncias testadas.

Para o sulfato de zinco, a população de Santos apresentou-se levemente mais sensível que as demais, porém esta diferença não é significativa. Os resultados obtidos para as populações de Ubatuba e São Sebastião foram bastante semelhantes. Os valores de CE50 obtidos para as 3 populações para ZnSO₄ estiveram dentro da faixa aceitável, de 0,145 ± 0,082 mg/l, segundo dados internos do laboratório da Universidade Santa Cecília [7]. No entanto, os valores são maiores que os observados por [8]. A autora observou uma CE50 média de 0,044 mg/l para a população de São Sebastião. Possivelmente, estas diferenças resultaram do uso de soluções-teste diferentes na montagem de seus testes e também no cálculo da CE50, que foi estimada sem correção de Abbott. Entretanto, uma maior investigação deve ser realizada na tentativa de se compreender melhor essas diferenças.

Já em relação ao DSS, as populações de Ubatuba e Santos apresentaram sensibilidade semelhante, enquanto que a de São Sebastião foi levemente menos sensível, embora esta diferença seja muito pequena e não significativa. Para as três populações, os valores de CE50 obtidos estiveram dentro da faixa aceitável estimada para a espécie, que vai de 0,71 a 4,35 mg/l e com CE50 média de 2,53 mg/l de DSS, segundo dados não publicados produzidos pelo laboratório de ecotoxicologia do IOUSP [9].

Uma vez que as populações parecem ter sensibilidade semelhante às substâncias de referência, se supõe que estas também devam apresentar sensibilidade semelhante a outras substâncias.

Os resultados sugerem também que o resultado obtido para uma destas populações pode ser extrapolado para as demais. Isto significa que dados ecotoxicológicos produzidos com estas três populações de ouriço do mar são comparáveis sem necessidade de nenhum ajuste ou correção.

Além disso, o fato destas populações serem provenientes de locais distintos quanto à potencialidade de contaminação em função das atividades antropogênicas realizadas nas proximidades dos pontos de coleta parece não influenciar na sensibilidade dos estágios larvais testados. Esse dado é interessante principalmente para a população da Ilha das Palmas, que está localizada próxima à desembocadura do estuário de Santos, onde níveis razoáveis de contaminação foram obtidos em estudos recentes do órgão ambiental estadual [10].

A análise preliminar dos resultados, ainda que com certa cautela devido ao pequeno volume de dados, sugere que os procedimentos experimentais utilizados nos laboratórios do IOUSP e da Unisantia parecem gerar dados comparáveis, com boa concordância na identificação de doses tóxicas e/ou não tóxicas.

REFERÊNCIAS

- [1] R. R. Mastrotti. *Toxicidade e biodegradabilidade de tensoativos aniônicos em água do mar*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. São Paulo. 1997. 112p.
- [2] CETESB. *Água do mar – Teste de toxicidade crônica de curta duração com Lytechinus variegatus, Lamarck, 1816. (Echinodermata: Echinoidea)*. Norma técnica L5.250. São Paulo, CETESB. 1992. 20p.

- [3] *Environment Canada. Biological method test: Fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars)*. Report EPS 1/RM/27. Canada. 1992. 97p.
- [4] M. A. Hamilton; R. C. Russo & R. V. Thurston. Trimmed Spearman Karber method for estimate median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Technol.*, n. 11, vol. 7, pp.714-719. 1977. Correction: n. 12, vol. 4, p.417. 1978.
- [5] M. G. Nipper, C. Badaró-Pedroso, V. F. José. & V. A. Prósperi. "Marine bioassays and their application in coastal management and biological monitoring", in *II Simpósio da Costa Sul e Sudeste Brasileira – Estrutura, Função e Manejo*. Vol. 1. Águas de Lindóia. São Paulo, ACIESP. 1990, pp. 160-170.
- [6] A. J. Zamboni. *Caracterização ecotoxicológica do Estuário da Lagoa dos Patos no entorno de Rio Grande, RS: fundamentos e técnicas*. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos. 2000. 193p.
- [7] Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília. Curva padrão de sensibilidade de *L. variegatus* ao sulfato de zinco – Controle interno. Dados não publicados.
- [8] V. A. Prósperi. *Aplicação de testes de toxicidade com organismos marinhos para a análise de efluentes industriais lançados em águas estuarinas*. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia da São Carlos. São Carlos. 1993. 120p.
- [9] Laboratório de Ecotoxicologia Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. Curva padrão de sensibilidade de *L. variegatus* ao DSS – Controle interno. Dados não publicados.
- [10] CETESB. *Sistema Estuarino de Santos e São Vicente*. Relatório Técnico CETESB. São Paulo, SP. 2001 178p