



SETAC – Brazil

Viabilidade do Uso da Bolacha-do-mar *Mellita quinquiesperforata* como Organismo Teste

K. S. LAITANO,^{1*} C. GONÇALVES² & C. RESGALLA JR.^{2*}

¹ Labtox/ ENS/UFSC, Campus Trindade, Florianópolis, SC

² CTTMar/UNIVALI, C.P. 360, CEP 88302-202, Itajaí, SC

(Received January 11, 2007; Accepted April 14, 2008)

RESUMO

Este estudo teve por objetivo investigar a viabilidade do uso da bolacha-do-mar *Mellita quinquiesperforata* como organismo-teste em experimentos crônicos de curta duração. Para isto foi aplicado o protocolo da Norma Técnica da CETESB destinada ao ouriço regular *Lytechinus variegatus*, utilizando embriões e larvas expostos a quatro tóxicos de referência por um período de 24 horas. As substâncias utilizadas foram sulfato de zinco, dicromato de potássio, sulfato de cobre e dodecil sulfato de sódio (DSS). Essas substâncias são normalmente utilizadas para avaliar a sensibilidade relativa de organismos-teste marinhos, assim como para estimar a precisão e confiabilidade dos dados produzidos em laboratório. O protocolo proposto mostrou-se adequado para aplicação com o ouriço irregular *M. quinquiesperforata*, sendo necessárias algumas modificações quanto às exigências de validação em decorrência da baixa produção de óvulos, baixa taxa de fecundação e maior percentual de efeito observado nos frascos-controle. A $CE_{50};24h$ média para o metal zinco foi de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (CV de 44% para $n = 5$); para o metal cromo, de $1462 \mu\text{g L}^{-1}$ (CV de 25% para um n de 3); metal cobre, de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (CV de 35% para $n = 5$); e DSS de $2145 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 2$). *M. quinquiesperforata* apresenta sensibilidade similar às espécies protocoladas pela NBR/ABNT, demonstrando potencial deste Echinodermata para utilização como organismo teste na indisponibilidade das espécies exigidas pelos órgãos ambientais.

Palavras-chave: *Mellita quinquiesperforata*, bolacha-do-mar, teste de toxicidade, zinco, DSS, cromo, cobre.

ABSTRACT

Viability of the use of the sand dollar *Mellita quinquiesperforata* as a test organism

The aim of this study was to investigate the viability of the use of sand dollar *Mellita quinquiesperforata* as a test organism in chronic experiments over short durations. For this, the protocol of the CETESB Technical Standard was used, which was designed for the regular sea urchin *Lytechinus variegatus*, using embryos and larvae exposed to four reference toxins, for a 24-hour period. The substances used in the toxicity tests were zinc sulfate, potassium dichromate, copper sulfate and sodium dodecyl sulfate (SDS). These substances are normally used to evaluate the relative sensitivity of marine test organisms, and to estimate the precision and reliability of the data produced in the laboratory. The proposed protocol proved to be adequate for its use with the irregular sea urchin *M. quinquiesperforata*, some modifications being necessary in terms of the validation requirements, due to the low egg production, low fecundation rate, and higher percentage of effect observed in the control flasks. The $EC_{50};24h$ average for zinc was $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (VC of 44% for $n = 5$), for chrome it was $1462 \mu\text{g L}^{-1}$ (VC of 25% for an n of 3), for copper it was $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (VC of 35% for $n = 5$) and for SSD it was $2145 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 2$). *M. quinquiesperforata* presents a sensitivity similar to species registered by the NBR/ABNT, demonstrating the potential of this Echinodermata for use as a test organism, in cases where it is impossible to use species required by the environmental agencies.

Key word: *Mellita quinquiesperforata*, sand dollar, toxicity test, zinc, SDS, chromium, copper.

*Corresponding author: Kalinka dos Santos Laitano, e-mail: ka_laitano@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

O ouriço irregular *Mellita quinquesperforata* (Leske, 1778) apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o delta do Mississippi até a Região Sul do Brasil (Borzzone, 1993). É uma espécie de grande importância e abundância dentro da comunidade bêntica nas praias arenosas da América do Sul (Borzzone *et al.*, 1998). Seu habitat é a zona intermareal com domínio de adultos logo após a faixa de arrebentação, principalmente em praias com granulometria fina a muito fina. Estudos realizados em praias do sul do Brasil demonstraram que a espécie possui ciclo reprodutivo anual, com períodos de desova no final do inverno (agosto/setembro) ou no final do verão (fevereiro/março), dependendo do tipo de praia (Tavares & Borzzone, 1998). Esses autores também destacam que *M. quinquesperforata* apresenta altas taxas de mortalidade com uma expectativa de vida média de 1 ano (Borzzone, 1993), em que organismos de 50 mm de comprimento teriam idade aproximada de 1 ano para as praias do Paraná e 2 anos para o Rio Grande do Sul (Borzzone, 1993; Tavares & Borzzone, 1998).

A utilização de *M. quinquesperforata* em testes de toxicidade como ferramenta para avaliação de risco e de impacto foi inicialmente proposta pela CETESB (1990), mas não apresentou resultados conclusivos sobre a sua viabilidade. Entretanto, em decorrência da grande extensão da costa brasileira e, conseqüentemente, da variação granulométrica de seu sedimento, a ocorrência de *Lytechinus variegatus*, espécie protocolada pela CETESB (1992), limita a utilização de testes de toxicidade com Echinodermata a poucos Estados brasileiros.

Segundo o protocolo da USEPA (2002) para testes de toxicidade com organismos marinhos, o uso de espécies nativas que não as citadas no protocolo podem ser estimuladas desde que a sua sensibilidade seja comprovada mediante os resultados obtidos em testes com substâncias de referência.

Os testes com substâncias ou tóxicos de referência são geralmente utilizados para avaliar a sensibilidade relativa de uma população de organismos que será utilizada em testes de toxicidade, permitindo que haja um controle de qualidade sobre a metodologia e também que se estimem a precisão e a confiabilidade dos dados produzidos em laboratório. Nesse tipo de teste, os organismos são expostos a diversas concentrações de uma substância-padrão, sendo que a sensibilidade da população é avaliada através da comparação com dados preexistentes, disponíveis na bibliografia (Environment Canada, 1992; Resgalla Jr. & Laitano, 2002).

O objetivo deste trabalho foi investigar a viabilidade do uso da bolacha-do-mar *Mellita quinquesperforata* como organismo-teste, verificando a sua sensibilidade e reprodutividade diante de diferentes substâncias de referência em uma adaptação do protocolo destinado para o ouriço regular *Lytechinus variegatus*. Este estudo pretende fornecer subsídios a diferentes laboratórios cuja localização geográfica impede a realização de testes com Echinodermatas protocolados no Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização dos testes de toxicidade de desenvolvimento embrio-larval crônico de curta duração de *Mellita quinquesperforata* foi adaptado o procedimento apresentado pela Norma Técnica da CETESB de 1992 destinada a testes com *Lytechinus variegatus*. O método consistiu na obtenção de gametas, fertilização artificial e determinação do número de embriões normais e afetados após um período de exposição de 24 horas.

Para cada bateria de testes foram coletados, no ambiente praias, pelo menos 30 exemplares de adultos da *M. quinquesperforata*, com diâmetro maior superior a 40 mm e 5 mm de altura, para obtenção de um bom volume de óvulos e esperma.

Para a indução da liberação dos gametas foi injetado na região da boca dos organismos 0,5 mL de cloreto de potássio (KCl) a 1 M. Os óvulos, identificados como grânulos violeta-amarelado, foram coletados em vidro-relógio contendo água do mar filtrada. Amostras de óvulos foram então observadas em microscópio para verificar o estágio de maturação e a presença de possíveis anomalias. O líquido espermático, identificado como uma substância branca de consistência leitosa, foi coletado com pipeta de Pasteur. Tanto os óvulos como o esperma, de diferentes indivíduos, foram concentrados em béqueres de 50 mL, sendo os óvulos acondicionados em água do mar filtrada e o esperma concentrado sem diluição sobre o gelo antes do preparo da solução espermática. A solução espermática foi preparada antes da fecundação, que constou na diluição de aproximadamente 200 µL do líquido espermático em 10 mL de água do mar filtrada. Cabe ressaltar que a água do mar utilizada como água de diluição foi coletada no mesmo ambiente onde os adultos de *M. quinquesperforata* foram coletados. Desta forma, as condições de realização dos testes tornam-se mais próximas à realidade do ambiente natural, pois os organismos já se encontram adaptados às condições físicas e químicas da água.

Para a fecundação foi adicionado de 1 a 2 mL de solução espermática em um béquer de 250 mL contendo uma solução de 100 mL de óvulos e aguardaram-se 10 minutos com agitação constante para a fecundação. Após esse tempo foram observados e quantificados os óvulos fecundados (formação da membrana de fecundação) em amostra diluída em câmara de Sedwick-Rafter. A fecundação mínima determinada para o uso em testes de toxicidade foi de 70%.

Os testes crônicos de curta duração foram executados em seis concentrações da substância, mais o controle em quatro réplicas, em um volume de solução-teste de 10 mL. Todos os experimentos foram realizados a $29\% \pm 2\%$, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas escuro e 12 horas de luz durante 24 horas, com observação do efeito do agente químico sobre o desenvolvimento embrionário da espécie. Para a validação do teste foram observados os seguintes requisitos: controles com no mínimo 70% de organismos bem formados, variação máxima de 20% da salinidade e pH inicial e final entre 7,5 e 8,5.

Após o encerramento do teste com adição de 1 mL de formalina a 4% observou-se o estágio de desenvolvimento em câmara de Sedgwick-Rafter, registrando o estágio de desenvolvimento e/ou a ocorrência de possíveis anomalias de todos os organismos incubados nos frascos-teste.

Para os testes de toxicidade foram utilizados três tipos de substâncias de referência: dodecil sulfato de sódio (DSS), dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) e sulfato de zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) da marca Merck® P.A.

Depois de determinada a porcentagem de efeito foi calculada a CE50 através do método de Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977), utilizando o programa Toxstat 3.4. Uma análise de refração foi realizada para avaliar o número mínimo de organismos a serem quantificados no final do teste. E, finalmente, os resultados obtidos foram comparados com os dados disponíveis para outras espécies de Echinodermatas protocoladas e não protocoladas.

Foram ainda realizados testes de sobrevivência de embriões e larvas da bolacha-do-mar mantidas por 24 horas em sete diferentes salinidades (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35) e em quatro réplicas para avaliar sua tolerância e futuras aplicações dos testes de toxicidade com a espécie.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Variações entre os protocolos de teste com Lytechinus variegatus e Mellita quinquesperforata

A aplicação do protocolo de testes embrio-larval do ouriço regular *Lytechinus variegatus* para a bolacha-do-mar *M. quinquesperforata* serviu como ponto de partida para a busca de condições de teste mais adequadas para a espécie em questão. De forma geral, protocolos de ensaios ecotoxicológicos são aplicados em diferentes espécies pertencentes à mesma categoria taxonômica, como acontece para bivalvos (His *et al.*, 1999) e Echinodermatas (Clesceri *et al.*, 1998).

Entretanto, algumas diferenças são observadas entre os procedimentos de *M. quinquesperforata* e *L. variegatus*, que podem ser atribuídas a diferenças biológicas intrínsecas de cada espécie.

Para *M. quinquesperforata* há a necessidade de coleta e de uso de um maior número de adultos para a realização dos testes, pois a espécie apresenta óvulos de maior tamanho e em menor número que o ouriço *L. variegatus*. Associado a isto, os percentuais de óvulos não fecundados e de efeito (atraso no desenvolvimento das larvas) nos frascos-controle ao final do experimento são freqüentemente superiores a 20% e inferiores a 30%. Esses percentuais são superiores aos observados para *L. variegatus* mas similares aos do ouriço *Arbacia lixula* (dados não publicados CTTMar/UNIVALI).

Apesar dessas limitações, observou-se que o número mínimo de larvas a serem quantificadas e analisadas após a fixação dos frascos-teste seria de 50 larvas (Figura 1). Esse número foi determinado a partir da estabilização da média e

com baixo desvio-padrão mediante a aplicação de uma análise de refração. Este número é a metade exigida para os testes com *L. variegatus*, amenizando os problemas de limitação de óvulos produzidos, percentual de fecundação e de efeito nos frascos-controle.

As condições gerais para o desenvolvimento do teste de toxicidade utilizando *M. quinquesperforata* estão sumarizadas na Tabela 1 em comparação com o protocolo de *L. variegatus*. Informações sobre a tolerância e a sensibilidade da bolacha-do-mar em relação à salinidade e temperatura de execução dos experimentos ainda necessitam ser avaliadas. Entretanto, embriões e larvas de *M. quinquesperforata* apresentam desenvolvimento normal, ou seja, percentuais de efeito inferior a 30% em salinidades acima de 25 (28,7% a 25; 27% a 30 e 27,6% a 35), e 100% de efeito nas salinidades entre 5 e 20.

Sensibilidade de Mellita quinquesperforata diante de outras espécies de Echinodermatas

Os valores médios de CE_{50} obtidos nos experimentos com substâncias de referência são apresentados na Tabela 2. Observou-se que os coeficientes de variação (CV) resultantes foram altos (> 30 %) e provavelmente refletem as características da espécie e das condições experimentais executadas neste trabalho.

A partir de estimativas dos valores médios de CE_{50} em base da massa atômica dos metais presentes nos sais utilizados nos experimentos, foi possível comparar a sensibilidade de *M. quinquesperforata* com as demais espécies de Echinodermatas normalmente utilizadas no Brasil (Tabela 3). A bolacha-do-mar apresenta sensibilidade similar às outras espécies, em particular com *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter*, espécies protocoladas pela ABNT (NBR, 2006). De fato, todas as espécies apresentadas na Tabela 3 apresentam pouca variação de sensibilidade, confirmando o que já vem sendo ressaltado por His *et al.* (1999), em um estudo de bivalvos, de que a sensibilidade de grupos de espécies de mesma categoria taxonômica apresenta o mesmo potencial de uso em testes de toxicidade. Esta conclusão permitiria o uso de diferentes espécies de Echinodermatas na ausência das espécies protocoladas pelas agências de normatização.

CONCLUSÕES

Este trabalho apresenta a viabilidade de execução de testes de toxicidade embrio-larval com a bolacha-do-mar *Mellita quinquesperforata*. Dos resultados obtidos são sugeridos que:

1. O protocolo dos testes de toxicidade para os ouriços regulares (por exemplo, *Lytechinus variegatus*) pode ser adaptado para o uso com a bolacha-do-mar.
2. Alguns problemas de uso da espécie em testes de toxicidade foram verificados, como: limitação de

- produção de óvulos e esperma, alto percentual de efeito no controle e alta variabilidade nos resultados.
- 3. A quantificação do número de larvas no fim do experimento pode ser a metade recomendada pela norma da ABNT, a NBR-15350.
- 4. É necessário melhor investigação sobre as condições dos experimentos, incluindo análises físicas e químicas, tentativas de aumento na taxa de fecundação e redução nos percentuais de efeito observados no controle.

- 5. Outros estudos deverão ser realizados a fim de reduzir as variabilidades observadas, bem como melhorar as condições de desenvolvimento dos testes.
- 6. A sensibilidade de *M. quinquiesperforata* é comparável com a de outras espécies de ouriços regulares protocolados no Brasil.
- 7. *M. quinquiesperforata* tem grande potencial para ser utilizado como organismo-teste em testes de toxicidade, em que organismos já protocolados como *L variegatus* não estão disponíveis.

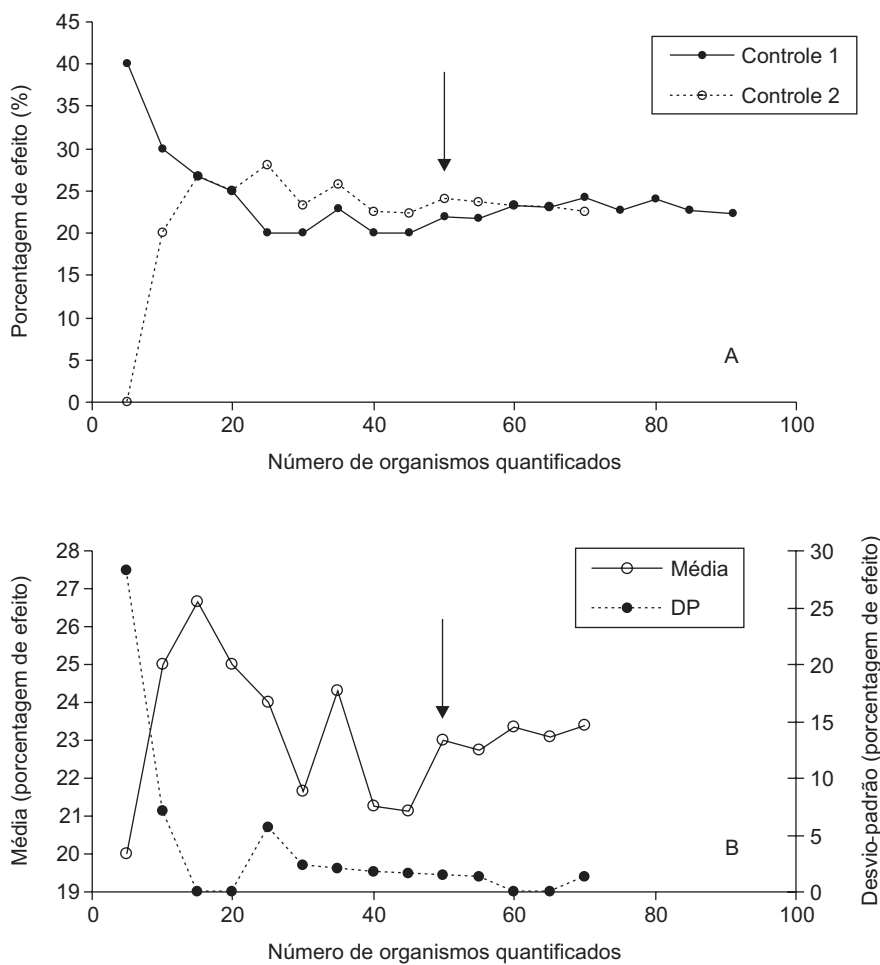


Figura 1 – Análise de refração para determinar o número mínimo de organismos a serem quantificados para os testes de toxicidade com *Mellita quinquiesperforata*. A – percentual de efeito em dois frascos controle em função do número de organismos quantificados; B – média e desvio-padrão dos percentuais de efeito entre dois frascos-controle em função do número de organismos quantificados. As flechas indicam o número de 50 larvas quantificadas.

Tabela 1 – Resumo das condições gerais para a realização do teste crônico embrio-larval de curta duração com *Mellita quinquesperforata* em comparação com *Lytechinus variegatus*, de acordo com os procedimentos estabelecidos na norma técnica da CETESB (1992).

Requisitos	Condições	
	<i>Mellita quinquesperforata</i>	<i>Lytechinus variegatus</i>
Tipo de ensaio	Estático	
Organismo-teste	Ovos de <i>M. quinquesperforata</i>	Ovos de <i>L. variegatus</i>
Água de diluição	Água natural marinha filtrada em filtro menor do que 1 µm	
Volume mínimo da solução-teste	10 mL	
Nº mínimo de réplicas por diluição	4	
Nº mínimo de organismos por réplica	10 ovos/mL	30 ovos/mL
Aeração	Não	
Alimentação	Não	
pH	7,5 a 8,5	7 a 9
Salinidade	29 ± 2	33 ± 3
Temperatura	25 ± 2°C	25 ± 2°C
Fotoperíodo	12 h luz e 12 h escuro	16 h luz e 8 h escuro
Duração do teste	24 h	
Fecundação mínima	70%	80%
Efeito observado	Retardamento ou anormalidade dos embriões e larvas	
Validade do teste	Mínimo 70% de larvas pluteus normais no controle	Mínimo 80% de larvas pluteus normais no controle

Tabela 2 – Número de experimentos (n), valores médios, mínimos e máximos de CE₅₀;24h e coeficiente de variação (CV) obtidos nos testes de sensibilidade de *Mellita quinquesperforata* sob efeito dos sais sulfato de zinco, dicromato de potássio, sulfato de cobre e o detergente DSS.

Substância	n	CE ₅₀ (mg L ⁻¹)			CV (%)
		Média	Mínimo	Máximo	
Sulfato de zinco	5	0,22	0,14	0,39	44
Dicromato de potássio	3	4,13	3,04	5,07	25
DSS	2	2,14	2,09	2,2	–
Sulfato de cobre	5	0,04	0,03	0,07	35

Tabela 3 – Comparação do valor de CE50;24h de *Mellita quinquesperforata* com diferentes espécies de Echinodermatas utilizadas em testes de toxicidade, para os metais zinco, cromo, cobre e detergente DSS.

Espécie	Substância	$\mu\text{g L}^{-1}$	Autor
<i>Lytechinus variegatus</i>		40,0	CETESB, 1991
<i>Arbacia lixula</i>	Zinco	40,0	Resgalla Jr. & Laitano (2002)
<i>Mellita quinquesperforata</i>		50,0	Este trabalho
<i>Lytechinus variegatus</i>		1410,0	Resgalla Jr. & Laitano (2002)
<i>Arbacia lixula</i>	Cromo	1470,0	Resgalla Jr. & Laitano (2002)
<i>Mellita quinquesperforata</i>		1462,0	Este trabalho
<i>Arbacia lixula</i>		1240,0	Resgalla Jr. & Laitano (2002)
<i>Lytechinus variegatus</i>	DSS	2370,0	Rumbold & Snedaker (1997)
<i>Echinometra lucunter</i>		3000,0	Araujo & Nascimento (1999)
<i>Mellita quinquesperforata</i>		2145,0	Este trabalho
<i>Arbacia lixula</i>		46,0	Resgalla Jr. & Laitano (2002)
<i>Echinometra lucunter</i>	Cobre	21,9	Rumbold & Snedaker (1997)
<i>Lytechinus variegatus</i>		33,8	Rumbold & Snedaker (1997)
<i>Mellita quinquesperforata</i>		10,0	Este trabalho

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, M. M. S. & NASCIMENTO, I. A., 1999, Testes ecotoxicológicos marinhos: análise de sensibilidade. *Ecotox. Envir. Rest.*, 2: 41-47.
- BORZONE, C. A., 1993, Spatial distribution and growth of *Mellita quinquesperforata* (Leske, 1778) on a sandy beach of southern Brazil. *Nerítica*, 7: 87-100.
- BORZONE, C. A., TAVARES, Y. A. G. & BARROS Jr., F. C. R., 1998, Beach morphodynamics and distribution of *Mellita quinquesperforata* (Leske, 1778) on sandy beaches of southern Brazil. In: Mooi & Telford (eds.), *Echinoderms: San Francisco*. Balkema, Rotterdam, pp. 581-586.
- CETESB, 1990, *Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos marinhos*. Relatório, 83.05.00. 38p.
- CETESB, 1991, *Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos – Testes com organismos marinhos*. Relatório, volume 3, 58.02.00, 26p.
- CETESB, 1992, *Água do mar – Teste de toxicidade crônica de curta duração com Lytechinus variegatus, Lamark, 1816 (Echinodermata: Echinoidea)*. Norma Técnica L5.250, 20p.
- CLESCERI, L. S., GREENBERG, A. E. & EATON, A. D., 1998, *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20. Edition, Washington, D.C., American Public Health Association.
- ENVIRONMENT CANADA, 1992, *Biological test method: Acute test for sediment toxicity using marine or estuarine amphipods*. Report EPS1/RM/26.
- HAMILTON, M. A. A., RUSSO, R. C. & THURSTON, R. V., 1977, Trimmed Sperm-karber method for estimating median lethal concentrations on toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, 11: 714-719.
- HIS, E., BEIRAS, R. & SEAMAN, M. N. L., 1999, The assessment of marine pollution – bioassays with bivalve embryos and larvae. *Adv. Mar. Biol.*, 37: 1-178.
- NBR, 2006, *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)*. NBR-15350, 17p.
- RESGALLA Jr., C. & LAITANO, K. S., 2002, Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Notas Téc. Facimar*, 6: 153-163.
- RUMBOLD, D. G. & SNEDAKER, S. C., 1997, Evaluation of bioassays to monitor surface microlayer toxicity in tropical marine waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 32: 135-140.
- TAVARES, Y. A. G. & BORZONE, C. A., 1998, General features of population dynamics of the sand dollar *Mellita quinquesperforata* (Leske, 1778) in southern Brazilian sandy beaches. In: Mooi & Telford (eds.), *Echinoderms: San Francisco*. Balkema, Rotterdam, pp. 837-842.
- USEPA, 2002, *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms*. 3. Edition, Washington, EPA-821-R-02-014.