Avaliação da toxicidade de benzo(a)pireno sobre o desenvolvimento embriolarval de ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*)

Tawany de Mello Souza[1,2], Paloma Kachel Gusso Choueri[1,2]

[1] Universidade Santa Cecília (UNISANTA), Santos-SP, Brasil.
[2]ALS Life Sciences Brasil Ltda, São Paulo-SP, Brasil.

E-mail: mello.tawany@gmail.com

Resumo: Os oceanos e suas regiões costeiras são uns dos ambientes mais importantes presentes no planeta Terra. Devido ao aumento da população e das atividades industriais, estes ecossistemas passaram a ser depósito de rejeitos que podem vir a ser prejudiciais à biota, como o benzo(a)pireno, um HPA persistente nos ambientes, que pode ser absorvido pelos organismos. É importante que a toxicidade deste composto seja estudada e evidenciada, a fim de diminuir a exposição dos oceanos e seus organismos a este contaminante. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade de BaP sobre o ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* e determinar a concentração que inibe 50% de seu desenvolvimento embriolarval. Os ouriços-do-mar se mostraram extremamente sensíveis ao BaP, sendo que as concentrações ambientalmente relevantes inibiram o seu desenvolvimento embriolarval, evidenciando que a presença deste poluente pode ocasionar efeitos à biota.

Palavras-chave: benzo(a)pireno; ouriço-do-mar; toxicidade; hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

Evaluation of benzo(a)pyrene toxicity on sea urchin (*Echinometra lucunter*) embryo development

Abstract: The oceans and their coastal regions are one of the most important environments on planet Earth. Due to the increase in population and industrial activities, these ecosystems have become repositories of waste that can be harmful to biota, such as benzo(a)pyrene, a persistent PAH in the environment, which can be absorbed by organisms. It is important that the toxicity of this compound be studied and highlighted in order to decrease the exposure of the oceans and their organisms to this contaminant. Thus, the objective of the present study was to evaluate the toxicity of BaP on the sea urchin *Echinometra lucunter* and to determine the concentration that inhibits 50% of its embryolarval development. Sea urchins were extremely sensitive to BaP, and environmentally relevant concentrations inhibited their embryolarval development, showing that the presence of this pollutant can cause effects to biota.

Keywords: benzo(a)pyrene; sea urchin; toxicity; polycyclic aromatic hydrocarbons.

Introdução

Os oceanos e suas regiões costeiras são uns dos ambientes mais importantes presentes no planeta Terra, sendo que ocupam 71% da superfície terrestre [1]. Essas áreas são de extrema importância para a vida marinha, pois são ambientes de reprodução, desenvolvimento e crescimento de diversas espécies, servindo de manutenção para a biodiversidade [2].

Devido ao grande aumento da população e das atividades industriais, os oceanos passaram a ser depósito de rejeitos líquidos e sólidos, direta e indiretamente, e, consequentemente, de uma gama de substâncias tóxicas que colocam em risco diversas espécies importantes para estes ecossistemas [3]. Entre os poluentes presentes nos oceanos, estão os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), um grupo de compostos persistentes, semi-voláteis e orgânicos, que podem ser extremamente tóxicos para os ecossistemas, uma vez que já se mostraram cancerígenos, teratogênicos e mutagênicos [4].

Dentre estes HPAs, está o benzo(a)pireno (BaP), um HPA de alto peso molecular de estrutura química com 5 anéis aromáticos [5], que se encontra na lista da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos de poluentes prioritários para determinação e monitoramento. O BaP é um contaminante persistente nos ambientes que pode ser absorvido por vias de exposição oral, inalatória e dérmica e, depois de absorvido, é distribuído no fígado, rim e bexiga dos organismos expostos [6,7]. Assim, é importante que a toxicidade deste composto seja estudada e evidenciada, a fim de diminuir a exposição dos oceanos e seus organismos a este contaminante. Segundo a Resolução CONAMA nº 357 [8], as concentrações máximas de BaP que podem estar presentes nos corpos d'água variam entre 0,018 e 0,700 µg/L.

Objetivo

Avaliar a toxicidade de BaP sobre o ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*, determinando a concentração que inibe 50% de seu desenvolvimento embriolarval ($CE(I)_{50\text{-}36h}$).

Materiais e métodos

Os ensaios foram realizados no laboratório de ecotoxicologia da empresa ALS Life Science Brasil – Food & Agro, São Paulo – SP. Os exemplares de ouriço-do-mar foram coletados e levados para o laboratório no mesmo dia dos ensaios.

As soluções-estoque foram preparadas a partir da diluição de BaP em acetona, devido à sua baixa solubilidade em água. As concentrações nominais utilizadas nos ensaios foram: 0,3; 3,0; 30,0; 120,0; 210,0 e 300,0 µg/L. Um tratamento controle contendo acetona foi preparado em paralelo para avaliar a toxicidade do solvente aos organismos expostos, além do controle contendo apenas água do mar.

Os gametas foram obtidos a partir da injeção de 5 mL de KCL 0,5 M na região perioral de cada organismo (Figura 1). Os espermatozoides foram coletados diretamente dos gonóporos com ajuda de uma micropipeta e os óvulos foram obtidos das fêmeas apoiadas em

béqueres com a face aboral voltada para baixo. Posterior à obtenção dos gametas, estes foram misturados em um recipiente único para que ocorresse a fecundação. O volume calculado da solução de ovos foi adicionado às soluções-teste 2 horas após a fecundação. As réplicas foram mantidas em incubadora à temperatura de 24 a 28ºC e fotoperíodo de 12 a 16 horas de luminosidade.

Os ensaios foram encerrados após 36 horas, quando 80% dos organismos no controle atingiram o estágio de *pluteus* normais. No encerramento, foram adicionadas 2 gotas de solução de lugol em cada réplica para preservação das larvas. Posterior a isso, a análise do estágio de desenvolvimento larval e ocorrência de anomalias em cada réplica foi feita em microscópio óptico.

A significância das diferenças entre os tratamentos foi avaliada por meio da Análise Permutacional de Variância (PERMANOVA) univariada [9]. A $CE(I)_{50\text{-}36h}$ foi calculada através do *Trimmed Spearman-Karber Method* utilizando software *GraphPad Prism*.

Resultados

De acordo com o teste t de Student ($p<0.05$), não houve diferenças significativas entre o tratamento controle e controle acetona (Tabela 1). Portanto, a acetona não foi considerada tóxica para os organismos expostos.

O teste PERMANOVA indicou que todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, evidenciando que o desenvolvimento larval dos ouriços-do-mar foi afetado em todas as concentrações de BaP testadas. Os resultados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 - Desenvolvimento embriolarval anormal obtido nos tratamentos de BaP.

Concentração nominal (µg/L)	Desenvolvimento larval anormal (%)
Controle água	15,25
Controle acetona	18,25
BaP 1 (0,300)	22,00
BaP 2 (3,000)	29,25
BaP 3 (30,00)	37,50
BaP 4 (120,0)	61,50
BaP 5 (210,0)	98,00
BaP 6 (300,0)	100,00

Fonte: Elaborado pela autora.

O valor da concentração de BaP que inibiu 50% do desenvolvimento embriolarval dos ouriços em 36 horas de exposição ($CE(I)_{50\text{-}36h}$) foi de 130,0 µg/L, com intervalo de confiança entre 108,0 µg/L e 153,8 µg/L, representados na Figura 1.

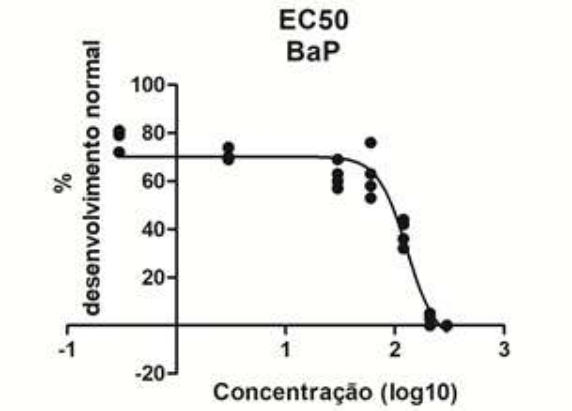

Figura 1. Representação gráfica do EC_{50} dos tratamentos de BaP.
Fonte: Elaborado pela autora.

Discussão

Os resultados obtidos neste estudo demostraram que os organismos expostos apresentaram grande sensibilidade ao BaP, uma vez que o desenvolvimento embriolarval dos ouriços-do-mar foi afetado já na primeira concentração testada (0,3 µg/L). As taxas de desenvolvimento das larvas *pluteus* diminuíram significativamente com o aumento da concentração de BaP, sendo que na maior concentração (300,0 µg/L) a inibição do desenvolvimento larval foi de 100%, demonstrando o potencial tóxico de BaP. Outros pesquisadores também evidenciaram a toxicidade de BaP em estudos realizados com outras espécies de organismos, e os valores de CE_{50} encontrados foram ainda mais baixos do que o valor apresentado no presente estudo [10, 11]. A concentração média de BaP que causou efeito no desenvolvimento larval a 50% dos embriões de *Echinometra lucunter* foi $CE_{50\text{-}36h}$ = 130,0 µg/L, porém as concentrações ambientalmente relevantes já induziram efeito sobre o desenvolvimento larval, evidenciando que a presença deste poluente pode ocasionar efeitos sobre a biota.

Conclusão

Os resultados apresentados mostraram que benzo(a)pireno foi capaz de induzir efeito tóxico sobre o desenvolvimento larval de ouriço-do-mar em todas as concentrações testadas, evidenciando sua toxicidade sobre os organismos. À medida que as concentrações aumentaram, o desenvolvimento das larvas *pluteus* foi reduzido. Assim, este estudo aponta para a necessidade de maior regulação para este composto, visto que concentrações

ambientalmente relevantes foram testadas e estas foram capazes de induzir efeitos tóxicos aos organismos.

Agradecimentos: Os autores agradecem à UNISANTA e ao laboratório de ecotoxicologia da empresa ALS Life Sciences Brasil pela estrutura fornecida para o desenvolvimento do presente trabalho.

Referências

1. Levinton, J. S. **Marine biology: function, biodiversity, ecology**. 2nd Ed. Oxford University Press, New York, p. 515, 2001.
2. Santos, T. C. A. dos. **Estudo sobre efeitos do naftaleno e benzo(a)pireno em *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae) utilizando biomarcadores citogenotóxicos, histopatológicos e bioquímicos**. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 2009.
3. Vieira, R. Y. **Avaliação regional da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na região costeira do sudeste do Brasil usando mexilhões (*Perna perna*, Linneaus 1758) como biomonitores**. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2012.
4. Alegbeleye, O. O.; Opeolu, B. O.; Jackson, V. A. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Critical Review of Environmental Occurrence and Bioremediation. **Journal of Environmental Management**, v. 60, n. 4, p. 758-783, 2017.
5. Baird, W. M.; Hooven, L. A.; Mahadevan, B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 45, p. 106-114, 2005.
6. Walle, T.; Walle, U. K.; Sedmera, D.; Klausner, M. Benzo(a)pyrene induces oral carcinogenesis and chemopreventation: studies in bioengineered human tissue. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, p. 346-350, 2006.
7. Verma, N.; Rettenmeier, A. W.; Schmitz- Spanke, S. Exposure of primary porcine urothelial cells to benzo(a)pyrene: in vitro uptake, intracellular concentration and biological response. Archives of Toxicology, v. 86, n. 12, p. 1861-1871, 2012.
8. CONAMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente**, nº 357, 15 de junho de 2005.
9. Anderson, J. M. Permutational Multivariate Analysis of variance (PERMANOVA). Wiley Statsref: Statistics Reference Online. **John Wiley & Sons**, Inc. 2017.
[10. Ikenaka, Y.; Sakamoto, M.; Nagata, T.; Takahashi, H.; Miyabara, Y.; Hanazato, T.; Chang, K.-H. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on an aquatic ecosystem: acute toxicity and community-level toxic impact tests of benzo[a]pyrene using lake zooplankton community. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 38, n. 1, p. 131-136, 2013.
11. Almeida, J. V. de. **Efeitos tóxicos de benzo(a)pireno sobre a macroalga vermelha *Gracilaria birdiae***. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.