Atividade de campo: coleta de ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*) e ensaios ecotoxicológicos

João Paulo Novaes Lessa de Barros[1], Flávia Rigos Salgueiro[1],
Nathalia Garcia Aranha Cid[1], Renato Sakai Cid[1]

[1] Universidade Santa Cecília (Unisanta), Santos-SP, Brasil

Resumo

Nos últimos anos a contaminação ambiental marinha por plásticos, mercúrio, fármacos e outras substâncias vem aumentando gradativamente, o que pode induzir efeitos biológicos aos ecossistemas aquáticos. Estes compostos no meio ambiente podem interferir na fisiologia, metabolismo e comportamento de espécies. Através de ensaios ecotoxicológicos com ouriços-do-mar (*echinometra lucunter*) podemos estudar se concentrações de determinadas substâncias, naquele local, interfere na reprodução de ouriços, podendo oferecer subsídios para possíveis recuperações. O objetivo deste trabalho é ensinar como é realizada a coleta destes organismos e elencar a importância dos ensaios. A coleta dos organismos foi realizada na Ilha das Palmas, Santos/SP e o ensaio ecotoxicológico no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Ouriço-do-mar. Contaminação ambiental

Abstract

In recent years marine environmental contamination by plastics, mercury, pharmaceuticals and other substances has gradually increased, which may induce biological effects on aquatic ecosystems. These compounds in the environment may interfere with the physiology, metabolism and behavior of species. Through ecotoxicological tests with sea urchins (*echinometra lucunter*) we can study if concentrations of certain substances, in that place, interfere in the reproduction of hedgehogs, being able to offer subsidies for possible recoveries. The objective of this work is to teach how the collection of these organisms is carried out and to indicate the importance of the tests. The organisms were collected on the Island of Palmas, Santos / SP and the ecotoxicological laboratory Laboratory of Ecotoxicology of the Santa Cecília University.

Keywords: Ecotoxicology. Sea urchin. Environmental contamination

Introdução

Nas últimas duas décadas, a contaminação ambiental por fármacos tem despertado o interesse de cientistas ambientais, por causa do potencial destas substâncias de induzir efeitos biológicos adversos, especialmente aos ecossistemas aquáticos, sendo classificados como poluentes emergentes ambientais (FENT et al., 2006)

Os ecossistemas estão recebendo uma grande carga de substâncias químicas, orgânicas e inorgânicas, de forma intencional ou acidental, em decorrência do lançamento de efluentes industriais ou domésticos e também vindos dos rios e estuários (Moraes, 2001).

O despejo de efluentes tanto industriais quanto domésticos sem o devido tratamento tende a ser uma das principais fontes de poluição do ambiente marinho (ABESSA et al.,2005). Os principais problemas que afetam a qualidade da água são os esgotos domésticos tratados de forma inadequada, assim como os controles inadequados de efluentes industriais, a perda e a destruição das bacias de captação, a localização errônea de unidades industriais e as práticas agrícolas deficientes (MORAES & JORDÃO., 2002)

Na cidade de Santos/SP e São Vicente/SP o lançamento de resíduos domésticos ocorre através do emissário submarino de Santos por meio de uma tubulação a aproximadamente 4 Km da costa. Já os resíduos industriais são oriundos do Polo Industrial de Cubatão, e chegam à costa pelo estuário do Canal do Porto de Santos, onde encontra-se o maior complexo portuário da América Latina. Assim muitos dos seus corpos d'água e praias estão contaminados por várias substâncias, acarretando diversos problemas ambientais (Ambrozevicius, 2010).

Ecotoxicologia é um termo atualmente muito em voga, devido a necessidade de se conhecer os efeitos que produtos químicos lançados no meio ambiente podem ter sobre indivíduos, sobre populações e comunidades de organismos, além de se conhecer como o homem pode ser afetado. Nos últimos anos, uma imensa gama de substâncias químicas foi produzida de forma intencional ou como subproduto de atividades produtivas. Algumas dessas substâncias são essencialmente artificiais, outras, apesar de terem ocorrência natural, tiveram sua concentração aumentada no meio ambiente.

Os ensaios ecotoxicológicos permitem identificar concentrações ambientais que podem promover alterações na biota marinha, além de identificar problemas de lançamento de esgoto e de substâncias tóxicas, tornar viáveis ações para solucionar ou diminuir os impactos gerados por essas substâncias e monitorar os ecossistemas (Zagatto, 2006). No caso de ensaios de toxicidade para o ambiente marinho se utiliza organismos do meio em condições laboratoriais ou de campo, possibilitando estabelecer limites aceitáveis das substâncias encontrados no ambiente e avaliar os impactos causados nos organismos marinhos (Bertoletti, 1990).

O objetivo deste trabalho é permitir aos alunos vivenciar a coleta de organismos, os princípios, aplicações e objetivos dos ensaios ecotoxicológicos, através de uma simulação de diferentes possíveis concentrações ambientais de um fármaco.

Objetivos

Determinar a concentração de efeito do princípio ativo Dipirona na reprodução de ouriços-do-mar (*Echinometra Lucunter*).

Materiais e métodos

Uma introdução ao tema foi realizada em sala de aula, um dia antes de ir ao campo para realização da coleta. Nesta aula, deve ser ensinada aos alunos uma introdução sobre a poluição dos mares, procedimentos para coleta e segurança, horários e ponto de encontro, método de transporte do organismo e procedimentos a serem realizados no laboratório para elaboração dos ensaios ecotoxicológicos.

No laboratório, cada aluno deverá ter uma ficha, para que seja preenchida com os dados obtidos. A saída de campo será realizada na Ilha das Palmas, localizada em Santos/SP. Os ouriços deverão ser coletados e acondicionados em uma caixa térmica com um pouco de água, e imediatamente transportados para a Universidade Santa

Cecília, onde ficarão acondicionados em um tanque específico para ouriços, com controle de temperatura, umidade, salinidade e ph da água.

No dia após a coleta, os alunos irão para o laboratório de ecotoxicologia para a realização do ensaio, que consiste na exposição dos embriões de ouriços do mar a amostras em diferentes concentrações. Para esta aula, diluiremos um fármaco (Novalgina) em concentrações de 100 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L e 12,5 mg/L. Os ouriços serão estimulados com uma injeção de KCl 0,5 M para liberação dos gametas. Os gametas serão mantidos em recipientes separados, com os óvulos em um béquer de 400 mL e os espermatozoides em um béquer de 25 mL. Após a estimulação, os óvulos serão lavados e avolumados com água do mar reconstituída. Os espermatozoides serão diluídos em água do mar reconstituída e adicionados 1,2 mL dessa solução espermática a solução com os óvulos, e manter sobre agitação durante duas horas. Após esse procedimento, serão expostos 300 embriões por tubo de ensaio. Essa quantidade se dá por um cálculo feito com base no número de óvulos fecundados em 3 alíquotas de 10 mL. No período de espera dessas duas horas, os alunos farão a medição dos parâmetros físico-químicos iniciais, como pH, OD (oxigênio dissolvido) e salinidade, através dos equipamentos pHmetro, oxímetro e refratômetro, respectivamente. Após o período de espera, deve-se montar os tubos de ensaio onde serão colocados os embriões. Esses tubos irão conter 10 mL do fármaco Novalgina em cada concentração estudada (4 tubos para cada concentração), além dos quatro tubos controles (somente 10 mL de água reconstituída).

Nestes tubos, devem ser adicionados a quantidade de embriões calculada em cada tubo de ensaio, e esse sistema teste será alocado em uma câmara por 42 horas de exposição, em temperatura de 26 ± 2ºC. No dia e na hora do encerramento será colocado 0,5 mL de formol tamponado para fixação das larvas. A análise se dá pela

leitura de cada réplica em um microscópio com uma câmara de Sedgewick-Rafter, nela será preenchida com a amostra e contada as 100 primeiras larvas observadas, classificando como desenvolvidas ou não desenvolvidas.

Após a análise de todos os tubos, os dados serão analisados estatisticamente, através do teste estatístico ANOVA. A partir da análise estatística pode-se determinar em qual concentração ambiental do fármaco que não ocorre o desenvolvimento embriolarval, sendo considerada tóxica, além de determinar a Concentração de efeito observado (CEO) e a Concentração de Efeito Não Observado (CENO).

.

Resultados e Discussão

Através dessa aula de campo, espera-se que os alunos possam compreender como é realizado um ensaio ecotoxicológico, da coleta até a elaboração de um teste, além de poder verificar como a concentração ambiental de uma determinada substância pode afetar a biota marinha. Os dados obtidos, serão discutidos em sala de aula e podem ser comparados com estudos da CETESB e SABESP. Na última década, agências regulatórias têm publicado diretrizes detalhadas acerca da avaliação dos possíveis efeitos adversos de fármacos no ambiente. A Comissão Européia publicou uma Diretriz (Diretriz 2001/83/EC, alterada pela Diretriz 2004/27/EC) especificando que as autorizações para a liberação de um medicamento para uso humano devem vir acompanhadas de uma avaliação de risco ambiental (EMEA, 2005). O U.S. Food and Drug Administration (FDA) publicou um guia de avaliação de medicamentos de uso humano e, de acordo com o documento, testes de avaliação ecotoxicológicas devem ser realizados para os medicamentos cujo princípio ativo que será introduzido no ambiente aquático em concentrações superiores a 1μg/L.

Os ensaios realizados, seguem as diretrizes internacionais, já que o tratamento é extremamente complexo, do ponto de vista físico e químico, e são fontes de grande diversidade de poluentes para o ambiente aquático, já que muitas drogas são excretadas de forma inalterada ou metabólitos através das fezes e urina.

Considerações finais

Este estudo capacitará estudantes para realizar ensaios ecotoxicológicos com ouriços-do-mar, além de determinar em qual concentração ambiental de determinada substância, teremos efeitos no desenvolvimento de ouriços, servindo como subsídios para novas pesquisas.

Referências bibliográficas

ABESSA, D. M. S.; CARR, R. S.; RACHID, B. R. F.; SOUZA, E.C. P. M.; HORTELANI, M. A.; SARKIS, J. A. **Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacente sediments**. Marine Pollution Bulletin.V. 50 pág.875–885, 2005.

AMBROZEVICIUS, Andrea Pimenta. Poluição aquática em Santos (SP): uma abordagem interdisciplinar. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS ABNT. NBR 15350, 2012.Ecotoxicologia aquática Toxicidade crônica de curta duração Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea), 21 pp.

BERTOLETTI, E. 1990. Toxicidade e Concentração de Agentes Tóxicos em Efluentes Industriais. Revista Ciência e Cultura. 43 (3/4) : 271-277. São Paulo.

FENT, K., WESTON, A.A., CAMINADA, D. **Ecotoxicology of human pharmaceuticals**. Aquat. Toxicol. 76: 122–159, 2006.

MORAES, R. et al. Efeitos de poluentes em organismos marinhos. Arte & Ciência, 2001.

MORAES, D. S. L. & JORDÃO, B. Q. **Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana**. Revista de Saúde Pública, v. 36 nº 3, p. 370-4, 2002.