



**CENTRO UNIVERSITÁRIO MONTE SERRAT**

**CAIO CESAR RIBEIRO**

**AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE  
AGUDA E CRÔNICA DO LIGHT-STICK,  
SINALIZADOR UTILIZADO EM PESCA DE ESPINHEL,  
ATRAVÉS DE ENSAIOS COM DIFERENTES  
ORGANISMOS MARINHOS.**

**Santos  
2010**

**CAIO CESAR RIBEIRO**

**AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE  
AGUDA E CRÔNICA DO LIGHT-STICK,  
SINALIZADOR UTILIZADO EM PESCA DE ESPINHEL,  
ATRAVÉS DE ENSAIOS COM DIFERENTES  
ORGANISMOS MARINHOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro Universitário Monte Serrat como exigência parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Oceanografia.

**Orientador:** Prof. Ms. Alessandro Augusto Rogick Athiê

**Co-orientador:** Prof. Ms. Maria Fernanda Palanch-Hans

**Santos  
2010**

R484a Cesar-Ribeiro, Caio.  
Avaliação e Identificação da toxicidade aguda e crônica do Light-stick, sinalizador utilizado em pesca de espinhel, através de ensaios com diferentes organismos marinhos.– Santos/ São Paulo. Caio Cesar Ribeiro - 2010  
59 f.: Il preto e branco: 30 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro Universitário Monte Serrat, 2010.  
Curso: Oceanografia  
Orientador: Prof. Ms. Alessandro Augusto Rogick Athiê;  
Prof. Ms. Maria Fernanda Palanch-Hans

1. Light-stick. 2.Ecotoxicologia. I. Palanch-Hans, Maria Fernanda. II. Athiê, Alessandro Augusto Rogick.. III Avaliação e Identificação da toxicidade aguda e crônica do Light-stick, sinalizador utilizado em pesca de espinhel, através de ensaios com diferentes organismos marinhos.

**CAIO CESAR RIBEIRO**

**AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE  
AGUDA E CRÔNICA DO LIGHT-STICK, ATRAVÉS DE  
ENSAIOS COM DIFERENTES ORGANISMOS  
MARINHOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro Universitário Monte Serrat como exigência parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Oceanografia.

**Orientador:** Prof. Ms. Alessandro Augusto Rogick Athiê

**Co-orientador:** Prof. Ms. Maria Fernanda Palanch-Hans

BANCA EXAMINADORA:

---

Nome do examinador:

Titulação:

Instituição:

---

Nome do examinador:

Titulação:

Instituição:

**Local:** Centro Universitário Monte Serrat – UNIMONTE

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família: minha mãe (Margareth) que é a pessoa que eu mais amo nesse mundo e com certeza a que torce mais por mim e se orgulha das minhas atitudes, e que é uma mãe maravilhosa, poderosa e absoluta, ao meu pai (Alcides) que sempre me apóia e que foi e é um exemplo pra mim, minhas irmãs (Adriana e Erica), vigi nem sei o que falar dessas figurinhas aí, como eu as amo, elas são muito importantes pra mim e sou o que sou hoje graças à amizade e conselhos dessas duas, minha sobrinha (Nicole) que eu amo de montão, meu cachorro (Bob, rsss), embora já tenha ido me aturou por um bom tempo, meus padrinhos (Dinha e Paulo) que eu preciso vê-los mais vezes, mas meus pais escolheram os melhores padrinhos pra mim, meus avós que embora não estejam mais conosco são muito importantes, uma vez que sem eles eu não estaria aqui hoje, meus parentes em geral (tios (as), primos (as) e etc.), minha namorada (Flávia) estrela-do-mar, aos amigos PROUNI (Vivi, Mari e Gui) *under ground* comigo dos momentos difíceis aos momentos difíceis (rsss), minhas companheiras de lab. e amigas maravilhosas Helena (Pescadooooores e Lavadeeeeiras), Tábata (ex-pamonha), Dani (Magérrima) e Camila (saudades) que sempre me agüentaram no lab., quando estava estressado, e que adoro; meus professores e coordenadores da oceanografia (vide site da unimonte) que sempre me ensinaram a ser um oceanógrafo, principalmente Cintia Miyaji (obrigado pelos conselhos e amizade), Maria Fernanda (obrigado pela super-orientação, super-amizade, super-centro), David (obrigado por me desafiar), Gleyci (obrigado por me banhar de conhecimento), Mariângela (obrigado pelas broncas), Garreta (obrigado por me incentivar a plantar sementes), Carol (obrigado pelas ótimas aulas e risadas), Luvizón (obrigado por não me subestimar), Athiê (obrigado pelas conversas e caronas para sampa) , as minhas professoras da E.E. Lúcia Silva de Assumpção de Pirapozinho (Silene, Sandra, Márcia, Leila, Rosângela, etc.) e ao diretor (Dionísio) por terem me apoiado sempre e me ensinado tantas coisas mesmo com as dificuldades do ensino público, aos meus colegas de classe que me suportaram por todos estes anos, aos que saíram do curso por motivos diversos (Nath: que nasceu no dia do índio, Jaque: que eu dormia sempre na casa dela, André: Crinóide), aos meus colegas de trabalho e que na verdade são amigos (Raquel (saudades), Sr. Toninho (grande amigo e conselheiro), Solange (NÃO, tá sem jaleco!!!), Eduardo (Dú), Wanderlówski e Jú Solinho - Lab. UNIMONTE; Van (Cintura de Ovo- te adoro), Ricardo e Simone (quer um floral?) (H2O); Gimel (perdeu o balancinho), Cristal (rápido Ricardo), Luvas (Se cuida M..., Vanessão Di Paraná???), Fânile (Lívia), Vanessa, Luizão (do tamanho da sua cara), Dani (obrigado pelo apoio), Mari (obrigado por acreditar em mim), Carlos (obrigado por não me mandar muito pro bota-fora), Cris (é ISO aí), Raquel (Di boa caaara!) e Camila (Temps)– CPEA. E dedico também aos meus amigos de República “Masmorra” que foi ótimo morar com vocês (Baurog, Seu Bosta, Xicó e Tadinho). Não posso deixar de falar dos anjos da guarda que me apoiaram na minha estadia na Baixada (Ana Luiza – maravilhosa, Dr. Helena; Dona Marilu e Laila – amigas eternas). Agora chega de dedicar se não vou ter ninguém para agradecer.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ser tão maravilhoso comigo e com minha família, tendo nos dado tantas oportunidades para que nós nos desenvolvêssemos pessoal e profissionalmente, por isso agradeço pela saúde, sorte e dons que o Senhor nos deu, que são essenciais para o nosso crescimento gradativo.

Agradeço a Lula por criar o PROUNI que patrocinou meus estudos.

Agradeço a Cíntia Badaró-Pedroso e ao Instituto de Pesca de São Paulo por me aceitar como estagiário “relâmpago” no meu primeiro estágio, onde comecei a trabalhar com Ecotoxicologia, e conseqüentemente agradeço aos estagiários Girresse e Gleyck que me auxiliaram quando era extremamente inexperiente.

Agradeço a UNIMONTE e seu corpo Docente maravilhoso que me ensinaram a amar OCEANOGRAFIA.

Agradeço a Professora Maria Fernanda Palanch-Hans, por ter me aceitado no estágio no laboratório de Ecotoxicologia da UNIMONTE, e ter me ensinado tudo o que estava ao seu alcance, conseqüentemente agradeço aos estagiários que também faziam parte da equipe e que compartilharam dos problemas e vitórias conquistadas no lab.

Agradeço a Cintia Miyaji por ter me apoiado nas idéias e na escrita deste projeto e por sempre acreditar em mim e me aconselhar com suas sábias palavras; agradeço a Caru e Tubarão por terem selecionado o meu projeto para ser executado na Bahia; agradeço a galera da caminhada por ter me ajudado no projeto, em especial agradeço por ter conhecido uma pessoa tão maravilhosa como minha amiga Helena, que foi uma companhia maravilhosa, onde marcamos um laço de amizade eterno, agradeço a Global Garbage por me incentivar e apoiar no projeto e em especial ao visionário Fabiano Prado Barreto, aos “Capitães de Areia” e a população das vilas litorâneas que nos receberam de braços abertos.

Agradeço ao Laboratório de Oceanografia Química e Ecotoxicologia (LOQUE – eu que dei esse nome) da UNIMONTE, por ser um espaço tão acolhedor (rsss) para que eu desenvolvesse os meus ensaios e me descobrisse como cientista, agradeço a Raquel que sempre me ajudou e é uma amiga muito especial, e a todos os que fizeram seus TCC e Monografia de Pós no lab. e ajudaram a construir este sonho (Daí (Aiii Dai) , Van (Cheia de Marra), Helena (Caiu formol no meu olho), Josemberg (Doutor), Daiana et al. (DBO e DQO), Michele, et. al. (Biólogas loucas), Tábata (Surfactante), Dani M. (Power Ponte), Dani B. (A Tampa do dessecador ta quebrada de novo), Luiz (210 amostras – LOUCO).

Agradeço ao professor Denis Abessa da UNESP e ao aluno de Doutorado Lucas que me ensinaram e tiraram algumas dúvidas sobre Ecotox.

Agradeço a H2O por ter me apoiado em muitos testes e por ter sempre acreditado em mim e no meu trabalho.

Agradeço a CPEA pela oportunidade de trabalhar em uma empresa tão séria e qualificada, onde eu aprendi muito e pude utilizar muito dos meus conhecimentos adquiridos na minha graduação. E aos amigos que fiz e jamais esquecerei.

À todos meus amigos e parentes que contribuíram de alguma forma para o término do trabalho.

## EPÍGRAFE

“O mestre da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo o que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Mas ele sabe que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente.”

## RESUMO

Neste trabalho, a toxicidade aguda e crônica de uma mistura dos produtos químicos presentes no light-stick e água foram testados. O light-stick é usado em atividades de pesca para a captura do espadarte. Os tubos foram recolhidos nas praias da Costa dos Coqueiros - BA, Brasil, no período de 14 a 31 de julho de 2007. O método utilizado foi o teste de toxicidade aguda com *Artemia sp.*, teste de toxicidade aguda com *Lytechinus variegatus* e o teste de toxicidade crônica de curta-duração onde embriões de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* e *Lytechinus variegatus* foram expostos a uma solução de sobrenadante formado a partir de uma mistura de água do mar e o light-stick de coloração laranja. O valor da CL50- 24h e 48h para *Artemia sp.* foram de 0,28% e 0,14%, respectivamente, a CE50 ~ 40 minutos para *L. variegatus* foi 0,014%, a CE50 - 36 h para *E. lucunter* foi 0,062% e a CE50 - 24h para *L. variegatus* foi 0,028% , ou seja, a mistura química presente no light-stick é potencialmente tóxica. Com a TIE (Toxicity Identification Evaluation) foi possível a identificação do peróxido de hidrogênio e dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's), como os responsáveis pela toxicidade. Então, como esses sinalizadores são comumente usados para a pesca, há perigo em potencial na sua eliminação no mar aberto.

**Palavras-chaves:** Light-stick, Lixo Marinho, Ecotoxicologia.



## ABSTRACT

In this work, the acute and chronic toxicity of a mixture of light-stick chemicals and water was tested. The light-stick is used in fishery activities to catch swordfish. The tubes were collected on the beaches of the Costa dos Coqueiros - BA, Brazil, in the period from 14th to 31st July 2007. The method used was toxicity test with *Artemia sp.*, acute test with *Lytechinus variegatus* and a short chronic toxicity test where embryos of the sea urchins *Echinometra lucunter* and *Lytechinus variegatus* were exposed to a stock solution consisting of the supernatant formed from a mixture of sea water and the orange-colored light-stick chemical. The value of LC50-24h and 48h to *Artemia sp.* were 0,28% and 0,14%, respectively, the EC50 ~40 minutes to *L. variegatus* was 0,014%, the EC50 – 36 h to *E. lucunter* was 0.062% and the EC50 - 24h to *L. variegatus* was 0.028%, i.e., the chemical mix present in the light-stick is potentially toxic. With the TIE (Toxicity Identification Evaluation) was possible identification the hydrogen peroxide and the Polycyclic Aromatic Hydrocarbonates (PAH's) how the responsible for the toxicity. So, as these flags are commonly used for fishing there is potential danger in their disposal in the open ocean.

**Keywords:** Light-stick, Marine Litter and Ecotoxicology.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – LIGHT-STICKS ENCONTRADOS NA COSTA DOS COQUEIROS, BA .....	25
FIGURA 02 – PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE 100%.....	27
FIGURA 03 – EXEMPLAR DE <i>ARTEMIA SP.</i> FASE METANÁUPLIO. ....	28
FIGURA 04 – EXTRAÇÃO DOS GAMETAS UTILIZANDO CHOQUE ELÉTRICO A 35V .....	31
FIGURA 05 – FÊMEA DE <i>L. VARIEGATUS</i> LIBERANDO OS ÓVULOS .....	32
FIGURA 06 – EXTRAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES.....	32
FIGURA 07 – CÂMARA DE CONTAGEM DOS ÓVULOS, OVOS E EMBRIÕES .....	33
FIGURA 08 – ADIÇÃO DE 100 µL DE SOLUÇÃO ESPERMÁTICA AOS FRASCOS-TESTE.....	33
FIGURA 09 – FINALIZAÇÃO DO ENSAIO COM PRESERVAÇÃO DOS OVOS.....	34
FIGURA 10 – DEMONSTRAÇÃO DE ÓVULO DE <i>L. VARIEGATUS</i> E OVO.....	34
FIGURA 11 – ESQUEMA DE DILUIÇÕES PARA A PRODUÇÃO DA CARTA-CONTROLE. ....	35
FIGURA 12 – DEMONSTRAÇÃO DA <i>PLUTEUS</i> DE <i>E. LUCUNTER</i> NORMAL E ANORMAL .....	37
FIGURA 13 – EXEMPLARES DE <i>E. LUCUNTER</i> INDUZIDOS COM CHOQUE ELÉTRICO .....	37
FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO DAS MANIPULAÇÕES NA FASE I DO TIE .....	39
FIGURA 15 – CARTA-CONTROLE – <i>ARTEMIA SP.</i> EXPOSTO AO DSS.....	41
FIGURA 16 – CARTA-CONTROLE – <i>LYTECHINUS VARIEGATUS</i> - SULFATO DE COBRE .....	41
FIGURA 17 – TESTES DSS - DESENVOLVIMENTO EMBRIO-LARVAL DE OURIÇO-DO-MAR .....	42
FIGURA 18 – CL E/OU CE 50% PARA TESTES COM DIFERENTES ORGANISMOS .....	43
FIGURA 19 – RESULTADOS DA FASE I DO TIE.....	44

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – RESUMO DAS CONDIÇÕES GERAIS DE MANUTENÇÃO E DOS TESTES DE TOXICIDADE COM <i>L. VARIEGATUS</i> .....	35
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCB – bifenilas policloradas  
HPA - hidrocarbonetos policíclicos aromáticos  
DDT – dicloro-difenil-tricloroetano  
DSS – dodecil sulfonato de sódio  
Cu - cobre  
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético  
pH – potencial hidrogeniônico  
ATP – adenosina tri-fosfato  
USEPA – United States Environmental Protection Agency  
CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo  
CE50 – Concentração Letal a 50% dos organismos  
CL50 – Concentração Efetiva a 50% dos organismos  
CENO – Concentração de Efeito não observado  
CEO – Concentração de Efeito observado  
SE 100% - Solução Estoque a 100%  
TIE – Toxicity Identification Evaluation  
HPLC- High Precision Liquid Chromatography  
GC-MS – Cromatógrafo a Gás acoplado a um Espectrômetro de Massa

---

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1 POLUIÇÃO AQUÁTICA.....	13
1.2 ECOTOXICOLOGIA .....	15
1.3 LIXO MARINHO .....	22
1.4 LIGHT-STICK .....	24
2. JUSTIFICATIVA .....	25
3. OBJETIVO.....	26
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
4. METODOLOGIA.....	27
4.1. COLETA DOS LIGHT-STICKS.....	27
4.2. LAVAGEM DE VIDRARIAS .....	27
4.3. EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO SOBRENADANTE .....	27
4.4. PREPARAÇÃO DA DILUIÇÃO DO LIGHT-STICK EM SOLVENTE ETANOL .....	28
4.5. TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM ARTEMIA SP. ....	28
4.6. TESTE DE TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA COM OURIÇOS-DO-MAR .....	30
4.7. TIE (TOXICITY IDENTIFICATION EVALUATION) – FASE I .....	38
4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	40
5. RESULTADOS .....	40
5.1 SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA E CARTAS-CONTROLE .....	40
5.2 TESTES COM LIGHT-STICK.....	42
6. DISCUSSÃO .....	45
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Poluição Aquática

O impacto ambiental segundo a Legislação Brasileira é “*qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que, direta ou indiretamente afetam: I- a saúde, a segurança e o bem estar da população; II- as atividade sociais e econômicas; III- a biota; IV- as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente; e V- a qualidade dos recursos ambientais*” segundo a Resolução CONAMA 001 de 23/01/1986 (RANZANI-PAIVA *et al.* 2004).

A visão antropocêntrica da sociedade ocasionou na falta de desenvolvimento sustentável provocado pelo uso abusivo dos recursos naturais sem a preocupação com as futuras gerações.

Efeitos adversos da exploração inadequada do ambiente tornaram-se mais pronunciados durante o século XX, com o crescimento populacional e o desenvolvimento econômico. As conseqüências desse desenvolvimento descontrolado foram demonstradas com acidentes ambientais que geraram problemas a saúde pública. Os episódios catastróficos de contaminação por mercúrio, cádmio, bifenilas poli-clorados (PCBs) e intoxicação de Minamata e Niigata, Japão, 1953 e 1964, respectivamente, e em Seveso, Itália em 1976 deram início a preocupação com o despejo de efluentes. No Brasil efeitos de poluição foram observados em Cubatão, com a contaminação das águas e sedimento causando efeitos deletérios a biota aquática (ABESSA, 2002).

A responsabilidade para com o destino de efluentes proveniente do crescimento urbano e industrial iniciou-se tardiamente em todos os lugares do mundo. Somente após a ocorrência de sérios acidentes ambientais, os países passaram a desenvolver legislações que obrigassem as empresas industriais e comerciais a tratarem seus resíduos de forma a não comprometer ou alterar a qualidade do corpo receptor (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

Os problemas ambientais introduzidos pelo desenvolvimento industrial e tecnológico foram parcialmente resolvidos pelas nações industrializadas, por várias técnicas e caminhos alternativos. O uso de grandes bancos de dados sobre problemas ambientais, produzidos pelas instituições de pesquisa e universidades,

o aumento do uso da ciência da computação para entender as interações ecológicas e vários níveis, a simulação ecológica e outros tipos de modelagem, e a incorporação princípios ecológicos na legislação ambiental são alguns dos exemplos (BADARÓ-PEDROSO, 1993).

O lançamento de dejetos nos corpos hídricos se dá principalmente pela: “falta ou mau funcionamento de estações municipais e industriais de tratamento de efluentes; no lançamento descontrolado de dejetos oriundos da produção em massa de animais (aquicultura); na ausência de aterros sanitários impermeabilizados; na contaminação de grandes áreas por resíduos químicos da indústria e do comércio, enterrados ou depositados clandestinamente; na aplicação indevida e quase sempre excessiva de agrotóxicos, além de produtos proibidos; na ocupação de mananciais; na mineração desordenada e excessiva em calhas de rios; na destruição de matas ciliares; na inexistência ou ineficiência de programas de conscientização e educação ambiental; na falta de uma política eficiente de gerenciamento de recursos hídricos; na falta da aplicação do cumprimento das leis existentes sobre os recursos hídricos”, além da falta de conscientização da população em relação ao despejo de dejetos sólidos nos rios, praias e oceano aberto em atividades turísticas e pesca (KNIE & LOPES, 2004).

As substâncias quando são despejados no ambiente aquático sofrem inúmeros processos de transformação, os principais são a hidrólise, a fotólise, a complexação e a biodegradação. Esses processos são importantes porque determinam a persistência dos contaminantes no ambiente (COSTA *et al.*, 2008). Quando estes compostos persistem no ambiente acabam sendo absorvidos pela biota, que sofrerá os efeitos adversos provocados pela acumulação destes compostos em células e tecidos. Dentre os efeitos bioquímicos e fisiológicos provocados pelos agentes tóxicos podem-se observar: interferência na produção de ATP; modificações na permeabilidade das membranas celulares; inibição competitiva reversível ou irreversível de enzimas; distúrbios no metabolismo de lipídios, podendo resultar em alterações hepáticas; alterações nos sistemas enzimáticos microsossomais, os quais são responsáveis pela biotransformação de xenobiontes; alteração na estrutura ou na atividade de enzimas que participam de processos reguladores, comprometendo a síntese e liberação de hormônios, bem como reduzindo a velocidade de crescimento dos organismos; distúrbios no

metabolismo de carboidratos e distúrbios no processo respiratório pela inibição do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa (CONNELL & MILLER, 1984).

Alguns órgãos como *Environment Canada* e *Environmental Protection Agency* dos Estados Unidos (U.S. EPA), e de padronização, como *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD), *Association of Analytical Communities* (AOAC) e *International Organization for Standardization* (ISO) tem como objetivo o desenvolvimento de protocolos de testes de toxicidade que permitam definir limiares de toxicidade permissíveis com níveis de incerteza aceitáveis e que sirvam de guia para as entidades reguladoras para a tomada de decisões. Onde estes níveis servem de base para a fiscalização em programas de monitoramento da qualidade dos ecossistemas (SOUSA, 2002; COSTA *et al.*, 2008).

## 1.2 Ecotoxicologia

O conceito de Ecotoxicologia foi proposto por Blaise em 1984, que significa a junção da ecologia com a toxicologia e, portanto estuda os efeitos dos poluentes aos organismos e como esses interagem em seus habitats. Esta é uma ciência multidisciplinar, que se faz necessária a compreensão da Biologia, Ecologia, Química, Bioquímica, Fisiologia, Estatístico, Oceanografia, Limnologia, Toxicologia, etc. Tendo como base as análises estatísticas para a comprovação dos dados em diferentes condições ambientais (RAND, 1995). Os primeiros testes de toxicidade com efluentes industriais foram realizados entre 1863 e 1917, porém somente na década de 1930 foram implementados alguns testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos, com o objetivo de estabelecer a toxicidade de substâncias químicas e despejos líquidos. Os vários estudos realizados na década de 1940 recomendavam o uso de testes com peixes para avaliar a toxicidade de efluentes líquidos. Os estudos mostraram que algumas espécies de peixes eram mais sensíveis a alguns agentes químicos, sendo então desenvolvidos estudos com espécies mais sensíveis de importância ecológica e econômica representativos do ecossistema aquático, fazendo com que houvesse diferença na sensibilidade das espécies (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).



Uma diversidade de organismos-teste foi utilizada nos anos 50 e 60 nos laboratórios líderes de diversos países, alguns estão sendo usados até hoje em laboratórios de todo mundo. Os critérios para a decisão das mesmas espécies foram as boas experiências com seu manuseio e a sua importância na cadeia alimentar, assim como sua ampla disseminação e fácil disponibilidade. Esses organismos pertencem as bactérias: *Pseudomonas putida*, e a partir do final dos anos 70, as fotobactérias *Vibrio fisheri*, as algas *Scenedesmus subspicatus* e *Selenastrum capricornutum*, os microcrustáceos *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*, e peixes como *Danio rerio*, *Pimephales promelas*, *Leuciscus idus* ou *Poecilia reticulata*, dentre outros (KNIE & LOPES, 2004).

Na década de 70 métodos mais sofisticados para cultivo de organismos em laboratório foram desenvolvidos, assim como a procura por organismos mais sensíveis, a utilização da fase larval e ovos dos peixes fizeram com que fosse possível avaliar a toxicidade crônica dos elementos químicos e de amostras ambientais, verificando o retardamento no desenvolvimento e crescimento larval e taxa de reprodução, diferentemente dos testes agudos que verificam a mortalidade dos indivíduos (DOMINGUES & BERTOLETTI, 2008).

No Brasil, algumas atividades com testes de toxicidade foram desenvolvidas nas décadas de 70 e 80, porém foi na década de 90 que essa área de estudo se consolidou, com a criação de diversos grupos de pesquisa, a elaboração de procedimentos e normas técnicas (ABESSA, 2002). A Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo-CETESB foi quem deu início aos ensaios e padronizações de ensaios ecotoxicológicos no Brasil (VEIGA & VITAL, 2002). Deste modo, a realização de ensaios de toxicidade tem sido incluída em programas de monitoramento, constituindo uma das análises indispensáveis no controle de fontes de poluição.

Já que as análises químicas não são capazes de determinar quais substâncias e em que concentração afetam os sistemas biológicos, não são suficientes para avaliar o risco ambiental dos contaminantes. No entanto, os testes de toxicidade não substituem as análises químicas tradicionais. Por isso as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre a biota. (COSTA *et al.*, 2008).

### **1.2.1 Organismo-teste**

Uma espécie pode ser utilizada em testes de toxicidade quando ela apresenta alta sensibilidade a uma diversidade de agentes químicos. Sua sensibilidade deve ser relativamente constante, de maneira que possibilite a obtenção de resultados precisos, garantindo, assim, boa repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados. Portanto são necessários conhecimentos sobre a biologia da espécie, como reprodução, hábitos alimentares, fisiologia e comportamento, tanto para o cultivo quanto para a realização dos testes. Uma espécie é recomendada para padronização de testes quando ela é de fácil manutenção e cultivo em laboratório. O uso de espécies de pequeno porte e ciclo de vida não muito longo se mostra ideal aos estudos ecotoxicológicos em laboratório. Dentre estes estão os cladóceros, misidáceos, copépodes, anfípodas e artêmias e outros cujo cultivo em laboratório está bem estabelecido e não apresentam muita dificuldade para sua manutenção (RAND, 1995; ABNT, 2004; DOMINGUES & BERTOLETTI, 2008). Organismos que possuem fase embrionária larval-planctônica vêm sendo comumente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos, são estes: ouriços-do-mar, mexilhões e ostras

A *Artemia* sp. é um microcústáceo encontrado ao longo dos cinco continentes. Tem como habitat natural lagos de águas salgadas e salinas, é adaptada para a sobrevivência em águas que sofrem marcantes variações, devido às estações do ano. A ampla distribuição e facilidade de obtenção de seus cistos fazem com que o gênero *Artemia* tenha sido usado em testes de toxicidade para a ampla variedade de produtos como pesticidas, petroquímicos, dispersantes, metais pesados, metabólicos de microorganismos, e produtos carcinogênicos, desde a década de 1950. No Brasil estes testes foram inicialmente utilizados pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) em meados da década de 1980 para a avaliação da toxicidade aguda de substâncias, sendo a norma (CETESB LO5. O21) publicada em 1987. Até a década de 90 as artêmias foram comumente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos com amostras líquidas, devido sua ampla distribuição geográfica e sua facilidade de cultivo. Atualmente estes microcústáceos vêm sendo substituídos por organismos como misidáceos e copépodes que apresentam maior sensibilidade a uma variedade de contaminantes (VEIGA & VITAL, 2002).

Os gametas e embriões de ouriços-do-mar têm sido bastante utilizados em testes de toxicidade devido à sua sensibilidade, fácil coleta e manuseio, além de fornecer resultados de fácil interpretação e bastante reproduzíveis (NIPPER *et. al* 1993). Além disso, o amplo conhecimento de seu desenvolvimento embrionário faz do ouriço-do-mar um excelente indicador biológico. Teste com gametas e embriões de ouriços-do-mar foram padronizados por USEPA, 1991 e pela Environment Canada, 1992. No Brasil, a CETESB, 1990 e 1992 adaptou os testes com ouriços-do-mar para espécies que ocorrem na costa brasileira. Dentre as espécies de ouriço-do-mar, *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* tem sido as mais utilizadas em ensaios ecotoxicológicos no Brasil (MASTROTI, 2002).

A espécie *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) está inserido na família Toxopneustidae, possui carapaça esverdeada, achatada inferiormente, espinhos apresentando cores que variam desde verde à púrpura arroxeado. Sua dieta alimentar consiste em macro-algas, é encontrado onde as mesmas estão presentes em abundância, possuem o comportamento característico de recobrirem-se com detritos vegetais, pequenas conchas, etc. Os animais podem ser encontrados desde a zona entre marés até cerca de 20 m de profundidade. É bastante comum na região do Caribe e na costa Atlântica da América do Sul, ocorrendo desde a Carolina do Norte (EUA) até a Costa Sudeste do Brasil (ABNT, 2003).

A espécie *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) está inserida na família Echinometridae têm corpo globoso e simetria radial, seus espinhos são móveis de tamanho variado e sua coloração varia do preto ao roxo. Alimenta-se raspando com os dentes algas e outros organismos fixos no substrato. Ocorre em águas tropicais e temperadas do oceano Atlântico, geralmente entre o limite da baixa-mar até 45 metros de profundidade, sendo encontrados predominantemente em ambientes expostos a águas turbulentas (TAVARES, 2004).

A utilização de ouriço-do-mar foi estabelecida por diversos pesquisadores que investigaram os efeitos de metais em sua fertilização e desenvolvimento, na década de 1920 a 1930. A fase da fecundação e do desenvolvimento embrionário, geralmente são críticas, para o crescimento normal desses animais e sensíveis para detectar efeitos da poluição em ecossistemas marinhos (NIPPER *et. al* 1993).

### **1.2.2 Sistema de Teste**

Existem três tipos de sistema para testes de toxicidade: estático, semi-estático e de fluxo contínuo. Para realização deste estudo foi utilizado o sistema estático, que é o tipo de teste com o qual não é feita a troca da solução-teste no período de exposição. Este sistema é recomendado para testes com substâncias estáveis, quando o teste é feito em curto período de exposição, ou quando a espécie utilizada possui tamanho reduzido, o que impossibilitaria o uso do fluxo contínuo, por possível sucção dos espécimes (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

### **1.2.3 Teste Agudo**

O ensaio de toxicidade aguda é definido como aquele que avalia os efeitos rápidos sofridos pelos organismos expostos ao agente químico, em curto período de tempo, geralmente de 24 à 96h. Devido à facilidade de execução, curta duração e baixo custo, os ensaios de toxicidade aguda foram os primeiros a serem desenvolvidos e, por esse motivo constituem a base de dados ecotoxicológicos. Nestes ensaios geralmente são avaliados a mortalidade ou a efetividade que pode verificar imobilidade ou algum tipo de comportamento apresentado pelos organismos (BIRGE *et al.* 1985).

Segundo a CETESB (1990), o efeito agudo é definido como sendo uma resposta severa e com rapidez dos organismos aquáticos a um estímulo que pode se manifestar num período de até 96 horas, causando quase sempre a letalidade, sendo que pode ocorrer em alguns micro-crustáceos a imobilidade.

Os testes de toxicidade aguda avaliam o efeito de substâncias químicas isoladas ou em misturas, como em efluentes e águas receptoras contaminadas. Nesses ensaios, normalmente, procura-se estimar a concentração - teste que causa efeito a 50% da população exposta, durante um período de tempo determinado (24, 48, 72, 96 horas). Tal concentração corresponde à CE ou CL50 (Concentração Efetiva ou Concentração Letal Mediana), obtidas a partir de dados quantais (dicotômicos, binomiais, binários), como número de vivos e de mortos (BURATINI; BERTOLETTI ; ZAGATTO, 2004).

De acordo com a Resolução CONAMA 357/05, no capítulo III, Seção II, em ambientes marinhos, pertencentes à classe II, não pode ser verificado a ocorrência de efeito tóxico agudo em organismos.

#### **1.2.4 Teste crônico**

Os testes crônicos avaliam os possíveis efeitos adversos de uma amostra ou elemento químico sob condições de longo tempo de exposição a concentrações subletais (RAND, 1995). Os ensaios crônicos expõem o organismo-teste ao agente potencialmente tóxico durante todo seu ciclo de vida, incluindo estágios sensíveis como juventude, crescimento, maturidade sexual e reprodução. O resultado expresso em Concentração de Efeito Não Observado - CENO, sendo esta a mais alta concentração do agente testada que não provoca efeito quando comparada com o controle; e em Concentração de Efeito Observado - CEO, a mais baixa concentração que causa efeito significativo sobre a população quando comparada ao controle (RAND, 1995).

#### **1.2.5 Substâncias de Referência**

Segundo o Environment Canada (1990) “a habilidade de uma substância de referência realmente detectar lotes de organismos debilitados, ou geneticamente diferentes, ainda é pouco comprovada experimentalmente. Assim, segundo essa instituição, o objetivo dos ensaios ecotoxicológicos com substâncias de referência é avaliar a repetibilidade do método analítico em um determinado

Substâncias de referência são utilizadas para avaliar as condições de sensibilidade dos organismos-teste, sejam eles provenientes do campo ou até mesmo os cultivados no laboratório. Com testes utilizando substâncias de referência, é possível obter resultados comparáveis, ou seja, que apresentam boa repetibilidade e reprodutibilidade, podendo assim avaliar variações sazonais dos organismos em resposta a um determinado reagente (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

Para que seja padronizada uma substância de referência é necessário que ela siga os seguintes preceitos (ENVIRONMENT CANADA, 1990):

- ser solúvel em água;
- ser estável (não volátil, não transformável e não biodegradável);
- ser de fácil análise analítica;
- ser um contaminante ambiental;
- estar disponível no mercado com alto grau de pureza;
- ter alta toxicidade em água;
- ter toxicidade consistente;
- ter toxicidade não específica;
- ter dados ecotoxicológicos básicos disponíveis;
- não seja perigosa para o manuseio pelos técnicos.

O dicromato de potássio é uma das substâncias de referência mais utilizadas em ensaios ecotoxicológicos, no entanto, trata-se de um composto corrosivo, facilmente absorvido pela pele e carcinogênico. Nesse sentido, fica evidente a inconveniência de se utilizar essa substância quer pelo aspecto da segurança dos técnicos bem como pela sua introdução contínua no ambiente.

O sulfato de cobre é uma substância de referência muito utilizada em testes de toxicidade, porém apresenta algumas características que podem interferir nos bioensaios como: sua precipitação com a presença de compostos orgânicos e inorgânicos na água; conseqüentemente, a dureza e o pH influenciam na toxicidade do cobre.

Outros compostos freqüentemente utilizadas como substância de referência para testes de toxicidade pode-se citar: DSS, sulfato de zinco, fenol, nitrato de prata, cloreto de sódio, cloreto de potássio, entre outros (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

Neste estudo as substâncias de referência utilizadas para a verificação da sensibilidade dos lotes foram: DSS (dodecil sulfonato de sódio), sulfato de cobre e sulfato de zinco.

### **1.2.6 Carta Controle**

Após a obtenção dos resultados dos testes com substância de referência se constrói uma carta-controle, tendo por finalidade estabelecer uma faixa de aceitação dos valores obtidos através do cálculo estatístico da concentração letal - CL50, sendo assim a mesma apresenta a sensibilidade dos organismos à substância de referência (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

Para a construção da carta controle é necessário um mínimo de 20 testes com substância de referência a fim de calcular o valor médio, o desvio-padrão e o coeficiente de variação. Caso não seja possível efetivar a realização dos 20 resultados de ensaio, deve ser calculada a média provisória tendo, no mínimo, cinco testes para publicação da carta controle apresentando a faixa de sensibilidade dos organismos.

Após o cálculo da média da CE (concentração efetiva), pode-se encontrar o desvio-padrão superior e inferior, que são descritos na carta-controle através de linhas perpendiculares ao eixo que apresenta os resultados dos ensaios de toxicidade. Para melhor confiabilidade dos resultados não devem ser considerados os testes cujo coeficiente de variação seja superior a 30% (ABNT, 2003).

### **1.3 Lixo marinho**

Dentre os problemas com poluição marinha se destaca o lixo marinho, ou seja, partículas/dejetos sólidos (plástico, papel, madeira, vidro, isopor, borracha e outros) despejadas ou que vão parar nos oceanos, sendo o lixo um dos principais responsáveis pela poluição das águas, especialmente em regiões costeiras. O plástico, devido sua alta utilização em produtos comerciais é o material mais encontrado nas praias quando coletado lixo marinho, causando inúmeros efeitos deletérios à biota.

O lixo marinho afeta uma infinidade de organismos da fauna aquática. Sendo quantificadas 267 espécies de animais marinhos em todo o mundo, incluindo 86% de todas as espécies de tartarugas marinhas, 44% de todas as espécies de aves marinhas e 43% de todas as espécies de mamíferos marinhos, além de muitas espécies de peixes e crustáceos, que sofrem com a presença destes resíduos sólidos nas águas e praias (MASCARENHAS *et. al*, 2004).

Os resíduos sólidos no ambiente marinho foram reconhecidos como um problema ambiental apenas recentemente. Durante décadas, a eliminação de resíduos não era mais que uma política municipal, pois, aparentemente, os restos dispostos no ambiente marinho simplesmente desapareceriam. Onde não se sabia que os plásticos (e outros produtos como nylon, poliestireno, borracha, etc.) seriam um dos mais importantes poluentes ambientais do século XXI (IVAR DO SUL & COSTA, 2007).

Duas das principais características que tornam os plásticos tão úteis são: o seu peso leve e durabilidade, porém este material não possui um descarte e tratamento adequado o que faz dele uma grande ameaça ambiental. Estes são facilmente transportados a longas distâncias das áreas de origem e se acumulam nos oceanos, onde causam uma variedade de impactos ambientais e econômicos (THOMPSON *et al.*, 2009; UNEP, 2005).

O plástico quebra lentamente através de uma combinação de fotodegradação de oxidação e desgaste mecânico (ANDRADY, 2003). Estes podem permanecer nos oceanos por décadas quando livres de exposição da radiação UV e da ação de ondas, uma vez que podem estar recobertos por sedimento ou em áreas abrigadas da luz e da energia dos ventos.

Dado o impacto do lixo plástico, um esforço considerável tem sido feito para remover resíduos de plástico e outros resíduos persistentes no ambiente. Esta remoção pode ocorrer antes de entrar no mar, através do recolhimento de lixo e sistemas de rastreio de águas residuais, e posteriormente, através de coletas de lixo das praias, no fundo do mar ou em oceano aberto (PICHEL *et al.*, 2007). No entanto, a solução mais eficiente e rentável é o de reduzir a liberação de plástico no ambiente em primeiro lugar. As medidas tomadas para atingir esse objetivo incluem a educação ambiental, através da conscientização da população e das indústrias, e a legislação.

A ONG Global Garbage patrocinada pela Light House Foundation vem desenvolvendo atividades socioambientais com a população e coleta de lixo marinho no litoral da Bahia, onde o foco dos estudos da ONG é a coleta de lixo internacional encontrado nas praias, que possivelmente chegaram até a costa Brasileira através das correntes oceânicas. O lixo internacional é identificado pelo código de barras que é específico da origem de cada país, dentre inúmeros



utensílios inusitados encontrados pelos coletores, chamados “Capitães de Areia”, jovens nativos que trabalham para a organização, estão alguns materiais que são de extrema importância ambiental, são: os nibs (pellets), partículas que vem sendo estudadas por grupos de pesquisa no mundo, devido sua alta taxa de adsorção de PCB's, DDT e HPA's, além de sua ingestão por aves marinhas; e os light-sticks que são o tema do presente estudo.

#### 1.4 Light-stick

Dentre os diversos petrechos de pesca que são utilizados no Brasil se destaca o espinhel de superfície, sua utilização teve início no ano de 1956 na região nordeste pelos atuneiros japoneses (AZEVEDO *et al.*, 1999). O petrecho utilizado atualmente consiste em uma linha principal chamada linha mestra constituída de náilon monofilamento, e que são acopladas linhas secundárias contendo os anzóis, onde podem ser utilizadas iscas específicas para cada tipo de captura, como por exemplo, o espadarte *Xiphias gladius*, que é capturado em águas superficiais através do light-stick (Figura 1), atrator luminoso para pescas noturnas (AMORIM & ARFELLI, 1984; AMORIM *et al.*, 1998). Inúmeros anzóis contendo light-sticks são lançados no mar em pescas de espinhel, onde acidentalmente estes sinalizadores acabam parando no mar e/ou nas praias, podendo muitas vezes abrir e extravasar o líquido contido no atrator.

O light-stick emite luz por até 48 horas, através de uma reação de quimioluminescência entre dois compostos que estão separados por uma ampola de vidro e quando o tubo é dobrado a ampola se quebra causando a mistura de um éster oxalato (derivados de triclorosalicilato) com peróxido de hidrogênio, processo catalisado por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos fluorescentes (9,10- difenilantraceno, perileno, rubreno), reação que ocorre em um solvente muito viscoso (geralmente di-n-butilftalato) (STEVANI & BAADER, 1999).



**Figura 1.** Light-sticks encontrados na Costa dos Coqueiros, BA. Foto: Fabiano Barreto.

Além do problema causado na captura acidental de tartarugas marinhas (WANG *et al.* 2007), os light-sticks são liberados nos oceanos onde podem ficar circulando pelos mares como resíduo sólido e acabar sendo ingeridos por algumas aves marinhas ou até mesmo alguns peixes causando obstrução gastrointestinal e outras sérias complicações hormonais e reprodutivas (SHAW & MAPES, 1979; WEHLE & COLEMAN, 1983; FURNESS, 1985; AZZARELLO & VLEET, 1987), porém também podem chegar até as praias e a população local por falta de instrução acaba usando o líquido contido no tubo como bronzeador, e para a cura de enfermidades como reumatismo, vitiligo e micoses. Os atratores muitas vezes abrem na água e afetam a biota marinha, devido à liberação de inúmeros contaminantes presentes em sua constituição. Na bibliografia a toxicidade do líquido contido nos atratores foi avaliada em ratos *Winstar* (IVAR DO SUL, *et al.* 2007) e através de ensaios com citotoxicidade (BAGATTINI *et al.*, 2006), porém com organismos marinhos existe apenas testes com toxicidade aguda e taxa de eclosão de cistos de artêmia (PINHO *et al.*, 2009).

## 2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a problemática causada pelos light-sticks para a população litorânea da Costa dos Coqueiros e outras regiões da Bahia; e os possíveis efeitos adversos à biota aquática quando o líquido contido nos tubos extravasa na coluna d'água e nas praias, se torna necessário o conhecimento dos efeitos e em qual magnitude eles afetam o ecossistema aquático, a fim de criar medidas corretivas para a solução deste problema de poluição ambiental e saúde pública.

### 3. OBJETIVO

Avaliar e identificar a toxicidade aguda e crônica do líquido contido no (light-stick) sinalizador de coloração laranja.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Desenvolver cartas-controle de sensibilidade com diferentes organismos marinhos a fim de avaliar a sensibilidade dos lotes utilizados nos ensaios definitivos com light-stick;
- Desenvolver metodologias de teste de toxicidade com light-stick, por este conter líquido imiscível, utilizando a fração sobrenadante e/ou um solvente orgânico (Etanol);
- Avaliar a toxicidade aguda do light-stick para o microcrustáceo *Artemia sp.* - utilizando a fração sobrenadante;
- Avaliar a toxicidade aguda do light-stick na fecundação do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* - utilizando a fração sobrenadante;
- Avaliar a toxicidade crônica de curta-duração do light-stick no desenvolvimento embrio-larval dos ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* - utilizando a fração sobrenadante (*L. variegatus* e *E. lucunter*) e com Etanol como solvente (*L. variegatus*);
- Comparar a sensibilidade dos diferentes testes de toxicidade, para verificar o organismo e o tipo de teste mais sensível ao light-stick;
- Utilizar da técnica do TIE – *Toxicity Identification Evaluation* (fase I) para verificar os principais grupos de compostos que causam a toxicidade do light-stick na fração sobrenadante.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Coleta dos Light-sticks

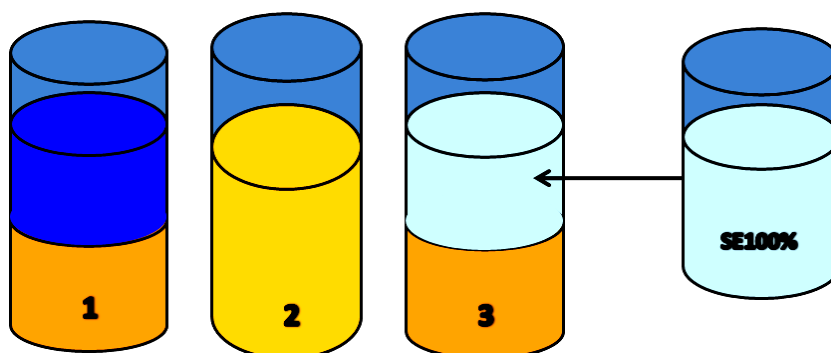
As coletas foram realizadas através de uma caminhada científica de 14 a 31 de Julho de 2007, por aproximadamente 200 km nas praias da Costa dos Coqueiros, BA, onde foram coletados cerca de 2.554 tubos sendo que cerca de 34% estavam abertos, e 63% possuíam a coloração laranja.

### 4.2. Lavagem de Vidrarias

As vidrarias utilizadas na execução dos testes como: béqueres, balões volumétricos, pipetas Pasteur, etc. foram previamente mantidas em ácido nítrico 10% por um período de 24h, e lavadas com água de torneira por 3 vezes e com água destilada por mais 3 vezes.

### 4.3. Extração da Fração Sobrenadante

Os tubos foram abertos e por ser parcialmente insolúvel em água e mais denso, devido ao solvente di-n-butilftalato, foi desenvolvida uma metodologia para simular a disponibilização dos compostos para a coluna d'água, sendo extraída segundo a Figura 2 uma fração aquosa (Sobrenadante) que esteve em contato com o light-stick, que representa a solução estoque 100% (v/v) (SE 100%).



**Figura 2.** Preparação da solução estoque 100% (SE100%). 1 e 2- homogeneizado do óleo com água do mar controle com salinidade de 35 (proporção 1:1); 3- separação em centrífuga (1 minuto) a 3.500 RPM.

#### 4.4. Preparação da diluição do Light-stick em solvente Etanol

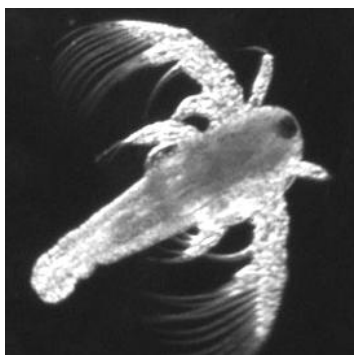
Por ser insolúvel em água foi desenvolvida uma metodologia para o líquido contido no light-stick, onde este foi dissolvido em solução de água do mar (salinidade= 35) a 5% (v/v) de etanol, a partir desta solução estoque foram preparadas as diluições para a execução dos testes de toxicidade crônica de curta duração com embriões de ouriço-do-mar da espécie *Lytechinus variegatus*, que serão descritos posteriormente. Para que não houvesse interpretação errônea devido a toxicidade do solvente utilizado foram feitos controles com água do mar e em concentrações de 5, 2.5 e 1% de Etanol, caso este fosse tóxico em concentrações abaixo 1%, o teste seria cancelado uma vez que o Etanol causaria um falso positivo na verificação da toxicidade do light-stick.

#### 4.5. Teste de toxicidade aguda com *Artemia* sp.

O ensaios de toxicidade aguda com *Artemia* sp., que estão descritos a seguir foram baseados em metodologia adaptada de Veiga & Vital (2002).

##### 4.5.1 Cultivo e Testes com *Artemia* sp.

A artêmia pertence ao filo Arthropoda (pés articulados), à classe Crustácea, à subclasse Branchiopoda (pés com brânquias) à ordem Anostraca (sem carapaça), à família Artemidae e ao gênero *Artemia* - Leach, 1819 – Figura 3. A reprodução ocorre tanto sexualmente (com copulação), quanto partenogeneticamente (sem copulação). Em condições ambientais de estresse não há fertilização, e o desenvolvimento embrionário inicia-se, tão logo os ovos chegam à câmara uterina, por um processo determinado partenogênese (VEIGA & VITAL, 2002).



**Figura 3.** Exemplar de *Artemia* sp. fase metanáuplio.

Os ovos encapsulados, denominados cistos, possuem forma bicôncava com diâmetro médio de 200 a 300  $\mu\text{m}$ . Esses ovos são eclodidos a partir do rompimento da membrana de eclosão através da combinação de luz, oxigênio e umidade, liberando o náuplio para nadar ativamente.

Durante as primeiras 24 horas, o náuplio consome o vitelo (camada que envolve seu corpo) como fonte de alimento e, por esta razão, o processo de alimentação por filtração não ocorre, permitindo que o organismo encontre-se mais protegido da presença de possíveis contaminantes presentes no meio (SORGELOOS *et al.*, 1978).

Dentre essas fases as melhores para se realizar os testes toxicológicos são metanáuplio II e III, uma vez que, nestas fases, os organismos já iniciaram a atividade de filtração, possibilitando o contato do epitélio do trato digestivo com o meio externo, estando, portanto mais sensíveis diminuindo assim a variabilidade do teste. (SORGELOS *et al.*, 1978).

Os cistos de *Artemia sp.* utilizados provêm de procedência conhecida, obtidos em indústrias salineiras, de Macau (RN) e isentos de contaminantes. Onde apresentaram taxa de eclosão superior a 70%.

#### **4.5.2. Preparo da amostra para teste**

O sobrenadante do light-stick foi diluído em água do mar natural, com a ausência de contaminantes e procedência garantida, essa água foi coletada na Laje de Santos, Santos, SP. Para que a sobrevivência dos organismos no controle fosse de 90% no mínimo.

O Light-stick foi diluído nas concentrações-teste apropriadas em balão volumétrico, e transferidas 10 ml das soluções para os béqueres de 30 ml. Para minimizar perdas por evaporação estes foram dispostos numa bandeja e cobertos. Cada concentração foi testada, no mínimo, em triplicata.

Foi determinado o pH em todas as amostras e em pelo menos duas concentrações-teste para controlar as condições básicas de exposição dos organismos e subsidiar a interpretação dos resultados.

#### **4.5.3. Carta-controle**

Para verificar a sensibilidade dos lotes de eclosão foram desenvolvidos ensaios com substância de referência Dodecil Sulfonato de Sódio (DSS) nas seguintes concentrações: 16; 21; 27; 35 e 43 mg/L. Para a produção da carta-controle foram desenvolvidos 20 testes e calculados a média (CL50-24h) e os limites superior e inferior de sensibilidade.

#### **4.5.4. Teste definitivo**

Os testes definitivos foram realizados usando como referência as concentrações fornecidas nos testes preliminares. Foram testadas no mínimo cinco concentrações (0,2; 0,3; 0,5; 0,7 e 2%).

Frascos-testes de controle foram preparados com 10 ml de água de diluição e dez organismos na fase larval II-III com o auxílio de uma pipeta Pasteur de ponta arredondada e larga. Os frascos de testes e os de controle foram incubados a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas, na ausência de luz.

O efeito observado foi a letalidade dos indivíduos, sendo assim após o período de 24 e 48h foram feitas contagens de mortos e vivos para que fosse calculado o CL50 – 24 e 48h.

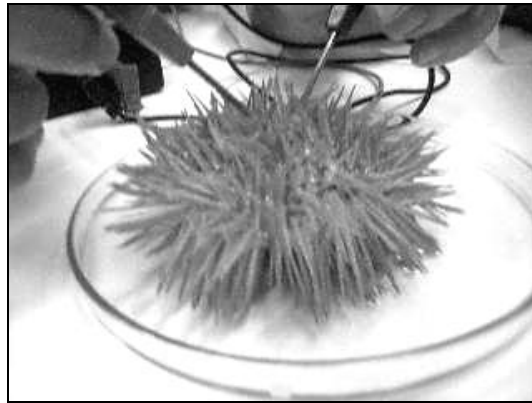
### **4.6. Teste de toxicidade aguda e crônica com ouriços-do-mar**

#### **4.6.1. Metodologia e controle de teste**

A metodologia para realização dos testes de toxicidade aguda de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, Lamarck (1816), foi empregada seguindo os critérios adotados por Mastroti (2002) com modificações. Os ensaios toxicidade crônica de curta duração com desenvolvimento embrio-larval de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* seguiram metodologia adaptada de Prósperi & Araújo (2002); Foram coletados através de mergulho livre entre 15 a 20 exemplares adultos, na Ilha das Palmas e São Sebastião. Os organismos foram mantidos em tanque com água do mar. Os parâmetros físico-químicos tais como salinidade, oxigênio dissolvido, amônia, temperatura e os procedimentos quanto à alimentação foram controlados periodicamente.

#### **4.6.2. Extração dos gametas**

Para cada teste foram utilizados aproximadamente 3 fêmeas e 3 machos com finalidade de aumentar a variabilidade genética. A liberação dos gametas foi provocada através da utilização de circuitos elétricos de corrente alternada, com transformador de 35 V (PRÓSPERI & ARAUJO, 2002) na região aboral conforme Figura 4, próximo aos gonóporos do organismo, ou com a injeção de 5 ml de KCl 0,5M na superfície oral dos indivíduos. Como os mesmos não apresentam dimorfismo sexual externo, a identificação é feita pela coloração. As fêmeas liberam os gametas na cor alaranjada e os machos na coloração branca.



**Figura 4.** Extração dos gametas utilizando choque elétrico a 35V.

Após a liberação dos óvulos cada fêmea foi colocada com a parte aboral voltada para baixo em frascos contendo água do mar (Figura 5), para deposição dos óvulos, por aproximadamente 15 minutos, com o fim de evitar a liberação de óvulos imaturos. Em seguida, foi filtrado o conteúdo dos frascos em malha de 350 $\mu$ m e reunidos em béquer de 1000 mL. Acrescentou-se água de diluição, elevando-se o volume para 600 mL, aguardando a decantação dos óvulos e em seguida descartando os sobrenadantes. Este processo de lavagem é repetido 3 vezes.





**Figura 5.** Fêmea de *L. variegatus* liberando os óvulos.

Com o auxílio da pipeta automática, foi retirada uma amostra de óvulos, para análise em microscópio com o intuito de verificar o estágio de maturação e possíveis anomalias. Os espermatozoides de cada indivíduo foram coletados com a pipeta automática diretamente dos gonóporos, evitando que estes entrassem em contato com a água do mar até o início dos experimentos, sendo colocados em um béquer de 10 mL, mantido sobre gelo (Figura 6), com o fim de que o mesmo não entre em atividade antes do contato com o óvulo.



**Figura 6.** Extração dos espermatozoides (*E. lucunter*), armazenamento sobre gelo.

A solução espermática foi obtida a partir da diluição de 0,5 mL de esperma em 24,5 ml de água do mar, misturando-se para dissolução dos grumos e ativação dos espermatozoides.

Para contagem dos óvulos, foi retirado 10 $\mu$ l da solução de óvulos, e preenchido com água do mar até formar 1mL, na câmara de Sedgewick-Rafter (Figura 7). Dessa forma foi contado no microscópio óptico 3 sub-amostras de 1 mL da qual obteve-se a média de óvulos/ml.



**Figura 7.** Câmara de contagem dos óvulos, ovos e embriões de ouriço-do-mar.

#### **4.6.3. Teste agudo com gametas de *L. variegatus*.**

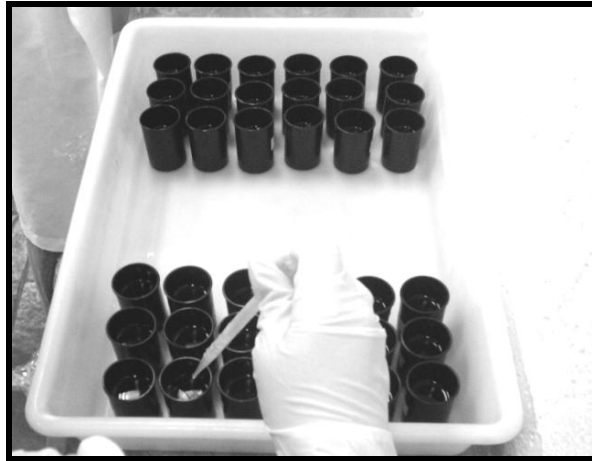
Utilizando a pipeta automática, acrescenta-se a cada frasco teste 100 $\mu$ l da solução de espermatozoides, iniciando assim o período de 20 minutos de exposição às concentrações (Figura 8).



**Figura 8.** Adição de 100  $\mu$ l de solução espermática aos frascos-teste.

A quantidade de solução de óvulo deve conter 2000 óvulos/mL, sendo que a quantidade máxima de solução de óvulo dispostas nos frascos não excedeu a 100 $\mu$ l para não diluir a amostra.

Após 20 minutos acrescentou-se os óvulos, os frascos foram levemente agitados por 20 minutos com a finalidade de facilitar a fecundação. Em seguida o teste foi encerrado, transferindo o conteúdo de cada réplica para frascos devidamente identificados, contendo formol a 4% tamponada com bórax (borato de sódio) conforme Figura 9. Onde posteriormente foram contadas em microscópio óptico.



**Figura 9.** Finalização do ensaio com preservação dos ovos em formol tamponado.

O efeito observado é a formação da membrana de fecundação (Figura 10) nos óvulos após a fertilização. Este teste é chamado de agudo, uma vez que avalia a sobrevivência e mobilidade do esperma em chegar e fecundar o óvulo após um período de exposição ao contaminante. O espermatozóide por atração bioquímica percorre o caminho em direção ao gradiente de hormônio que determina o local onde o óvulo se encontra. Quando há contaminantes que atrapalhem ou interfiram nos sinais químicos, ou mesmo causem a letalidade dos gametas masculinos, estes não têm a capacidade de encontrar o óvulo, ou mesmo penetrar na membrana vitelínica, concretizando assim o processo de fecundação com a entrada de água entre a membrana plasmática e vitelínica como controle da polispermia.



**Figura 10.** Demonstração de óvulo de *L. variegatus* (esquerda) e ovo (direita).

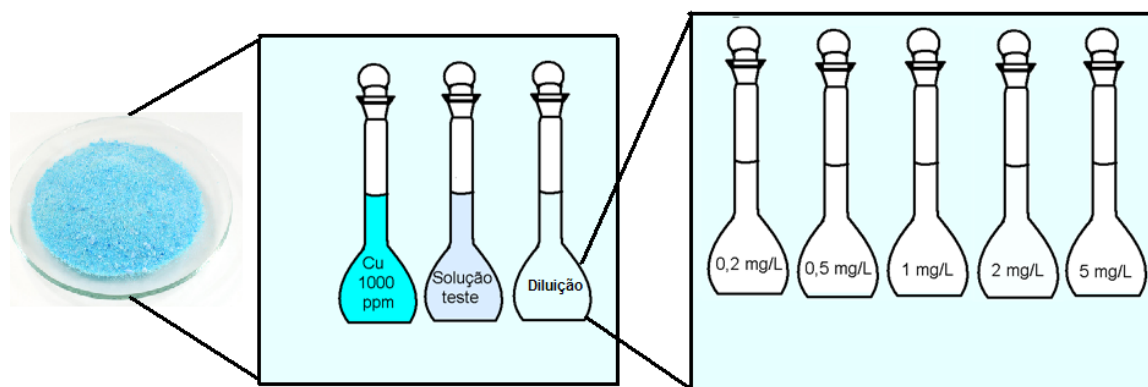
As concentrações utilizadas no teste com o sobrenadante extraído do light-stick foram determinadas após um teste preliminar, portanto as concentrações do teste definitivo foram: 0,002; 0,003; 0,005; 0,01 e 0,02%. Um resumo das condições de manutenção e teste com gametas de ouriço-do-mar da espécie *L. variegatus* está descrito na tabela 1.

**Tabela 1.** Resumo das condições gerais de manutenção e dos testes de toxicidade com *L. variegatus* (PROSPERI; ARAUJO, 2002 com modificações).

Condições-teste	Recomendações
Água de diluição	Água do mar natural
Temperatura	25 +/- 2°C
Salinidade	34 +/- 2
Tamanho do frasco-teste	> 10 mL
Volume da solução-teste	10 mL
Nº de soluções-teste	Mínimo de 5 e 1 controle
Nº de réplicas por concentração	Mínimo de 3 para todas as soluções
Duração do teste	40 minutos
Efeito observado	Gametas não fecundados
Critério de aceitação do teste	Mínimo de 70% de fecundação no controle
Expressão do Resultado	CE50; 40 min

#### 4.6.3. Carta-controle *Lytechinus variegatus* – lote: Ilha das Palmas/SP.

A substância de referência utilizada neste estudo foi o cobre. Para a realização dos testes foi preparada uma solução estoque de 1000 ppm. Para determinação dos valores das concentrações-teste foi feito um ensaio preliminar para estabelecer um intervalo de soluções-teste a ser utilizado no ensaio definitivo. Para o preparo das diluições das amostras emprega-se a razão 10, estabelecendo ao final do ensaio a faixa de concentração que causa impedimento da fecundação de 50% das células de ouriço-do-mar. Dessa forma, a partir do ensaio preliminar extraiu-se 5 concentrações-testes: 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 mg/L Cu – Figura 11.



**Figura 11.** Esquema de diluições para a execução dos ensaios com substância de referência para a produção da carta-controle. Fonte: Helena Costi Rosa.

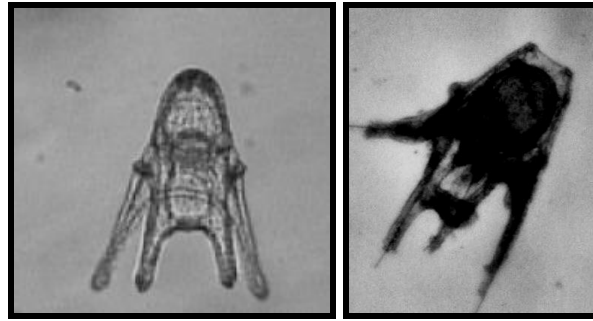
Foram utilizado 3 réplicas para cada concentração. Seguido de um controle contendo água do mar, para a comparação dos resultados obtidos. Em cada frasco teste, foram adicionadas 10 ml da solução. Após a execução de 10 testes foram calculados a média (CE50~40 min.) e os limites superior e inferior de sensibilidade.

#### **4.6.3. Teste crônico com embriões de *L. variegatus* e *E. lucunter*.**

Para provocar à fecundação e expor os ovos as concentrações de light-stick, foi adicionado cerca de 2 ml de solução espermática em um béquer de 600ml contendo os óvulos, esta solução foi agitada e aguardou-se um período de 15 minutos para que ocorresse a fecundação. Após esse período foram feitas contagens em câmaras de Sedgewick-Rafter para verificar porcentagem de fecundação que deveria ser superior 80%, após certificar que os ovos estavam saudáveis pelo seu arredondamento e alta taxa de fecundação foi adicionada cerca de 400 ovos por frasco teste, em um volume de no máximo 100 µl para não diluir as concentrações.

Para cada concentração utilizou-se de 3 réplicas, e um controle com água do mar natural da Laje de Santos, isenta de contaminantes, com salinidade 34. Os embriões foram deixados em exposição por 24-28 h no caso do *L. variegatus* e 36-40 h no caso do *E. lucunter*, tempo necessário para que os embriões atingissem o estágio de larva *pluteus*. O teste foi mantido com temperatura constante de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e foto-período de 12h/12h. As concentrações utilizadas para os ensaios crônicos foram de 0.002, 0.003, 0.01, 0.02, 0.1 e 1.0% (CESAR-RIBEIRO & PALANCH-HANS *in press*). Após ter atingindo o estágio *pluteus*, o conteúdo de cada tubo foi transferido para frascos de plásticos contendo 100µl de formol tamponada com bórax (borato de sódio).

Para a leitura do teste em microscópio, foram analisadas sub-amostras de 1 ml, observando os 100 primeiros organismos. Sendo assim, os embriões que atingiram o estágio de larva *pluteus* são considerados bem desenvolvidos, já aqueles que apresentaram retardamento no crescimento ou alterações morfológicas são considerados não desenvolvidos (Figura 12).



**Figura 12.** Demonstração da larva *pluteus* de *E. lucunter* normal (esquerda) e anormal com mutações (direita).

Após a execução dos ensaios os organismos, cuja indução de liberação gamética foi feita com choque elétrico, eram mantidos no laboratório e separados entre machos e fêmeas (Figura 13) para execução de outros ensaios, onde eram mantidos a temperatura controlada no laboratório e alimentados com *Ulva sp.*, alfaces e cenouras. Os organismos que eram induzidos por choque osmótico, devido ao grande estresse causado muitas vezes não sobreviviam, sendo então refrigerados gradativamente para a redução do metabolismo e posterior morte.



**Figura 13.** Exemplos de *E. lucunter* induzidos com choque elétrico aguardando a liberação dos gametas para separar entre machos e fêmeas.

#### **4.6.3.1. Teste com substância de referência**

Foram desenvolvidos testes com substância de referência em cada espécie testada para verificar a sensibilidade dos lotes, sendo utilizado DSS (dodecil sulfato de sódio) para o teste com desenvolvimento embrio-larval de *L. variegatus* e *E. lucunter*. Nas seguintes concentrações: 0,1; 0,5; 1; 2,5; e 5 mg/L DSS.

#### **4.6.3.2. Teste com Light-stick diluído em Etanol**

Após um teste preliminar foram extraídas as concentrações-teste e foi desenvolvido um ensaio definitivo, o qual teve duração de 24 horas, sendo preparadas 4 réplicas para cada concentração, as concentrações escolhidas foram 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005 e 0.0001% de light-stick diluído em Etanol. Para que não houvesse interpretação errônea devido à toxicidade do solvente utilizado (etanol), como já dito foram feitos controles com água do mar limpa e em concentrações de 5, 2.5 e 1% de etanol. O efeito observado para verificação da toxicidade foi o retardamento e/ou deformação das larvas pluteus do ouriço-do-mar. Embora no ambiente quando os tubos abrem não exista um solvente como o Etanol, ou outros muitas vezes utilizados (ex.: DMSO), é importante que sejam avaliados os efeitos causados quando o líquido entra em contato com a água e se houvesse uma diluição completa, porém não é possível utilizar o teste com solvente como base para explicar a toxicidade no ambiente aquático, pois apenas parte dos contaminantes têm afinidade com a água e são estes que causarão os efeitos deletérios a biota.

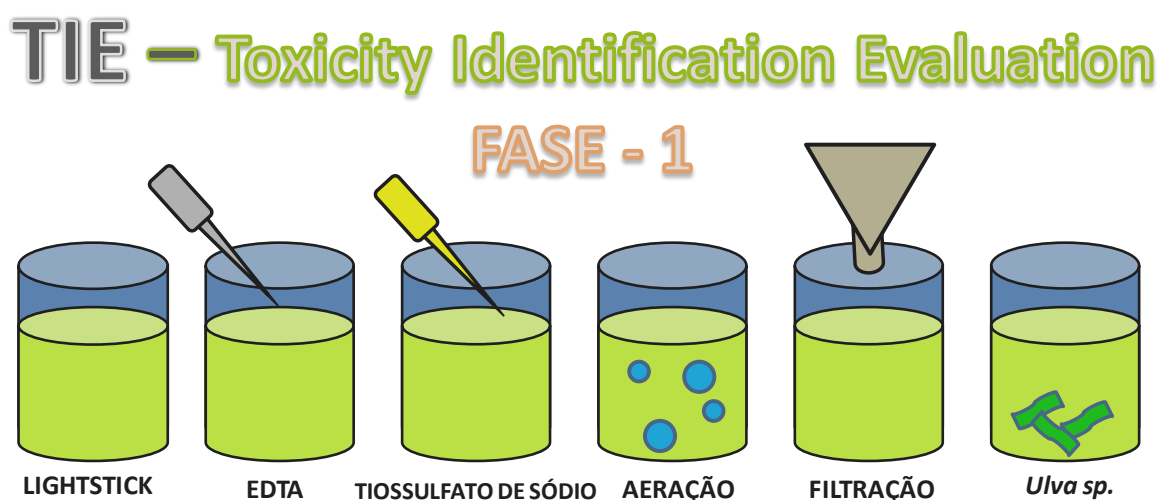
#### **4.7. TIE (Toxicity Identification Evaluation) – Fase I**

A TIE (Toxicity Identification Evaluation) ou como é chamada algumas vezes no Brasil AIT (Avaliação e Identificação da Toxicidade) tem como objetivo isolar e identificar as substâncias tóxicas responsáveis pela toxicidade de efluentes, corpos d'água, águas intersticiais e sedimentos, sendo parte integrante dos protocolos de redução de toxicidade. Métodos TIE combinam a quantificação da toxicidade com a identificação e confirmação de uma ou mais substâncias e/ou classe de substâncias responsáveis pela toxicidade total de uma amostra.

A fase I tem como objetivo caracterizar a natureza físico-química dos compostos da amostra responsáveis pela sua toxicidade, através de manipulações ou tratamentos químicos e de testes de toxicidade. Frações dessa amostra podem ser submetidas aos seguintes tratamentos físico-químicos: ajustes de pH, o qual pode afetar a especiação de substâncias, como  $S^{2-}$ ,  $CN^-$  e  $NH_4^+$ ; adição de agente quelante, o qual se complexa a íons metálicos, como  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ ; extração em fase sólida com coluna C18, a qual remove compostos orgânicos apolares, como

pesticidas e COVs (Compostos Orgânicos Voláteis); adição de tiosulfato de sódio, o qual reduz espécies oxidantes, tais como  $\text{Cl}_2$  e  $\text{Cr(VI)}$ ; filtração, a qual remove partículas suspensas e substâncias cuja solubilidade é afetada pelo pH do meio; e outros. Testes de toxicidade aquática são realizados antes e após cada manipulação, o que permite avaliar a eficácia de cada tratamento e obter informação sobre a natureza das substâncias tóxicas. Após a fase I, fica claramente definida a classe ou classes de substâncias responsáveis pela toxicidade total da amostra. A identificação de substâncias tóxicas é um passo fundamental para compreender as causas da toxicidade de amostras complexas, bem como para removê-las ou reduzir suas concentrações para níveis aceitáveis. (COSTA *et al.* 2008).

Para avaliar os possíveis compostos que causam o efeito tóxico dos lightsticks, foi aplicado à fase I do TIE (Toxicity Identification Evaluation). A metodologia utilizada nas manipulações foi desenvolvida segundo Badaró-Pedroso (1999), sendo feitos os seguintes procedimentos: adição 30  $\mu\text{L}$  de EDTA (2,5% m/v) em cada frasco teste para quelar os metais divalentes, aguardando um período de 3 horas antes do início do ensaio para a completa reação e complexação, adição 50  $\mu\text{L}$  de Tiosulfato de Sódio (1,5% m/v) em cada frasco teste para redução de oxidáveis em um período de 1 hora, aeração por 1 hora para eliminar compostos voláteis, filtração em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  para remover material em suspensão, e adição de 5g *Ulva sp.* por 60 ml de amostra durante 4 horas a 20°C para remoção de compostos nitrogenados, como a amônia (Figura 14).



**Figura 14.** Representação esquemática das manipulações executadas com Lightstick na fase I do TIE.



Para a execução deste procedimento foi utilizado o teste crônico de curta duração com ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, conforme já descrito método, uma vez que este respondeu de maneira sensível aos compostos presentes no light-stick. A concentração de baseline foi de 0,1% do Sobrenadante, sendo utilizados 4 réplicas por manipulação.

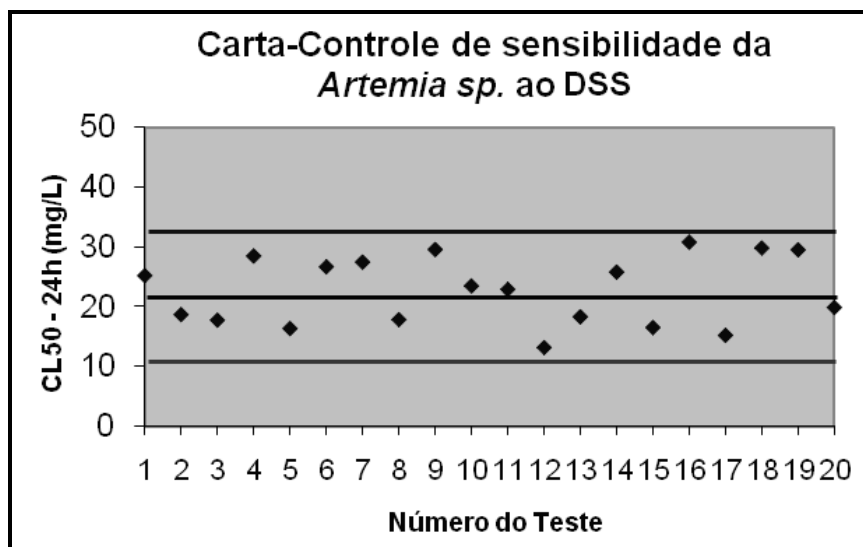
#### **4.8. Análises Estatísticas**

Foi utilizado o modelo estatístico “Trimmed Spearman-Kärber” (HAMILTON *et al.*, 1977) para o cálculo da CL50 (concentração letal a 50% dos organismos) e CE50 (concentração efetiva a 50% dos organismos). Para verificar possíveis diferenças mínimas significativas (DMS) nas análises de variância pelo teste de Dunnett’s e de Tukey foi usado o programa estatístico TOXSTAT 3.5.

## **5. RESULTADOS**

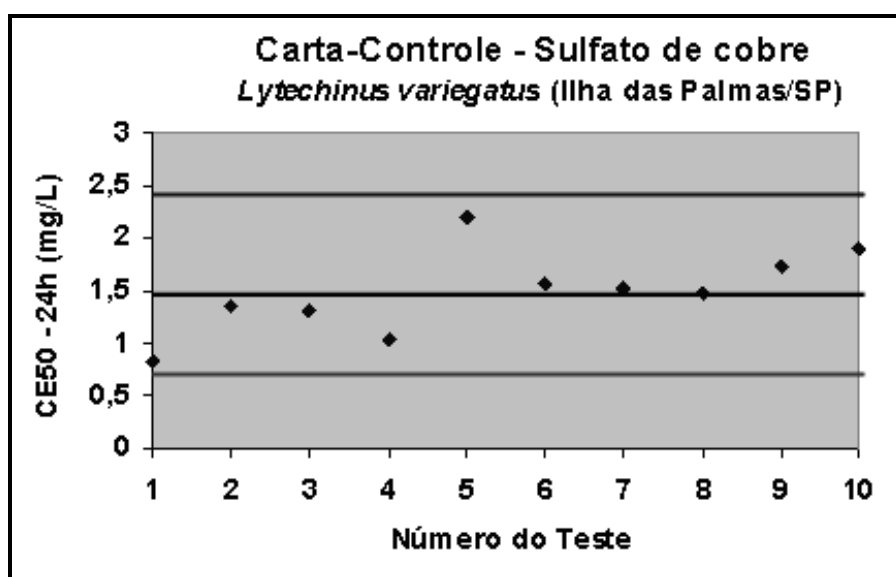
### **5.1 Substâncias de Referência e Cartas-Controle**

Conforme a Figura 15, o valor da CL50; 24h estimado pela carta-controle para testes agudos com *Artemia sp.* quando exposto ao DSS foi de  $22,68 \pm 5,62$  mg/L DSS, sendo possível comparar com os valores encontrados por VEIGA *et al.* (1989):  $22,0 \pm 4,45$  mg/L LSS e PRÓSPERI 1993:  $22,05 \pm 3,89$  mg/L DSS. Os limites de aceitabilidade foram calculados e estiveram entre 11,44 a 33,92 mg/L DSS. O coeficiente de variação da CL50 dos 20 testes foi de 24,78%, ou seja, dentro dos limites recomendados pela ENVIRONMENT CANADA (1992). Demonstrando que o lote de organismos estava em uma faixa de sensibilidade aceitável e comparável, demonstrando que os testes executados pelo laboratório com este organismo possuem repetibilidade e são confiáveis.



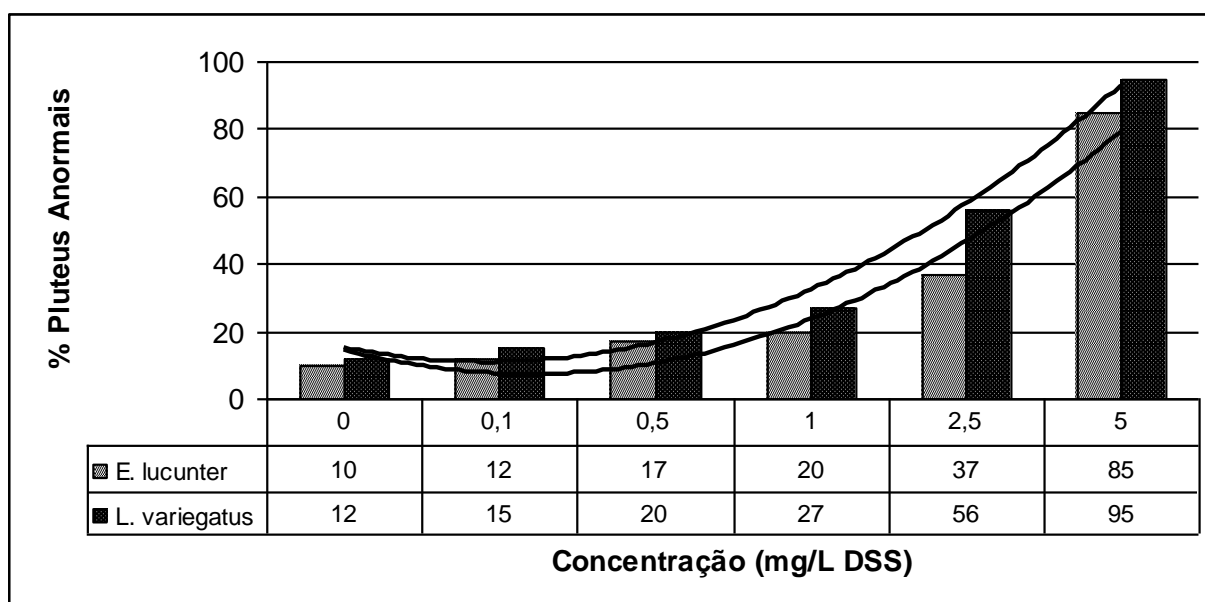
**Figura 15.** Carta-Controle – *Artemia sp.* exposto ao DSS (linha central demonstra a média e as linhas laterais os limites de aceitabilidade).

Na Figura 16 está expressa a carta-controle de sensibilidade do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (Ilha das Palmas/SP) a substância de referência: Sulfato de Cobre, no teste com gametas. Com os 10 testes executados o valor médio da CE50 ~ 40 min. foi de  $1,49 \pm 0,40$  mg/L Cu. Os limites de aceitabilidade estiveram entre 0,69 e 2,29 mg/L Cu e o coeficiente de variação foi de 26,88%, ou seja, dentro do estabelecido. Demonstrando novamente repetibilidade e confiabilidade dos bioensaios com gametas de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, coletados nas proximidades da Ilha das Palmas em Santos/SP.



**Figura 16.** Carta-Controle – *Lytechinus variegatus* (teste agudo) - Sulfato de Cobre. (linha central demonstra a média e as linhas laterais os limites de aceitabilidade).

A Figura 17 demonstra o teste com substância de referência DSS para os ensaios crônicos de curta-duração com embriões de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter*. O valor encontrado da CE50-24h para *L. variegatus* foi de 2,07 mg/L DSS (limites: 1,81 – 2,36 mg/L DSS) e a CE50-36h para *E. lucunter* foi de 3,09 mg/L DSS (limites: 2,73 – 3,5 mg/L DSS), valores comparáveis aos encontrados Resgalla & Laitano (2002) que encontrou CE50 em torno de 2,0 - 3 mg/L DSS para as duas espécies avaliadas, o que demonstra que o lote está com sensibilidade comparável a outros laboratórios, o que valida os ensaios executados com estes organismos.



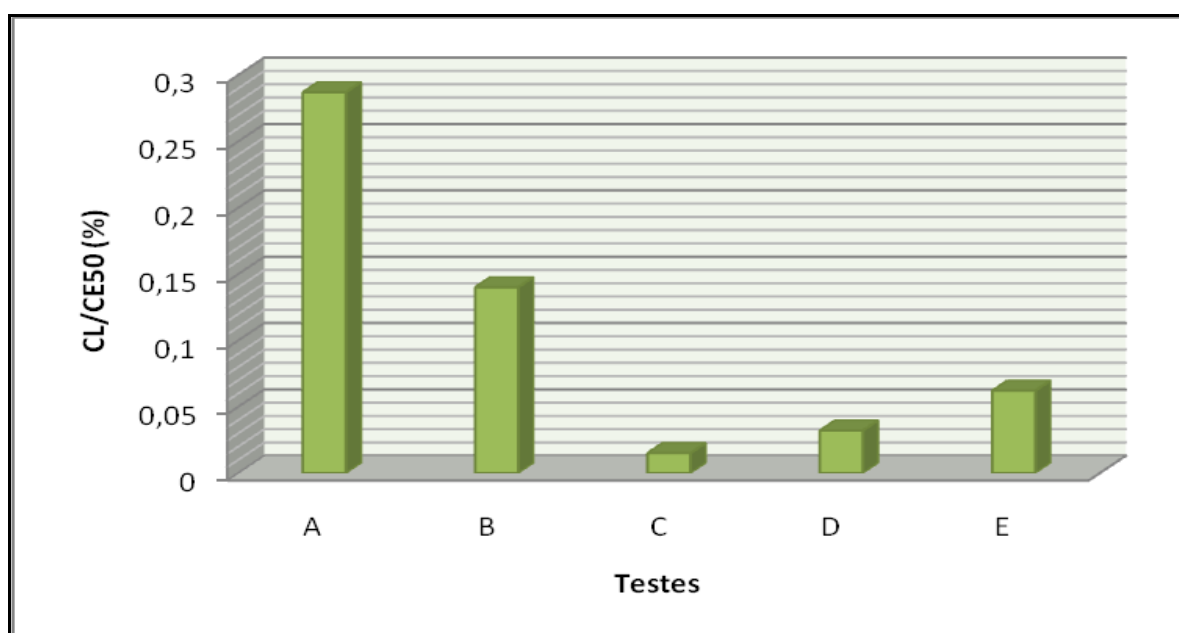
**Figura 17.** Testes com substância de referência: DSS - Desenvolvimento embriológico de ouriço-do-mar *L. variegatus* e *E. lucunter*.

## 5.2 Testes com Light-stick

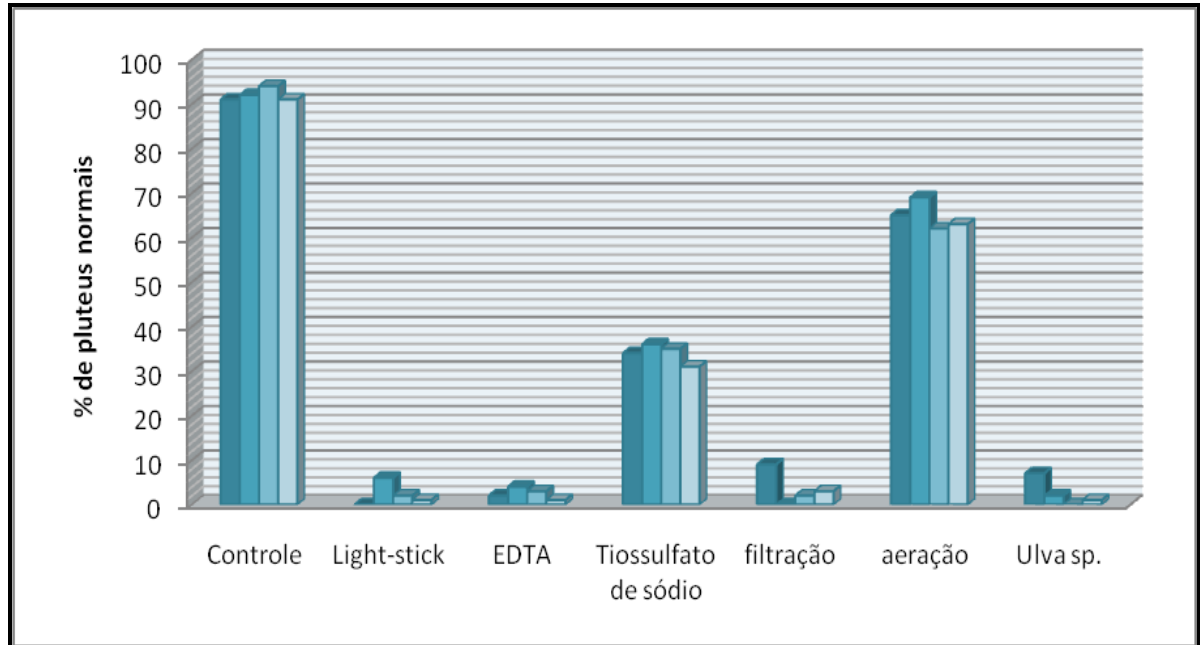
Conforme a Figura 18 para o teste com artêmia a CL50 – 24 h e 48 h foi de 0,287% e 0,14%, respectivamente. Para o teste com desenvolvimento embriológico de ouriço-do-mar *E. lucunter* a CE50- 36 h foi de 0,062%, para o teste com gametas de ouriço-do-mar *L. variegatus* a CE50 foi de 0,0141%, para o teste com desenvolvimento embriológico de *L. variegatus* a CE50-24 h foi de 0,0285%, conforme encontrado em Cesar-Ribeiro & Palanch-Hans (*in press*). Demonstrando uma grande capacidade depurativa no ambiente quando o líquido contido no light-stick extravasa, necessitando de medidas corretivas para o seu recolhimento.

Através da aplicação da fase I do TIE (Figura 19) com as análises estatísticas do programa TOXSTAT 3.5 foi possível verificar diferença mínima significativa em relação ao controle de todos os tratamentos pelos testes de Dunnett's e Tukey, porém em comparação ao light-stick os tratamentos de tiosulfato e aeração diferiram significativamente, podendo identificar compostos oxidáveis como peróxido de hidrogênio removidos pelo tiosulfato de sódio e voláteis removidos na aeração como alguns HPA's presentes em sua constituição como os possíveis responsáveis pelos efeitos tóxicos.

Foi possível observar que o etanol foi tóxico até a concentração de 1 %, havendo a necessidade de se excluir algumas concentrações mais elevadas, pois estas podem representar falsos positivos gerados pelo solvente utilizado. Foi feito o cálculo da CE50-24h para o light-stick chegando a concentrações de 0,000673 ou  $6,73 \times 10^{-4}$  % variando de  $6,51 \times 10^{-4}$  a  $6,95 \times 10^{-4}$  %. Demonstrado que o líquido contido no light-stick é extremamente tóxico.



**Figura 18.** Concentração Letal e/ou Efetiva 50% encontrado para testes com diferentes organismos. A- *Artemia sp.* agudo 24h; B- *Artemia sp.* agudo 48h; C- *Lytechinus variegatus* agudo  $\approx$ 40 minutos; D- *Lytechinus variegatus* crônico 24 - 28h; E- *Echinometra lucunter* crônico 36h.



**Figura 19.** Resultados da fase I do TIE com embriões (pluteus) de *L. variegatus*, com os diferentes tratamentos e suas respectivas réplicas (n=4) em comparação ao controle.

## 6. DISCUSSÃO

Através dos dados apresentados é possível demonstrar que o líquido contido nos atratores de coloração laranja disponibiliza contaminantes na água quando abertos e que estes causam efeitos deletérios em todos os bioensaios executados, porém com maior efeito sobre o ouriço-roxo *L. variegatus* que foi à espécie mais sensível aos testes com os atratores tanto no ensaio com desenvolvimento embrio-larval como no teste com gametas (CESAR-RIBEIRO & PALANCH-HANS *in press*).

Através da fase I do TIE foi possível identificar os possíveis causadores da toxicidade como os oxidáveis e os voláteis, havendo a necessidade da execução das outras fases do TIE para detectar e quantificar os compostos responsáveis pelo efeito tóxico.

O peróxido de hidrogênio que representa cerca de 30% da constituição do light-stick possivelmente foi um dos causadores da toxicidade, devido este ser uma espécie reativa de oxigênio (ERO), causa efeitos oxidativos a nível celular e supramolecular (STOREY, 1996), aumenta a atividade enzimática das peroxidases que catalisa a redução dos peróxidos (ULIANA *et al.*, 2008), causando um gasto energético que tem como consequência o retardamento do desenvolvimento das larvas pluteus do ouriço-do-mar. O efeito crônico do peróxido de hidrogênio já foi avaliado para cladóceros (MEINERTZ *et al.*, 2008) demonstrando sua atividade xenobionte.

Compostos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes na constituição do líquido podem ter sido os responsáveis pelo efeito tóxico, devido sua capacidade sub-carcinogênica e mutagênica (BOFFETTA *et al.*, 1997; WHO, 1988), dificultando e interferindo em processos essenciais como replicação, transcrição e tradução, o que pode causar a deformação das larvas, ou até apoptose e necrose celular.

A presença de derivados de ácido salicílico, que é utilizado como antiinflamatório e analgésico, mas que possui caráter antimicrobiano e inseticida (KUBO *et al.*, 1991; STUART *et al.*, 2000), pode ter causado parte do efeito tóxico, embora esse composto seja parcialmente solúvel em água, demonstrando que

não foi totalmente disponibilizado na fração aquosa, pode ter contribuído para a deformação e/ou não desenvolvimento dos embriões.

O solvente da solução do light-stick: di-n-butilftalato pode ser apontado como responsável por grande parte do efeito tóxico, embora não seja muito solúvel em água, em pequenas concentrações já causa em seres humanos quando em contato com a pele efeitos como irritação, queimaduras e coceiras; não possui caráter carcinogênico, porém quando ingerido causa irritação no trato gastrointestinal, náuseas, vômitos, diarreia, dor de cabeça e fraqueza (WILLIAMS & BLANCHFIELD, 1975; TOMITA *et al.*, 1977; KAWANO, 1980; SCOTT *et al.*, 1987; ELSISI *et al.*, 1989). Representando um grande alerta a população local da Costa dos Coqueiros/BA sobre a utilização do light-stick na pele; como medicamento para a cura de enfermidades; e para os casos de crianças que acabaram ingerindo o líquido do tubo, confundindo com alimento. Em testes com organismos aquáticos o di-n-butilftalato demonstra toxicidade elevada no teste de Microtox (TARKPEA *et al.*, 1986), para algas de água doce e dinoflagelados marinhos (WILSON *et al.*, 1978; YOSHIOKA *et al.*, 1985; O'CONNOR *et al.*, 1989); e para microcrustáceos marinhos como misidáceos, artêmias, anfípodas e copépodos harpacticóides (MAYER & SANDERS, 1973; LINDÉN *et al.*, 1979), representando uma alta capacidade depurativa no ambiente.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A ONG Global Garbage vem desenvolvendo um trabalho de muita importância com a conscientização da população residente nas vilas litorâneas do estado da Bahia em relação ao contato com light-stick, uma vez que estes contêm xenobiontes capazes de causar sérios problemas à saúde;
- Os organismos marinhos utilizados nos ensaios responderam de maneira eficiente na identificação da toxicidade uma vez que foram sensíveis aos compostos em concentração baixíssimas, podendo-se ressaltar que a utilização das artêmias em ensaios, embora sejam menos sensíveis que os ouriços possuem um fácil manuseio e cultivo,

não têm toxicidade significativamente variável na carta-controle, expõem resultados rápidos, o que auxilia em monitoramentos uma vez que podem ser desenvolvidos ensaios constantemente sem degradar o ambiente coletando organismos de seu habitat, portanto recomenda-se sua utilização em casos que seja necessário respostas rápidas, ou que queira-se saber a faixa de concentração para testes com outros organismos, ou na avaliação de elementos químicos e/ou extratos vegetais, visto que estes organismos tem respondido bem a esse tipo de ensaio;

- No entanto os ouriços-do-mar responderam melhor que as artêmias, com resultados mais precisos, em testes que avaliam efeitos crônicos de deformação das larvas, ou agudos de fertilização que demonstram maior sensibilidade em monitoramentos e na identificação da toxicidade de elementos, amostras e efluentes. A espécie *L. variegatus* foi mais sensível nos ensaios com light-stick em comparação ao *E. lucunter*, porém não é recomendável generalizar que um ouriço é mais sensível que o outro, uma vez que para certos contaminantes o ouriço pindá *E. lucunter* responde com mais sensibilidade e repetibilidade nos ensaios;
- A contagem de larvas normais e anormais em testes com ouriços-do-mar, embora rápida e eficaz, poderia ser modificada por uma metodologia de contagem diferencial, observando em qual fase os organismos se encontram para pontuar os efeitos tóxicos, uma vez que alguns compostos não tão tóxicos permitem um desenvolvimento da larva, porém retardado, e outros compostos muito tóxicos não permitem que a larva saia da fase de mórula ou mesmo não permite qualquer clivagem, portanto uma contagem diferencial analisada estatisticamente facilitaria a identificação e avaliação da toxicidade;
- O uso do teste agudo com gametas de ouriço-do-mar, embora não seja muito difundido no Brasil, é uma ferramenta importante para monitoramentos e identificação de toxicidade de elementos, efluentes e amostras ambientais, devido à rapidez e alta sensibilidade dos ensaios. Embora o *E. lucunter* não possa ser utilizado neste tipo de



ensaio, pela dificuldade de se observar a membrana de fecundação, o ouriço *L. variegatus* pode ser utilizado com grande eficiência. Porém deve se tomar cuidado na execução de ensaios com espécie citada, visto que esta já entrou na lista de espécies ameaçadas de extinção, sendo recomendável o uso de técnicas menos estressantes de extração dos gametas para que os organismos possam ser devolvidos para o ambiente e/ou reutilizados após recuperação;

- A execução de ensaios com outras espécies marinhas de outros níveis tróficos e comunidades seria importante na complementação deste estudo, como: algas (*Skeletonema cf. costatum*), misidáceos (*Mysidopsis gracilis* e *M. juniae*), larvas de mexilhões e ostras (*Perna perna* e *Crassostrea rizophorae*, respectivamente), bem como a fertilização do sedimento com light-stick para ensaios com amostras de sedimento integral com copépodos epibentônicos (*Nitokra sp.*) e anfípodas (*Tiburonella viscana*), ou mesmo teste de Ames para verificar mutagenicidade a bactéria *Salmonella typhimurium*.
- A utilização de um solvente na identificação da toxicidade do light-stick, embora não represente o real efeito no ambiente, demonstrou uma toxicidade extremamente elevada do light-stick que em concentração mínimas já causou a deformação e/ou não desenvolvimento das larvas do ouriço avaliado. Sendo interessante a utilização de outros solventes como metanol, acetona e até o dimetilsulfóxido (DMSO) muito utilizado como solvente de compostos para testes de toxicidade;
- Análises químicas em HPLC, ou GC-MS seriam importantes na complementação deste estudo, embora já tenham estudos dizendo a composição dos light-sticks, não se sabe o quanto são disponibilizados para a coluna d'água na fração sobrenadante, ou na eluição em etanol e outros solventes, havendo a necessidade da complementação do TIE com as fases II e III, para que se saiba quais compostos são disponibilizados e quais os efeitos deletérios causados por eles;

- A fase I do TIE respondeu de maneira satisfatória na identificação dos grupos de compostos causadores da toxicidade, porém seria interessante que fosse utilizado a coluna de C18 para a remoção dos HPA's para verificar se estes foram os principais causadores da toxicidade, e se fosse comprovado tal, já que estes são os catalisadores da reação, poderia ser estudada a possibilidade de mudar a constituição dos light-sticks para outro catalisador menos deletério ao ambiente.
- Com a criação de um programa Nacional do Lixo Marinho, será possível a captação de investimento para o desenvolvimento de estudos relacionados ao tema, ampliando o número de pessoal técnico-científico especializado na área, trocando informações sobre métodos de avaliação, degradação e monitoramento do lixo nas praias a fim de minimizar os efeitos adversos provocados pelos rejeitos sólidos (micro e macrolixo) sobre a megafauna, além do transporte de espécies invasoras transportadas pelo lixo, contaminação por light-sticks, bioacumulação por ingestão de PCB's, DDT's, HPA's e outros aderidos e adsorvidos aos nibs (*pellets*). Aumentando assim a conscientização da população de que o lixo deve ser armazenado e tratado de maneira eficiente, podendo muitas vezes ser reciclado e não despejado em rios e praia, pois dependemos direta e indiretamente dos corpos hídricos seja por lazer, subsistência, navegação e etc.
- Portanto é necessário que seja feito o controle do lançamento desses light-sticks nos oceanos, pois quando estes chegam às praias podem causar problemas de intoxicação na população, havendo a necessidade de projetos de educação ambiental com os nativos para o recolhimento e não utilização dos atratores, além de um programa de monitoramento do lixo marinho, para impedir o lançamento desses sinalizadores e outros resíduos pelos navios e pela população nos oceanos, pois estes causam efeitos adversos à biota marinha.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABESSA, D. M. S. Avaliação da qualidade de sedimentos do sistema estuarino de Santos, SP, Brasil. **Tese de Doutorado**. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. p.01-04, 2002.
- ACEY, R.; HEALY, P.; UNGER, T.F.; FORD, C.E.; HUDSON, R.A. Growth & aggregation behavior of representative phytoplankton as affected by the environmental contaminant di-n-butyl phthalate. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.39, p.1-6, 1987.
- AMORIM, A.F. & ARFELLI, C.A. Estudo biológico-pesqueiro do espadarte, *Xiphias gladius* Linnaeus, 1758, no Sudeste e Sul do Brasil, (1971 a 1981). **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v.11, p 35-62, 1984.
- AMORIM, A.F.; ARFELLI, C.A.; FAGUNDES, L. Pelagic elasmobranchs caught by longliners off southern Brazil during 1974-97: An overview. **Marine and Freshwater Research**, CSIRO, Collingwood, v.49 p.621-32, 1998.
- ANDRADY, A. L. Plastics in the environment. In **Plastics in the environment** (ed. A. L. Andrady), p. 762. New Jersey, NJ: John Wiley & Sons, 2003
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13373. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – **Método de ensaio com *Lytechinus variegatus*** (Echinodermata: Echinoidea). Projeto 00:001.44-003. Rio de Janeiro, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Ecotoxicologia aquática – **Toxicidade aguda – Métodos de ensaio com peixes**. Rio de Janeiro, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT.NBR 15088. Ecotoxicologia aquática – **Toxicidade aguda – Métodos de ensaio com peixes**, 2004.

AZEVEDO, V.G.; KOTAS, J.E.; DOS SANTOS, S. A pesca de espinhel de superfície (“Longline”) na região Sudeste-Sul- ano 1998. Relatório anual técnico-científico. **Programa REVIZZE** - Score Sul. Itajaí, SC, 1999.

AZZARELLO, M.Y.; VLEET, E.S.V. Marine birds and plastic pollution. **Marine Ecology** – Progress Series. v.37, p. 295-303, 1987.

BADARÓ-PEDROSO, C. Toxicidade crônica de amostras ambientais do canal de São Sebastião e de substâncias puras a *Mysidopsis juniae* (CRUSTACEA: MYSIDACEA). **Dissertação de Mestrado**. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. p.01, 1993.

BADARÓ-PEDROSO, C. Avaliação dos efeitos e identificação da toxicidade da água de produção de petróleo sobre algumas espécies de organismos marinhos. São Carlos. 230p. **Tese de Doutorado** - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1999.

BAGATTINI, R.; SOUZA, C.B. de ; TOMA, I.N. ; MASCIO, P. di ; MEDEIROS, M.H.G. de ; BECHARA, E. ; LOUREIRO, A.P. de M. Toxicidade do conteúdo de atratores luminosos (light-sticks) a nível celular. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 2006. v. 42, p. 70-70, 2006.

BIRGE, W. J.; BLACK, J. A.; WESTERMAN, A.G. Short-term fish and amphibian tests for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents. ***Environment Toxicology and Chemistry***, 49: 808-810, 1985.

BOFFETTA, P.; JOURENKOVA, N. & GUSTAVSSON, P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. ***Cancer Causes & Control***, v.8, p.444-472, 1997.

BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ***Bull. Environ. Contam. Toxicol.***, 73, 878, 2004.

CESAR-RIBEIRO, C. ; PALANCH-HANS, M. F. Chronic toxicity test with sea urchin *Echinometra lucunter* and *Lytechinus variegatus* (ECHINODERMATA: ECHINOIDEA), exposed to Light-stick - flag pasternoster used for fishing surface longline. ***Brazilian Journal of Oceanography*** (in press), 2010.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Relatório de qualidade de águas interiores do estado de São Paulo. p. 371, 2001.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB); ***Norma técnica L5.021***, *Água do mar – teste de toxicidade aguda com Artemia: método de ensaio*, São Paulo, 1991.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB), *Água: Teste de toxicidade aguda com peixes – parte I – sistema estático*,

**L5.019**, 1990.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA 357**. Brasília, DF: SEMA, 2005.

CONNELL, D.W., & MILLER, G.J. **Chemistry and Ecotoxicology of Pollution**. John Wiley & Sons, N.Y., 1984.

COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R. & ESPINDOLA, E. L. G.. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quím. Nova.**, vol.31, n.7, pp. 1820-1830, 2008.

DOMINGUES, D.F. & BERTOLETTI E. Seleção, Manutenção e Cultivo de Organismos Aquáticos. In.: ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática**. p.154-177, 2008.

ELSISI, A.E.; CARTER, D.E.; SPIES, I.G. Dermal absorption of phthalate diesters in rats. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v.12(1), p.70-77, 1989.

ENVIRONMENT CANADA. Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. **Report EPS 1/RM/12**. 85 p, 1990.

ENVIRONMENT CANADA. Biological test method: acute test for sediment toxicity using marine or estuarine amphipods. **Report EPS 1/RM/26**. Environment Canada, Ottawa, 1992.

FURNESS, R.W. Ingestion of plastic particles by seabirds at Gough Island, South Atlantic Ocean. **Marine Pollution Bulletin**. v.14, p. 307-308, 1985.

- HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C., THURSTON, R.V. Trimmed Spearman–Karber: method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. ***Environ. Technol.*** v. 11, p. 714, 1977.
- IVAR DO SUL, J.A., COSTA, M.F. Marine debris review for Latin America and the Wider Caribbean Region: From the 1970s until now, and where do we go from here? ***Mar. Pollut. Bull.*** p 01-18, 2007.
- IVAR DO SUL, J.A., RODRIGUES, O., SANTOS, I.R., MATTHIENSEN, A., FILLMANN, G. Skin irritation and histopathologic alterations in rats exposed to lightstick contents, UV radiation and seawater. In: Proceedings of the Fifth International Conference on ***Marine Pollution and Ecotoxicology***, vol. 1, Hong Kong, p. 75, 2007.
- KAWANO, M. Toxicological studies on phthalate esters. 1. Inhalation effects of dibutyl phthalate (DBP) on rats. ***Jpn J Hyg***, v.35, p. 684-692, 1980.
- KNIE, J.L.W. & LOPES, E.W.B. Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações – Florianópolis/SC., 2004.
- KUBO, I.; HIMEJIMA, M. Anethole, a synergist of polygodial against filamentous microorganisms. ***Journal Agriculture Food Chemistry***, v.39, p. 2290-2292, 1991.
- LINDÉN, E.; BENGTSSON, B.E.; SVANBERG, O.; SUNDSTRÖM, G. The acute toxicity of 78 chemicals and pesticide formulations against two brackish water organisms, the bleak (*Alburnus alburnus*) and the harpacticoid (*Nitocra spinipes*). ***Chemosphere***, v.8(11/12), p.843-851, 1979.

- MASCARENHAS, R.A., SANTOS R.A., ZEPPELINI, D.. Plastic debris ingestion by sea turtle in Paraíba, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 49, 354–355, 2004.
- MASTROTI, R.R. Testes de toxicidade com gametas de ouriço-do-mar (Fertilização). In: NASCIMENTO, I. A; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (eds.), *Métodos em Ecotoxicologia Marinha. Aplicações no Brasil*. Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo, p. 91-97, 2002.
- MAYER, F.L. Jr. & SANDERS, H.O. Toxicology of phthalic acid esters in aquatic organisms. *Environ. Health. Perspect.*, v.3, p.153-157, 1973.
- MEINERTZ, J. R.; GRESETH, S. L.; GAIKOWSKI, M. P.; & SCHMIDT, L. J. Chronic toxicity of hydrogen peroxide to *Daphnia magna* in a continuous exposure, flow-through test system. *Science of the Total Environment* v. 392, p. 225-232, 2008.
- NETO, José M. da Costa; VASCONCELOS, Mônica Q.; ROSA, Sulia S.; BARROS, Taíssa V. S.. Lixo marinho em área de reprodução de tartarugas marinhas no Estado da Paraíba (Nordeste do Brasil). *Revista da Gestão Costeira Integrada* 8(2):221-231, 2008.
- NIPPER, M.G., PROSPERI, V.A., ZAMBONI, N.S. Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Echinoderm sperm and embryos. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 646-452, 1993.
- O'CONNOR, O.A.; RIVERA, M.D.; YOUNG, L.Y. Toxicity and biodegradation of phthalic acid esters under methanogenic conditions. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.8, p.569-574, 1989.



- PICHEL, W.G., CHURNSIDE, J.H., VEENSTRA, T.S., FOLEY, D.G. Marine debris collects within the North Pacific Subtropical Convergence Zone. ***Marine Pollution Bulletin*** 54, 1207–1211, 2007.
- PINHO, G.L.L.; IHARA, P. M.; FILLMANN, G. Does light-stick content pose any threat to marine organisms? ***Environmental Toxicology and Pharmacology***. v.27, p.155-157, 2009.
- PRÓSPERI, V.A.. Aplicação de testes de toxicidade com organismos marinhos para a análise de efluentes industriais lançados em áreas estuarinas. ***Dissertação de Mestrado***, Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 120p, 1993.
- PRÓSPERI, V. A.; ARAÚJO, M. M. S. Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus* Lamarck 1816 e *Echinometra lucunter*, Linnaeus 1758 (Echinodermata: Echinoidea). In: NASCIMENTO, I. A; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (eds.), ***Métodos em Ecotoxicologia*** Marinha. Aplicações no Brasil. Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo, p. 99-110, 2002.
- RAND, G.L. ***Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, environment fate and risk assessment. Second Edition.*** Taylor & Francis, Washington, DC. p. 1125, 1995.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M. & LIZAMA, M. de los A.P. ***Sanidade de organismos aquáticos.*** In: RODRIGUES E.L. Toxicidade Aquática: Considerações sobre normas e legislação para Implementação de Ensaio e Credenciamento de laboratórios. p.286, 2004.
- RESGALLA JÚNIOR, C.; LAITANO, K.S. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. Notas téc. FACIMAR – ***Rev. Fac. Ciênc. Mar***, Itajaí. v.6, p.153-163, 2002.

- SCOTT, R.C.; DUGARD, P.H.; RAMSEY, J.D.; RHODES, C. *In vitro* absorption of some o-phthalate diesters through human and rat skin. ***Environ Health Perspect***, v.74, p. 223-227, 1987.
- SHAW, D.G.; MAPES, G.A. Surface circulation and the distribution of pelagic tar and plastic. ***Marine Pollution Bulletin***. v.10,p. 160-162, 1979.
- SOUSA, E. C.P.M. Toxicologia Marinha: Histórico. In.: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M. ***Métodos em ecotoxicologia marinha***: Aplicações no Brasil. São Paulo: Editora Artes Gráficas e Industria Ltda, Cap.I, p. 9-12, 2002.
- SORGELOOS, P.G.; PERSONNE, M.; BAEZA-MESA, E.; BRUGGEMAN, E.. The use of *Artêmia* cysts in aquacultues: the concept "hatching efficiency" and description of a new method for cyst processing. P. 715-721. In: Proc. 9<sup>th</sup> ***Annual Meeting World Mariculture Society***. Avault J.W. Jr (Ed.) Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA. 807 p., 1978.
- STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. ***Braz. J. Med. Biol. Res.*** v. 29, p. 1715, 1996.
- STEVANI, C. V.; BAADER, W. J. O sistema quimiluminescente peróxi-oxalato. ***Quim. Nova***, v.22, p.715, 1999.
- STUART, A.E.; BROOKS, C.J.W.; PRESCOTT, R.J. Repellent and antifeedant activity of salicylic acid and related compounds against the biting midge, *Culicoides impunctatus* (Diptera: Ceratopogonidae). *Entomol. Soc. Am.*, v.37, p.222-227, 2000. TARKPEA, M.; HANSSON, M.; SAMUELSSON, B. Comparison of the Microtox test with the 96-hr LC<sub>50</sub> test for the harpacticoid *Nitocra spinipes*. ***Ecotoxicol. Environ. Saf.***, v.11, p.127-143, 1986.

- TAVARES, Y. A. G. Biologia reprodutiva dos equinóides *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) e *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) na Ilha da Galheta, litoral paranaense, Brasil. Curitiba **Tese (Doutorado)**. Universidade Federal do Paraná, 2004.
- THOMPSON, R.C.; SHANNA, H. S.; MOORE, C.J.; FREDERICK, S.V.S. Our plastic age. ***Phil. Trans. R. Soc. B*** (2009) 364, 1973–1976, 2009.
- TOMITA, I.; NAKAMURA, Y.; YAGI, Y. Phthalic acid esters in various foodstuffs and biological materials. ***Ecotoxicol. Environ. Saf.***, v.1, p. 275-287, 1977.
- ULIANA, C.V.; RICCARDI, C.S.; YAMANAKA, H. Investigation on electrochemical behavior of peroxidase enzyme in the presence of hydrogen peroxide and 5-aminosalicylic acid. ***Eclética Química***. v.33, n.1, p. 57-62, 2008.
- UNEP. ***Marine Litter***, an analytical overview, 2005.
- U.S.EPA.. Technical Support Document for Water Quality-Based Toxics Control. EPA/505/2.0.001. U.S. Environmental Protection Agency, ***Office of Water***, Washington.D.C, 1991.
- VEIGA, L.F.; VITAL, N.A.; PORTELA, M.R.A.F. Avaliação da faixa de sensibilidade de *Artemia salina* ao lauril sulfato de sódio. Rio de Janeiro, ***PETROBRÁS/CENPES/SUPESQ/DITER***, 1989.
- VEIGA, L. F. & VITAL, N. Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (eds.), ***Métodos em Ecotoxicologia Marinha***. Aplicações no Brasil. Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo, p. 111-112, 2002.

- WANG, J.H., BOLES, L.C., HIGGINS, B., LOHMANN, K.J. Behavioural responses of sea turtles to lightsticks used in longline fisheries. ***Anim. Conserv.*** v.10, p.176, 2007.
- WEHLE, H.S.; COLEMAN, F.C. Plastics at sea. ***Natural Hist.*** v. 92, p. 20-26, 1983.
- WHO (World Health Organization). Selected Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. IPCS (***International Programme on Chemical Safety***). Geneva: WHO, 1988.
- WILLIAMS, D.T. & BLANCHFIELD, B.J. The retention, distribution, excretion and metabolism of dibutyl phthalate-7-<sup>14</sup>C in the rat. ***J. Agric. Food Chem.***, v. 23(5), p.854-858, 1975.
- WILSON, W.B.; GIAM, C.S.; GOODWIN, T.E.; ALDRICH, A.; CARPENTER, V.; HRUNG, Y.C. The toxicity of phthalates to the marine dinoflagellate *Gymnodinium breve*. Bull. Environ. ***Contam. Toxicol.***, v. 20(2), p.149-154, 1978.
- YOSHIOKA, Y.; OSE, Y.; SATO, T. Testing for the toxicity of chemicals with *Tetrahymena pyriformis*. ***Sci. Total Environ.***, v.43(1/2), p.149-157, 1985.
- ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E. ***Ecotoxicologia Aquática***: Princípios e Aplicações, 2008.