



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro de Tecnologia e Ciências**

**Faculdade de Oceanografia**

**Alessandra Araujo de Alcantara**

**Metodologia não destrutiva na extração de gametas de *Arbacia lixula*  
Linnaeus, 1758 (Echinoidea: Arbaciidae) para a utilização de embriões em  
bioensaios**

**Rio de Janeiro**

**2023**

Alessandra Araujo de Alcantara

**Metodologia não destrutiva na extração de gametas de *Arbacia lixula* Linnaeus, 1758  
(Echinoidea: Arbaciidae) para a utilização de embriões em bioensaios**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Oceanografia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio dos Santos Fernandez

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/C

A347 Alcantara, Alessandra Araujo de.  
Metodologia não destrutiva na extração de gametas de *Arbacia lixula* Linnaeus, 1758 (Echinoidea: Arbaciidae) para a utilização de embriões em bioensaios / Alessandra Araujo de Alcantara. – 2023.  
77 f. : il.

Orientador: Marcos Antônio dos Santos Fernandez.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Oceanografia.

1. Toxicologia ambiental - Teses. 2. Ouriço-do-mar - Teses. 3. Fertilização in vitro - Ouriço-do-mar - Teses. 4. Legislação ambiental – Teses. I. Fernandez, Marcos Antônio dos Santos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Oceanografia. III. Título.

CDU: 504:563.95

Bibliotecária Responsável: Priscila Freitas Araujo/ CRB-7: 7322

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Alessandra Araujo de Alcantara

**Metodologia não destrutiva na extração de gametas de *Arbacia lixula* Linnaeus, 1758  
(Echinoidea: Arbaciidae) para a utilização de embriões em bioensaios**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Oceanografia.

Aprovada em 23 de agosto de 2023.

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Marcos Antônio dos Santos Fernandez (Orientador)

Faculdade de Oceanografia - UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Gleyci Aparecida Oliveira Moser

Faculdade de Oceanografia - UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fabiano Paschoal de Oliveira

Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Rio de Janeiro

2023

## DEDICATÓRIA

À minha família e amigos,  
Por todo amor, cuidado e apoio.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter permitido que tudo isso fosse possível. Não só na minha vida acadêmica, como ao longo desses anos.

À minha família, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

À minha mãe, pelo carinho que teve ao longo da minha jornada acadêmica. Pela paciência e cuidado por todas as noites em claro, que com amor nunca deixou que eu desanimasse.

Ao meu pai, que com zelo e orgulho para comigo, fizesse com que eu jamais desistisse de seguir os meus sonhos.

Às minhas irmãs: Ana Paula, Andreia, Adriana, Andreza e Ana Cristina, e meus sobrinhos, Susy, Anthony, Aninha, Benício e Alice, por todo incentivo emocional e companheirismo durante a minha vida.

Ao meu orientador, Marcos Antônio dos Santos Fernandez, por sua paciência, confiança, por todo conhecimento, pelo incentivo, e por acreditar no meu potencial e no potencial deste trabalho, com dedicação e carinho pelo mesmo. E pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa e do laboratório, e permitir que eu conquistasse sonhos e ensejos de estar onde estou neste momento.

Agradeço aos meus amigos que conquistei no Laboratório de Ecotoxicologia Marinha, que foram muito importantes durante esses anos. Principalmente, a Helena, que com seu cuidado e amor me ensinou muito até aqui. Por todo carinho, apoio, parceria e incentivo para com que este trabalho fosse realizado. Agradeço também ao William pela parceria de sempre em todos os momentos. Agradeço a Eloá, Lyane, Samarah e Felipe Lage pela parceria nas coletas de água e pela realização deste trabalho.

Agradeço ao Fellipe Garcia pela parceria de sempre nos mergulhos de coleta, por ser sempre solícito, e com todo carinho, nos ajudando para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço ao meu grande amigo Fabiano, que me incentivou e me incentiva todos os dias, nunca me deixando desistir, acreditando em mim e no meu potencial desde sempre.

Agradeço também aos meus amigos, Jéssica, Isa, Gabi, João, Elias que me acompanham desde a infância, que com amor e toda sua amizade me incentivaram desde o início.

Agradeço ao meu amigo Nicolas, por estar presente em muitos momentos da minha vida, sempre me apoiando e compartilhando das minhas conquistas. Agradeço pelo carinho,

amor e admiração de sempre. Todos esses momentos fizeram e fazem parte para que eu possa seguir em frente, me apoiando e me dando suporte emocional para chegar até aqui.

Aos amigos que fiz na faculdade, enquanto estive na graduação, que estão sempre presentes em minha vida e me apoiando na minha vida acadêmica.

Agradeço ao meu amigo João Gabriel pela ajuda e parceria ao longo deste trabalho.

Agradeço a todos os professores por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender.

Agradeço ao André da secretaria da pós por ser sempre solícito e nos orientar de acordo com processos burocráticos da pós-graduação.

Agradeço aos professores da Banca Examinadora, por dividirem comigo este momento tão importante e esperado.

À Capes pela concessão da bolsa de Mestrado durante os anos no Programa de Pós-Graduação em Oceanografia na UERJ.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido.  
Agora é hora de compreender mais para temer menos.

*Marie Curie*



## RESUMO

ALCANTARA, Alessandra Araujo. **Metodologia não destrutiva na extração de gametas de *Arbacia lixula* Linnaeus, 1758 (Echinoidea: Arbaciidae) para a utilização de embriões em bioensaios**. 2023. 77 f. Dissertação (Mestrado Oceanografia) – Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Os embriões de ouriços-do-mar atuam como ferramentas de detecção de efeitos de poluentes químicos principalmente em água, e as normas da ABNT NBR 15350 recomendam a devolução dos organismos ao mar após a obtenção de gametas, tornando-se importante que se obtenham procedimentos de indução e extração de gametas de ouriços-do-mar adultos que reduzam a taxa de mortalidade, ou que sejam totalmente não-destrutivos. Observando, assim, se fez necessário a obtenção de métodos menos invasivos, ou que sejam totalmente não destrutivos, diminuindo as taxas de mortalidade dos animais. Portanto, os objetivos do presente estudo foi desenvolver metodologia não destrutiva de extração de gametas utilizando a espécie não convencional *Arbacia lixula*, além de validar a técnica da reprodução *in vitro* e desenvolvimento até a fase pluteus, e com isso, contribuir para o aperfeiçoamento das normas e da legislação referente a bioensaios com ouriços-do-mar (Normas ABNT, Deliberação do IBAMA). Foram coletados 386 ouriços-do-mar de duas praias do Rio de Janeiro, as análises foram realizadas através de indução química para emissão de gametas com injeção de 150 µL da solução de KCl 0,5 M nas gônadas dos animais. Após a fertilização dos animais, as células foram observados por microscópio óptico para análise dos estágios de desenvolvimento embrionário. Durante 15 meses, entre os meses de fevereiro de 2022 a abril de 2023, foram realizados mensalmente as experimentações do método não destrutivo para *A. lixula*, utilizando o mínimo de 20 animais, respeitando o período da primeira quinzena de cada mês. 386 ouriços-do-mar receberam o método químico otimizado. Deste montante, apenas dois animais não sobreviveram após os ensaios, enquanto 384 do total de espécimes testados se mantiveram saudáveis e devolvidos ao seu habitat natural após os ensaios. Os animais utilizados na experimentação tiveram desovas entre os meses de fevereiro de 2022 a setembro do mesmo ano, porém, somente a partir do mês de março de 2022 foi realizado o experimento com fertilização. Apresentando a maior quantidade de animais ovados para o mês de junho, o percentual de desenvolvimento a pluteus chegou apenas a 30% após a incubação, apresentando 3% de prisma (estágio embrionário pré pluteus), 40% para ovos fecundados, e um percentual de 27% em óvulos que não fecundados. Enquanto para o mês de julho o percentual de desenvolvimento a pluteus atingiu o valor de 80%, considerando este o valor mínimo para utilização em ensaios ecotoxicológicos e o maior valor atingido durante toda a experimentação. Foi observado também o percentual em estágio de prisma em 12%, 4% para desenvolvimento embrionário, 3% para ovos fecundados e apenas 1% em óvulos não fecundados. O método não destrutivo proposto aplicado a espécie *A. lixula* se mostrou eficaz quanto a preservação dos animais, sendo devolvidos saudáveis ao habitat natural após os ensaios, com desovas atípicas para o período, comparados aos estudos anteriores, *A. lixula* se mostrou inviável neste estudo de reprodução, com isto, necessita-se de novos estudos para avaliar a periodicidade reprodutiva da espécie com uma duração de tempo maior das que foram realizadas neste trabalho.

Palavras-chave: ABNT; bioindicadores; ecotoxicologia; método não destrutivo; ouriço-do-mar; reprodução *in vitro*.

## ABSTRACT

ALCANTARA, Alessandra Araujo. **Non-destructive methodology in the extraction of gametes from *Arbacia lixula* Linnaeus, 1758 (Echinoidea: Arbaciidae) for the use of embryos in bioassays.** 2023. 77 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Sea urchin embryos act as tools for detecting the effects of chemical pollutants, mainly in water, and the ABNT NBR 15350 standards recommend returning organisms to the sea after obtaining gametes, making it important to obtain procedures of induction and extraction of gametes from adult sea urchins that reduce the mortality rate, or that are completely non-destructive. Observing, therefore, it was necessary to obtain less invasive methods, or that are totally non-destructive, reducing the mortality rates of the animals. Therefore, the objectives of the present study were to develop a non-destructive methodology for gamete extraction using the unconventional species *Arbacia lixula*, in addition to validating the technique of *in vitro* reproduction and development up to the pluteus phase, and with this, to contribute to the improvement of standards and the legislation regarding bioassays with sea urchins (ABNT Norms, IBAMA Deliberation). 386 sea urchins were collected from two beaches in Rio de Janeiro, the analyzes were performed through chemical induction for the emission of gametes with injection of 150  $\mu$ L of 0.5 M KCl solution in the gonads of the animals. After fertilization of the animals, the cells were observed by optical microscope for analysis of the stages of embryonic development. For 15 months, between February 2022 and April 2023, monthly trials of the non-destructive method for *A. lixula* were carried out, using a minimum of 20 animals, respecting the period of the first fortnight of each month. 386 sea urchins received the optimized chemical method. Of this amount, only two animals did not survive after the tests, while 384 of the total specimens tested remained healthy and returned to their natural habitat after the tests. The animals used in the experiment spawned between the months of February 2022 and September of the same year, however, the experiment with fertilization was only carried out from March 2022 onwards. The highest number of ovate animals was observed the month of June, the percentage of development to pluteus reached only 30% after incubation, with 3% of prism (pre-pluteus embryonic stage), 40% for fertilized eggs, and a percentage of 27% in eggs that are not fertilized. While for the month of July, the percentage of pluteus development reached the value of 80%, considering this the minimum value for use in ecotoxicological tests and the highest value reached during the entire experiment. The percentage in prism stage was also observed in 12%, 4% for embryonic development, 3% for fertilized eggs and only 1% in non-fertilized eggs. The proposed non-destructive method applied to the *A. lixula* is effective in terms of the preservation of the animals, being returned healthy to the natural habitat after the tests, with atypical spawning for the period, compared to previous studies, *A. lixula* proved to be unfeasible for this reproduction study, therefore, further studies are needed to evaluate the reproductive periodicity of the species with a longer duration of time than those carried out in this work.

Keywords: ABNT; bioindicators; ecotoxicology; non-destructive method; sea urchin; *in vitro* reproduction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Técnica de indução química na extração de gametas em ouriços-do-mar..	20
Figura 2 -	Localização da Praia Vermelha, RJ.....	28
Figura 3 -	Localização da Praia de Itaipu.....	29
Figura 4 -	Costão esquerdo da Praia Vermelha.....	29
Figura 5 -	Coleta de <i>A. lixula</i> no costão esquerdo da Praia Vermelha, Urca.....	30
Figura 6 -	Costão esquerdo da Praia de Itaipu.....	30
Figura 7 -	Aquários de vidro para condicionamento dos ouriços-do-mar em laboratório.....	31
Figura 8 -	Deslocamento de volume e injeção de KCl a 150 $\mu$ L através de agulhas hipodérmicas aplicadas na membrana peristomial de <i>A. lixula</i> .....	32
Figura 9 -	Gráfico do índice de condição para <i>Echinometra lucunter</i> .....	33
Figura 10 -	Indução por estímulo químico e extração de gametas femininos e masculinos.....	34
Figura 11 -	Imagem por satélite da localização da boia RJ4 SIMCosta.....	37
Figura 12 -	Estágio de desenvolvimento de embrião de <i>A. lixula</i> após fertilização <i>in vitro</i> .....	60
Figura 13 -	Estágio de desenvolvimento de embrião de <i>A. lixula</i> após fertilização <i>in vitro</i> .....	62

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Percentual de desovas da espécie <i>Echinometra lucunter</i> entre os anos de 2015 e 2018.....	23
Gráfico 2 -	Percentual de desovas de <i>Arbacia lixula</i> .....	25
Gráfico 3 -	Quantitativo de animais utilizados mensalmente em cada experimentação.....	40
Gráfico 4 -	Quantitativo de animais devolvidos saudáveis ao habitat natural e animais mortos após a experimentação.....	41
Gráfico 5 -	Índice de condição adaptado para ouriços-do-mar dos meses de fevereiro e março de 2022.....	42
Gráfico 6 -	Índice de condição adaptado para ouriços-do-mar dos meses de abril e maio de 2022.....	43
Gráfico 7 -	Índice de condição adaptado para ouriços-do-mar dos meses de junho e julho de 2022.....	44
Gráfico 8 -	Índice de condição adaptado para ouriços-do-mar dos meses de agosto e setembro de 2022.....	45
Gráfico 9 -	Índice de condição adaptado para ouriços-do-mar do mês de outubro de 2022 com dois testes experimentais.....	46
Gráfico 10 -	Índice de condição adaptado para ouriços-do-mar dos meses de novembro e dezembro de 2022.....	47
Gráfico 11 -	Índice de condição adaptado para ouriços-do-mar dos meses de janeiro e fevereiro de 2023.....	48
Gráfico 12 -	Índice de condição adaptado para ouriços-do-mar dos meses de março e abril de 2023.....	49
Gráfico 13 -	Comparação de desovas durante os períodos de experimentação entre os anos de 2017, 2018, 2022 e 2023.....	53
Gráfico 14 -	Resultados da desova por indução química aplicando o método não destrutivo entre os meses de fevereiro a maio de 2022.....	56
Gráfico 15 -	Resultados da desova por indução química aplicando o método não destrutivo entre os meses de junho a setembro de 2022.....	57
Gráfico 16 -	Resultados da desova por indução química aplicando o método não	

	destrutivo entre os meses de outubro a dezembro de 2022.....	58
Gráfico 17 -	Resultados da desova por indução química aplicando o método não destrutivo entre os meses de janeiro a abril de 2023.....	69
Gráfico 18 -	Resultados da fertilização <i>in vitro</i> entre os meses de desova, de março a setembro de 2022.....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Frequência de experimentos entre os anos de 2017 e 2018 com <i>Arbacia lixula</i> .....	24
Tabela 2 -	Resultado das desovas de <i>Arbacia lixula</i> testadas por Araújo (2018).....	25
Tabela 3 -	Teste de avaliação de volume por dessecação por 5 minutos ao ar.....	50
Tabela 4 -	Teste de avaliação de volume por dessecação por 15 minutos ao ar.....	51
Tabela 5 -	Médias semanais da temperatura da água do mar em setembro, novembro e dezembro de 2017 e 2022.....	52
Tabela 6 -	Médias semanais da temperatura da água do mar em fevereiro e abril de 2018 e 2022, e janeiro de 2018 e 2023.....	52
Tabela 7 -	Animais aclimatados em diferentes tipos de águas: marinha natural e água marinha artificial para animais coletados na Praia Vermelha, na Urca, no Rio de Janeiro.....	54
Tabela 8 -	Animais aclimatados em diferentes tipos de águas: marinha natural e água marinha artificial para animais coletados na Praia de Itaipu, em Niterói, no Rio de Janeiro.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Cd	Cádmio
Cr	Cromo
Cu	Cobre
FAOC/UERJ	Faculdade de Oceanografia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
HPA's	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
KCl	Cloreto de Potássio
MMA	Ministério do Meio Ambiente
NOAA	<i>National Oceanic Atmospheric Administration</i>
Pb	Chumbo
PSU	<i>Practical Salinity Unit</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
TBT	Tributilestanho
TSM	Temperatura da Superfície do Mar

## LISTA DE SÍMBOLOS

M	Mol
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
mL	Mililitro
m	Metro
L	Litro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
%	Porcentagem
g	Quilograma
$\times$	Multiplicação



## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
1.1	<b>Ouriços-do-mar como bioindicadores de poluição</b> .....	19
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	27
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	27
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
3.1	<b>Área de estudos</b> .....	28
3.2	<b>Coleta e aclimação dos ouriços em laboratório</b> .....	31
3.3	<b>Metodologia de análises</b> .....	32
3.3.1	<u>Biometria</u> .....	32
3.3.1.1	Índice de condição adaptado para ouriço-do-mar.....	32
3.3.1.2	Indução de extração de gametas nas matrizes dos organismos testados.....	33
3.3.1.3	Fertilização <i>in vitro</i> e desenvolvimento embrionário à larva pluteus.....	34
3.3.1.4	Análise microscópica do desenvolvimento embrionário.....	36
3.3.2	<u>Experimentação complementar de desova</u> .....	37
3.3.2.1	Análise de dados de temperatura da água do mar.....	37
3.3.2.2	Experimento de avaliação de volume por dessecação.....	38
3.3.2.3	Experimento de comparação entre os períodos do estudo.....	38
3.3.2.4	Experimento de efeito da água marinha artificial e água marinha natural.....	39
3.3.2.5	Experimento de efeito de local de coleta.....	39
4	<b>RESULTADOS</b> .....	40
4.1	<b>Método não destrutivo <i>A. lixula</i></b> .....	40
4.1.1	<u>Eficácia do método não destrutivo</u> .....	40
4.1.2	<u>Dados índice de condição</u> .....	41
4.1.3	<u>Experimentos complementares de desova</u> .....	50
4.1.3.1	Efeito de dessecação.....	50
4.1.3.2	Efeito da temperatura da água do mar (SIMCosta).....	51
4.1.3.3	Efeito da comparação entre os experimentos pela época do ano.....	52

4.1.3.4	Efeito da água marinha natural e artificial e efeito de local de coleta.....	54
4.1.4	<u>Desova e fertilização</u> .....	55
4.1.5	<u>Desenvolvimento embrionário à larva pluteus</u> .....	59
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	63
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	68
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	69
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
	<b>ANEXO</b> .....	77

## INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, ecossistemas marinhos costeiros continuam sofrendo pressão implacável, ocasionados pela a destruição dos habitats, tendo a poluição por metais pesados, plastificantes, compostos organoestânicos, fármacos, fertilizantes e pesticidas agrícolas como uma séria ameaça ao ambiente marinho e costeiro, devido a sua alta toxicidade e bioacumulação (Wells, 1999; Bila & Dezotti, 2003; Trifuoggi et al., 2017; Gray et al., 2019). O resultado dessas alterações provoca uma queda acentuada da biodiversidade marinha, em função da desestruturação do ambiente físico, químico e alterações na dinâmica e estrutura das comunidades biológicas (Callisto et al., 2005).

Para cada agente poluidor ou a um fator natural que possa ser um potencial poluente existem grupos taxonômicos diretamente relacionados (Callisto et al., 2005), atuando como principais ferramentas na avaliação da estrutura ecológica de cada comunidade e populações (Docile & Figueiró, 2013). Os mais utilizados são aqueles capazes de diferenciar fenômenos naturais e estresses de origem antrópica, que podem ser relacionados a fontes de poluições pontuais ou difusas, por possuírem características ecológicas conhecidas, podendo assim, responder às modificações do ambiente através de mudanças na estrutura das populações (Callisto et al., 2005, Prestes & Vincenci, 2019), como no caso das comunidades fitoplanctônicas, que pode indicar mudanças climáticas já que estas influenciam a comunidade em termos da taxa de crescimento da célula, abundância, composição e distribuição de seus táxons (Teixeira de Lima et al., 2019), assim como as cianobactérias que são indicadoras do estado trófico dos ambientes, e que são encontradas em ambientes impactados, especialmente aqueles sujeitos à eutrofização (Mesquita, 2019).

Os moluscos bivalves são frequentemente usados em estudos de poluição, pois são bons acumuladores de metais tais como o cobre, o cobalto, o cádmio, o chumbo, o níquel e o zinco (Beiras et al., 2003; Markich, 2017); assim como os moluscos gastrópodes podem ser utilizados como bioindicadores dos efeitos biológicos, como o imposex em fêmeas, ocasionados pelo efeito do tributilestanho (TBT) por muito tempo utilizado nas composições de tintas antiincrustantes nos cascos de embarcações (Santos et al., 2009; Toste et al., 2013; Artifon et al., 2016). Estes compostos orgânicos de estanho provocam o surgimento de órgãos masculinos não funcionais em fêmeas, sendo irreversível e provocando a esterilização das espécies (Fernandez et al., 2002; Fernandez, 2019). Assim como esses moluscos, os embriões e larvas de outros invertebrados marinhos, como os anfípodos, podem também ser bons

bioindicadores de efeitos de substâncias de metais como o ferro, o cádmio, o cobre, o chumbo e o zinco (Cui et al., 2018).

## 1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 Ouriços-do-mar como bioindicadores de poluição

Fazendo uma revisão da literatura específica, é possível destacar a ampla utilização dos organismos marinhos, desde a década de 1950 em monitoramento e bioensaios utilizados para avaliação ou prevenção de impactos ambientais.

Os embriões de ouriços-do-mar atuam como ferramentas de detecção de efeitos destes poluentes químicos, como o cobre e o níquel (Tellis et al., 2014), e em composições combinadas ou individuais de mercúrio dissolvido, cobre, cádmio e chumbo (Fernández & Beiras, 2001).

Estudos de bioensaios realizados com embriões e gametas de ouriços-do-mar em testes de desenvolvimento, reprodução e análises de produtos químicos, foram desenvolvidos com sucesso por laboratórios em todo o mundo (Manzo, 2004), e foram propostos primeiramente por Douglas P. Wilson no início da década de 50, como um novo indicador de qualidade da água, afirmando que embriões podem apresentar prejuízos em seu desenvolvimento larval por agentes toxicantes presentes em água, indicando uma baixa qualidade dessa amostragem (Wilson, 1951). A partir dos dados publicados pelo autor, inúmeros estudos que corroboram aos de Wilson (1951), testando-os em fase embrião larval, e em indivíduos adultos avaliando a sensibilidade aos efeitos de substâncias traços (Kobayashi, 1971; Quiniou et al., 1999; Fernández & Beiras, 2001; Perina et al., 2011; Tellis et al., 2014; Brown et al., 2020).

Por sua alta sensibilidade em seu estágio larval (estágio de larva pluteus), são utilizados como modelos em estudos celulares, que procuram avaliar suas reações diante de estresses na fase de desenvolvimento, tendo vantagens nos testes ecotoxicológicos por apresentarem um elevado número de gametas, fertilização externa, a alta sincronia de desenvolvimento e transparência embrionária (Beiras et al., 2003). O modelo utilizado apresenta uma maior praticidade, simplicidade, clareza de características indicadoras, velocidade e uniformidade dos resultados por métodos mais fáceis de serem aplicados, visando a determinação dos efeitos de poluentes químicos em campo ou em experimentos em laboratório (Kobayashi, 1971; Beiras, 2002; Beiras et al., 2003; Chiarelli & Roccheri, 2014).

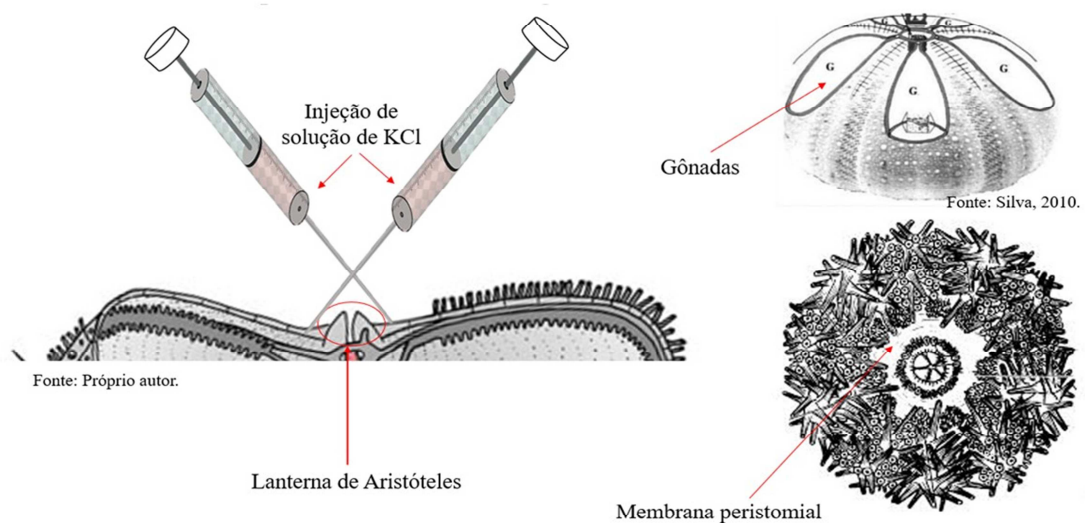
Em laboratório, os gametas podem ser obtidos através de diversos métodos diferentes, tais como vivisseção, estímulo elétrico ou estímulo químico (Silva, 2010; Gago & Luis, 2011).

A técnica de vivisseção para a extração de gametas consiste na remoção nas gônadas dos ouriços, sendo um método inteiramente invasivo, necessitando sacrificar o animal (Silva, 2010).

A técnica do estímulo elétrico foi primeiramente usada por Iwata, para obter gametas de *Heterocidaris crassispina* (A. Agassiz, 1863). O método consiste na aplicação de pulsos elétricos através de uma corrente alternada em dois pontos localizados na posição aboral do animal, sobre uma placa de petri contendo água do mar (Silva, 2010).

Okada et al. (1984) descrevem que a técnica de indução química da extração de gametas em ouriços-do-mar é realizada através da aplicação de KCl 0,5 M na área das gônadas dos ouriços, feita através do posicionamento de agulhas hipodérmicas na membrana peristomial desses animais, descrita inicialmente por Iwata e Fukase (1964, apud Okada et al., 1984). São feitas duas aplicações, uma oposta a outra, e após injetar a substância, o animal deve ser agitado suavemente para assegurar que a solução atingirá as cinco gônadas (Figura 1). A quantidade a ser injetada depende da massa e volume de cada animal, variando de 1 a 10 ml de KCl, afirmam Okada et al. (1984).

Figura 1- Técnica de indução química na extração de gametas em ouriços-do-mar.



Nota: A técnica de indução de gametas por estímulo químico está padronizada pela Norma da ABNT NBR 15350 (2006/2012).

Fonte: A autora, 2021.

Com análises em laboratório, Soares & Resgalla Junior (2016), testaram para investigar o grau de sensibilidade entre três espécies de ouriços-do-mar, *Lytechinus variegatus*, *Echinometra lucunter* e *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758), no litoral de Santa Catarina, Brasil, aos efeitos contaminantes de cinco substâncias químicas: Cu, Cd, Cr, Pb e SDS (dodecil sulfato de sódio), molécula utilizada como surfactante aniônico com propriedades detergente.

Zúñiga et al. (1995) realizou também bioensaios com gametas de *Arbacia spatuligera* (Valenciennes, 1846) se mostraram eficazes para análises de amostras de água poluída na Baía de San Vicent e Baía de Concepción, que recebiam despejo de efluentes domésticos e resíduos químicos diariamente no Chile.

Embriões de ouriços-do-mar foram utilizados em análises *in loco*, como descreveram Quiniou, et al. (1999), em um estudo sobre impactos de vários tipos de substâncias, em ambientes costeiros, tais como na Baía de Brest na Bretanha Ocidental, na França, onde amostras de água coletadas de vários pontos possíveis de poluição foram analisadas através de populações de larvas saudáveis de ouriços-do-mar da espécie *Sphaerechinus granularis* (Lamarck, 1816) ouriços-do-mar encontrados desde o sudoeste da região do canal da Mancha inglês até o golfo da Guiné, incluindo o mar Mediterrâneo. As alterações como atrasos e anormalidades no desenvolvimento embrionário de *S. granularis* observadas neste local podem estar ligadas ao despejo de metais pesados oriundos de resíduos pirotécnicos, mas também ao despejo de pesticidas de origem agrícola, e concentrações de TBT (tributilestanho) e HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) de áreas urbanas e atividades portuárias de forma que os ouriços foram utilizados nesse estudo como sentinelas ambientais.

Na Itália, Morroni et al. (2018), utilizaram testes de toxicidade *in situ* com embriões de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) como método para investigar se o naufrágio no Navio Cruzeiro Costa Concordia na Ilha Giglio (Toscana, Itália), poderia ter atuado como fonte de poluição por substâncias químicas. Este estudo teve como objetivo validar uma câmara de exposição específica para a exposição *in situ* de embriões de *P. lividus* para obter uma metodologia definida para a realização do teste de toxicidade embrionária de ouriço-do-mar em condições de campo.

As normas da ABNT NBR 15350 (2006), recomendam a devolução dos organismos ao mar após a obtenção de gametas, tornando-se importante que se obtenham procedimentos de indução e extração de gametas de ouriços-do-mar adultos que reduzam a taxa de mortalidade, ou que sejam totalmente não-destrutivos, utilizando matrizes destes animais ovados, afim de evitar desgastes físicos em matrizes consideradas inviáveis para os ensaios (Bastos, 2009).

Anteriormente, os testes ecotoxicológicos no Brasil vinham sendo realizados com a espécie *Lytechinus variegatus*, que se mostrava mais fácil de se utilizar, com desova durante o ano inteiro, embora não fosse considerada uma espécie abundante na costa brasileira.

Com o uso excessivo da espécie a densidade populacional diminuiu na natureza, e o seu uso foi suspenso pela portaria do Ministério do Meio Ambiente nº445, de 17 de dezembro de 2014, retificada pela Portaria MMA nº 98, de 28 de abril de 2015, sendo substituída por *Echinometra lucunter*. Essa espécie, apesar de ser a espécie mais comum na costa, tem se mostrando pouco viável para bioensaios de rotina, uma vez que a espécie apresenta um período de desova sazonalmente marcada, tendo preferência no verão para emissão de gametas, na latitude do Rio de Janeiro (Araújo, 2018).

Bastos em 2009, realizou estudos no Laboratório de Ecotoxicologia Marinha da FAOC (Faculdade de Oceanografia) da UERJ (Universidade do Estado do Rio de Janeiro) sobre a viabilidade das técnicas de extração de gametas padronizadas pela Norma da ABNT, tais como estímulo elétrico e estímulo químico, e comprovou que ambos os métodos são extremamente nocivos às matrizes de ouriços-do-mar, tendo sido observada uma taxa elevada de mortalidade dos animais para cada experimento.

Sendo assim, se fez necessário a obtenção de métodos menos invasivos, ou que sejam totalmente não destrutivos, diminuindo as taxas de mortalidade dos animais.

O método não-destrutivo originalmente proposto pelo Laboratório de Ecotoxicologia Marinha (FAOC/UERJ), consiste em estabelecer um limite de segurança para que os animais utilizados como matrizes para a extração dos gametas para os testes toxicológicos entrem na padronização de bioensaios estabelecidos pelas normas da ABNT de 2006, valendo até o presente (NBR 15350:2012), que indica a devolução dos organismos ao mar após a obtenção dos gametas.

Silva (2010), desenvolveu uma metodologia não destrutiva aplicada com sucesso para *Echinometra lucunter*, que comprovou que o estímulo químico, realizado com injeções de KCl otimizadas, ou seja, em volumes menores, torna-se menos agressivo. Dessa forma se torna possível alcançar o objetivo de preservar os animais, seguindo a recomendação da norma ABNT (2006) e devolvê-los vivos ao mar após os estudos. O estudo em questão também comprovou a eficácia de 93% de acerto prático do índice de condição adaptado para ouriços do mar, proposto por Bastos (2009), o que mostra que com a utilização desse método já seria possível obter uma enorme preservação dos ouriços.

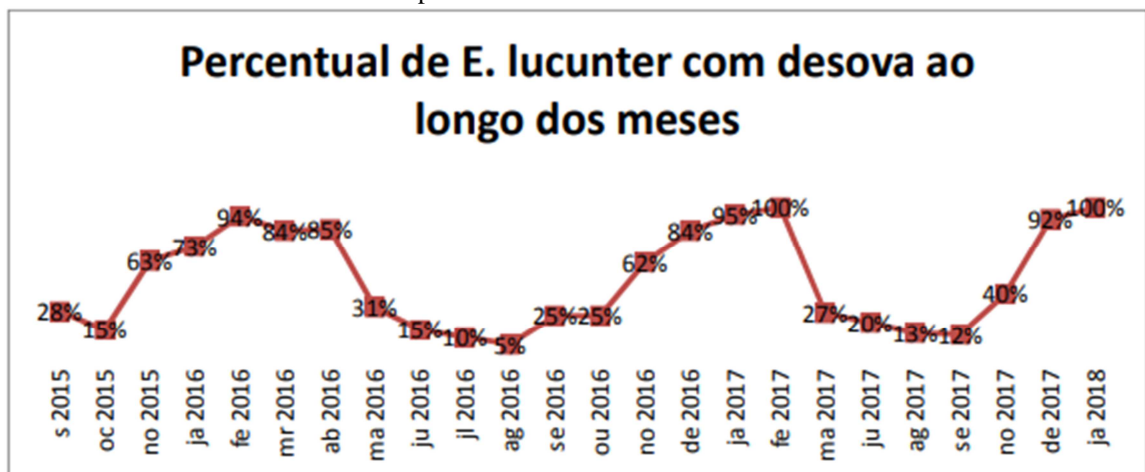


Como citado anteriormente, existem normas que determinam quais os tipos de testes e quais espécies são liberadas para serem utilizadas em bioensaios, no Brasil. As espécies regulamentadas eram apenas a *L. variegatus* e *E. lucunter*. Contudo, a última versão da NBR 15350 de 2023 inclui *Arbacia lixula* junto com as espécies anteriores. Mas os limites para injeção de KCl, de 5,0 mL para as duas primeiras espécies e 1,0 mL para a segunda continuam letais, conforme nossos experimentos.

Como vimos, em termos de sobrevivência das matrizes, essa regulamentação se mostrou falha, pois os métodos ainda são invasivos para os ouriços. Essa problemática é tão séria que, com a crescente demanda dos testes ecotoxicológicos e da mortandade que os acompanham, foi preciso proibir o uso da espécie *L. variegatus* para este tipo de estudo (MMA, 2014). A baixa populacional foi tão grande que ocasionou a extinção dessa espécie em vários pontos da costa brasileira.

Assim, tem-se a necessidade de utilizar a outra espécie regulamentada. Por também ser uma espécie muito abundante na costa brasileira, acreditava-se que seria possível a substituição da espécie anterior por *E. lucunter*. Porém um novo estudo realizado no Laboratório de Ecotoxicologia Marinha da FAOC/UERJ (Araújo, 2018), mostrou que esta espécie possui seu período reprodutivo marcado de acordo com a sazonalidade (Gráfico 1), o que inviabiliza o seu uso para este tipo de teste ao longo do ano.

Gráfico 1- Percentual de desovas da espécie *Echinometra lucunter* entre os anos de 2015 e 2018.



Fonte: Extraído de Adriana Araújo, Relatório Qualitec, 2018.

Com a problemática da reprodução sazonal de *E. lucunter*, iniciou-se mais uma vez a busca por uma espécie alternativa, que possuísse características parecidas com as anteriores e obtivesse também uma boa abundância na costa brasileira, para que assim fosse possível iniciar testes para averiguar a possibilidade de uso.

Diante dessa demanda, Araújo (2018) começa os estudos com a espécie *Arbacia lixula*, a fim de entender suas características e seu período reprodutivo. Os testes preliminares obtidos foram satisfatórios no que tange ao período reprodutivo, de acordo com dados expressados na tabela onde foi possível realizar os experimentos (Tabela 1).

Tabela 1- Frequência de experimentos entre os anos de 2017 e 2018 com *Arbacia lixula*.

Mês	Abr17	Mai17	Jun17	Jul17	Ago17	Set17	Out17	Nov17	Dez17	Jan18	Fev18	Mar18	Abr18
Início, sem experimento													

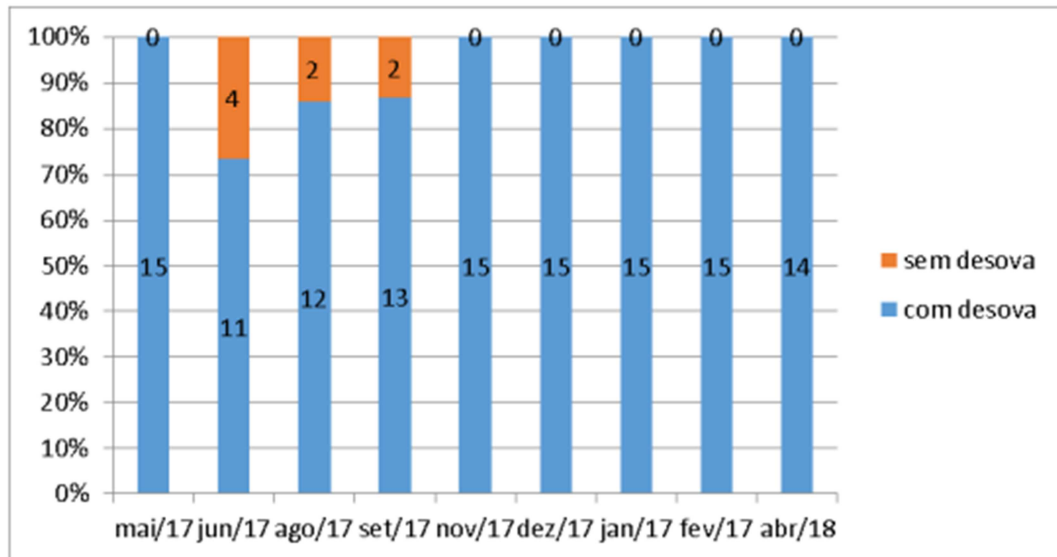
Legenda: Linha expressada em verde sinaliza os meses de realização dos testes. Linha expressada em vermelho marca os meses onde o experimento precisou ser interrompido.

Fonte: Extraído de Adriana Araújo, Relatório Qualitec, 2018.

Pertencente à família Arbaciidae, a espécie *Arbacia lixula* descrita por Linnaeus (1758), possui uma coloração que varia do marrom escuro ao preto, de carapaça avermelhada ou negra, e com a ponta de seus finos espinhos esbranquiçada. É caracteristicamente litorânea, tendo preferência por substratos consolidado (Máximo et al., 2008; Morroni et al., 2023).

Sua distribuição ocorre em Cabo Verde, Ilhas Canárias e Açores (Ilhas da Macaronésia), Mediterrâneo Ocidental e Mediterrâneo Oriental (Pérez-Portela et al., 2019), no Brasil, ocorre na costa Atlântica da América do Sul, da Venezuela até a foz do rio da Prata, sendo uma espécie litoral de habitat rochoso que se distribui até 50 m de profundidade (Máximo et al., 2008).

Vale ressaltar que por *A. lixula* ser uma espécie um pouco menor que as outras, nos experimentos realizados por Araújo (2018) e expressados a seguir (Gráfico 2), o volume injetado da solução de KCl era de apenas 500 µL. Devido ao índice elevado de desova com este volume e com a finalidade de ser o menos agressivo possível para os ouriços, a partir de abril de 2018 os testes passaram a ser otimizados em volumes menores, entre 100 µL e 250 µL.

Gráfico 2 - Percentual de desovas de *Arbacia lixula*.

Fonte: Extraído de Adriana Araújo, Relatório Qualitec, 2018.

Para a realização dos testes após novo aprimoramento, foram divididos dois grupos com 10 animais e cada grupo recebeu o volume citado anteriormente. Os resultados estão expressados a seguir na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultado das desovas de *Arbacia lixula* testadas por Araújo (2018).Injeção de 100  $\mu$ L:

(A)

Injeção de 250  $\mu$ L:

(B)

Animal	Massa inicial	Volume	Sexo	Animal	Massa inicial	Volume	Sexo
1	38,75	35	-----	1	22,25	20	M
2	13,40	10	M	2	30,80	25	F
3	24,20	20	F	3	30,60	25	F
4	30,80	25	----	4	19,15	15	F
5	27,25	20	M	5	24,85	20	F
6	35,20	30	----	6	28,05	20	F
7	25,20	20	F	7	24,70	20	F
8	26,55	20	F	8	27	25	M
9	12,95	10	M	9	25,25	20	M
10	16,75	15	M	10	26,45	20	F

Legenda: Desovas de *Arbacia lixula* com volumes de 100  $\mu$ L (A) e com volume de 250  $\mu$ L (B).

Fonte: Extraído de Adriana Araújo, Relatório Qualitec, 2018.

Nota-se na Tabela 4, na lacuna do volume de 250  $\mu$ L todos os animais desovaram, enquanto com o volume de 100  $\mu$ L três ouriços não emitiram gametas. Por isso, Araújo (2018) considerou 250  $\mu$ L um volume padrão e seguro para a continuação dos testes com esta espécie.

Contudo, não foi possível a continuação do projeto devido a grave crise que a Universidade enfrentou.

Só foi possível retomar um projeto com *A. lixula* em setembro de 2020. Inicialmente, só foi possível o aprofundamento da parte teórica do projeto devido ao fechamento do laboratório por conta da pandemia do Coronavírus. A parte prática do estudo (testes com os ouriços) só foi iniciada em fevereiro de 2022.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Contribuir para o aperfeiçoamento das normas e da legislação referente a bioensaios com ouriços-do-mar (Normas ABNT, Deliberação do IBAMA).

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Desenvolver metodologia não destrutiva de extração de gametas utilizando a espécie não convencional *Arbacia lixula*;
- b) Validar a técnica da reprodução *in vitro* e desenvolvimento até a fase pluteus.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudos

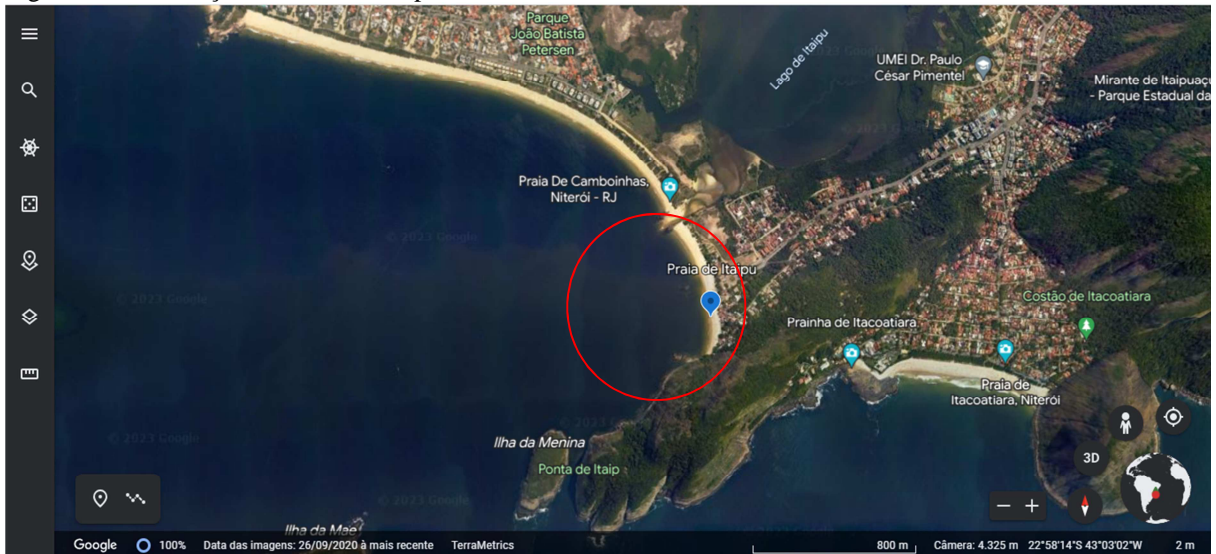
Duas áreas distintas foram selecionadas para a coleta das matrizes de ouriços-do-mar: Praia Vermelha (Figura 2), localizada na Urca, na Cidade do Rio de Janeiro, RJ; e a Praia de Itaipu (Figura 3), na cidade de Niterói, RJ, para dados comparativos de desovas de matrizes em habitats de costões rochosos de praias que possuem características físicas e ambientes diferentes.

Figura 2 – Localização da Praia Vermelha, RJ.



Nota: Sinalização da praia em vermelho.  
Fonte: Google Earth, 2023.

Figura 3 - Localização da Praia de Itaipu.

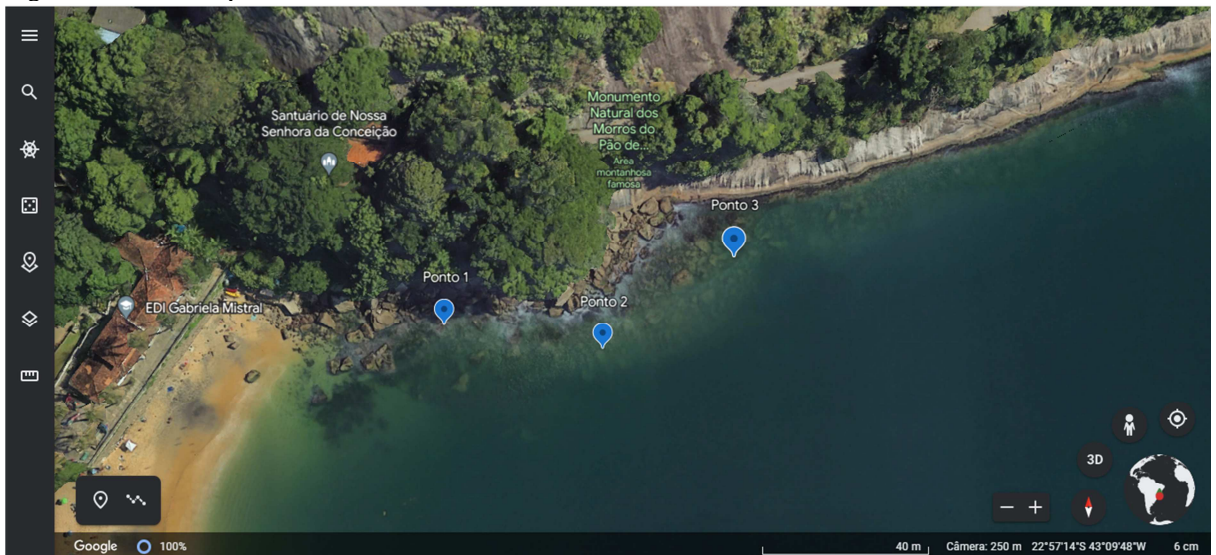


Nota: Sinalização da praia em vermelho.

Fonte: Google Earth, 2023.

Matrizes de ouriços-do-mar foram coletadas em três pontos possíveis de acesso no costão rochoso esquerdo (Figura 4) da Praia Vermelha, nas coordenadas de latitude -  $22^{\circ}57'23.84''$  S, e longitude  $-43^{\circ}09'47.89''$  O, localizada na cidade do Rio de Janeiro, próximo à entrada da Baía de Guanabara por onde transita a maior parte das embarcações que chegam ao estado do Rio de Janeiro.

Figura 4 - Costão esquerdo da Praia Vermelha.



Nota: Observar os três pontos de coletas destacados de acordo com as condições do mar.

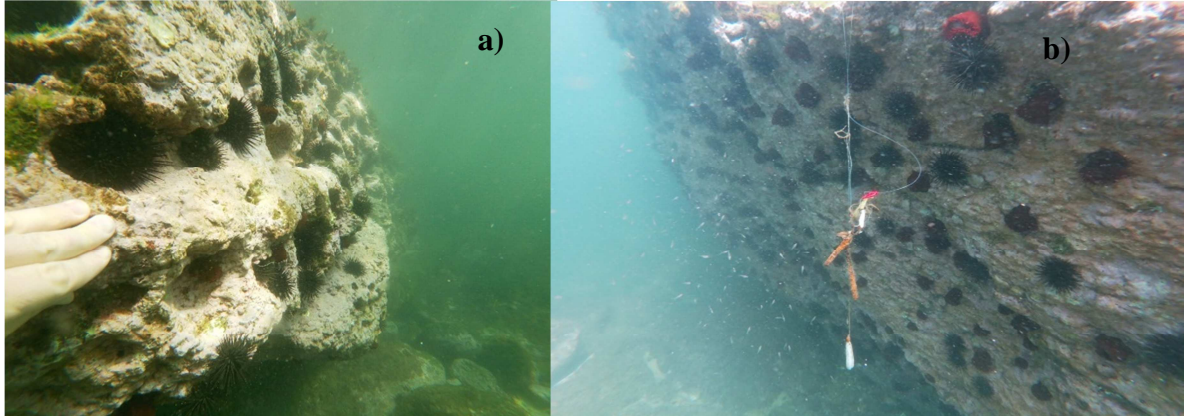
Fonte: Google Earth, 2023.

Possui cerca de 100 metros de comprimento e está entre dois costões rochosos que se diferenciam na complexidade e declividade (Silva, 2010). Possui uma profundidade variando

entre 2 e 10 metros e normalmente a temperatura da água é em torno de 18 °C à 24 °C, tendo uma temperatura média de 23,7 °C e a umidade relativa é de 78% ao nível do mar (Bastos, 2009).

*A. lixula* é muito abundante e está distribuída entre os 0,5 m e 5,0 metros de profundidade (Figura 5).

Figura 5 - Coleta de *A. lixula* no costão esquerda da Praia Vermelha, Urca.

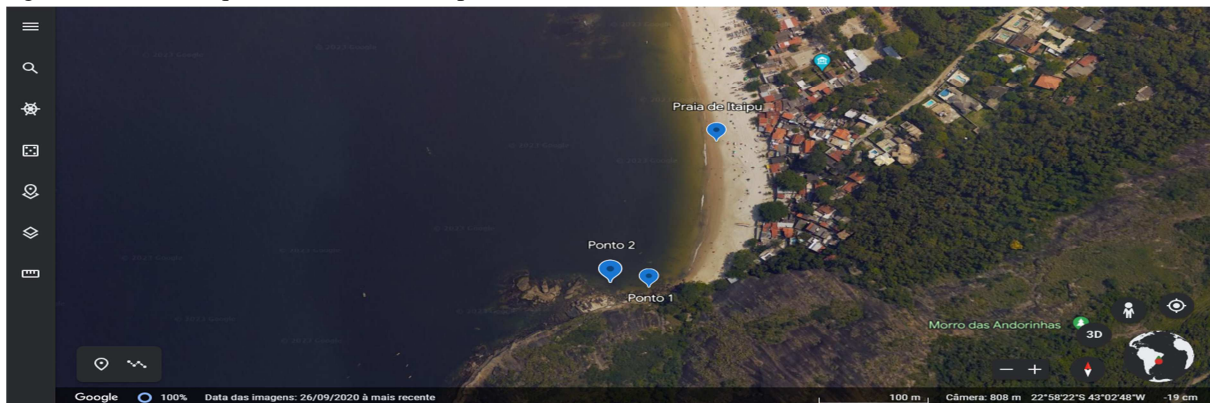


Legenda: Fotografia 5(a): Coleta de *A. lixula* a 3 m de profundidade da superfície. Fotografia 5(b): Extensão do costão com comunidades de *A. lixula* com artefato de pesca descartado de forma irregular.

Fonte: Fellipe Garcia Leite, Laboratório de Ecotoxicologia Marinha, FAOC/UERJ, 2022.

A Praia de Itaipu está localizada na região oceânica da cidade de Niterói, com coordenadas em latitude -22.9667 22° 58' 0" S, e longitude -43.0667 43° 4' 0" O, no bairro de Itaipu, tendo aproximadamente 1000 metros de extensão. Ela é a única praia oceânica do município a ser caracterizada por suas águas bastante calmas, que ocorre devido a formação de enseada. O costão à esquerda (Figura 6) é delimitada pelo Morro das Andorinhas, que faz limite com a Praia de Itacoatiara.

Figura 6 - Costão esquerdo da Praia de Itaipu.



Nota: Observar os dois pontos de coletas destacados de acordo com as condições do mar.

Fonte: Google Earth, 2023.



### 3.2 Coleta e aclimação dos ouriços em laboratório

As coletas foram realizadas mensalmente entre os meses de fevereiro de 2022 a abril de 2023 com periodicidade marcada para a primeira quinzena de cada mês, com o apoio de um mergulhador parceiro do Laboratório de Ecotoxicologia Marinha (FAOC/UERJ) (LABTOX), com mergulho em apneia, em profundidade média de 3 metros.

Em mínimo, 20 animais adultos foram coletados e transportados para o LABTOX em caixas de isopor refrigeradas.

Após a chegada ao laboratório com temperatura ambiente em 22°C, os animais eram condicionados para ambientação em dois aquários de vidro, com capacidade de 20 litros cada, com água do mar (natural ou artificial) em temperatura média de 20°C, aeradores elétricos, filtros de carvão ativado e lã acrílica. Um terceiro aquário de 10 litros foi utilizado como “aquário de apoio” (aquário “H” ou “hospital” para animais que respondessem de forma negativa aos tratamentos dos bioensaios (Figura 7).

Figura 7 - Aquários de vidro para condicionamento dos ouriços-do-mar em laboratório



Nota: Aquário H utilizado como apoio pra animais doentes ou que não responderam de forma positiva aos ensaios.

Fonte: A autora, 2022.

Todos os animais foram monitorados durante 48 horas após o fim dos ensaios, e os que apresentavam boa saúde, se fixando bem às paredes do aquário e com perda mínima de espinhos e se alimentando perfeitamente, eram devolvidos ao seu habitat natural.

### 3.3 Metodologia de análises

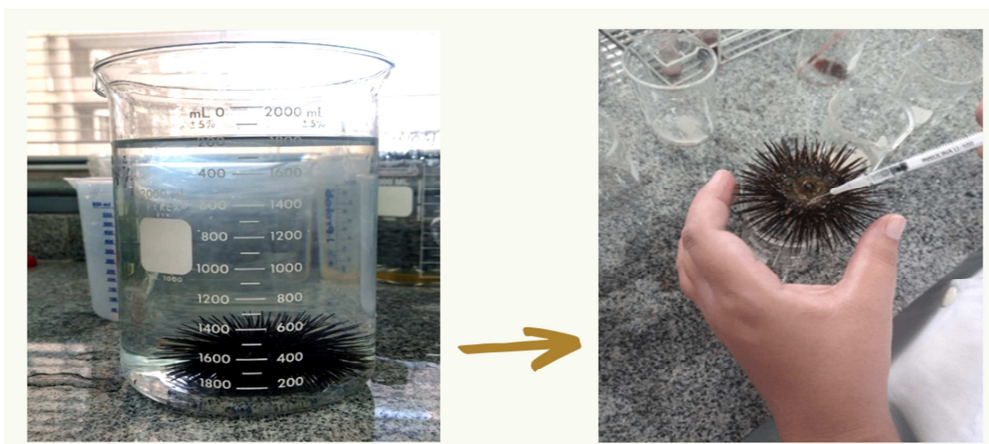
#### 3.3.1 Biometria

##### 3.3.1.1 Índice de condição adaptado para ouriço-do-mar

Como método de medição e pesagem da massa corporal da matriz de ouriço a ser induzida, foi feita a pesagem dos animais através da balança semi-analítica com precisão de até 0,05 g e medição do volume de cada indivíduo através do método de deslocamento de volume. Utilizando o béquer de 2000 mL, foi colocado água até a faixa de 1800 mL, introduzido separadamente cada ouriço no béquer e então, o valor final do deslocamento da água que foi verificado através das provetas graduadas, foi registrado em planilhas.

Após isto, é feita a injeção de 150  $\mu$ L da solução de KCl 0,5 M e após cinco minutos, com o animal tendo emitido ou não gametas, é refeita a pesagem descontando a massa convertida de 150  $\mu$ L de KCl (Figura 8). Para que assim, seja possível conhecer a massa do animal antes e depois da emissão dos gametas.

Figura 8 - Deslocamento de volume e injeção de KCl a 150  $\mu$ L através de agulhas hipodérmicas aplicadas na membrana peristomial de *A. lixula*

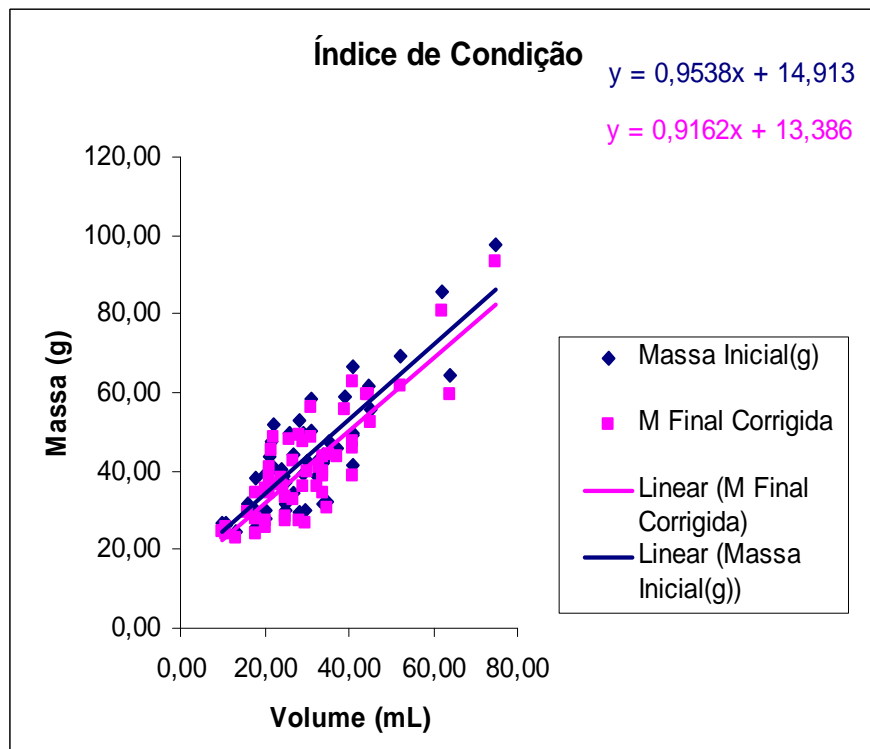


Nota: Volume de deslocamento medido em béquer de 2000 mL e em seguida a aplicação de KCl a 150  $\mu$ L.

Fonte: A autora, 2022.

Ao final dos experimentos, estes resultados foram plotados em um gráfico de três variáveis, sendo elas: volume fixo, peso de massa inicial e peso de massa final após a desova. As retas foram ajustadas pelo método dos mínimos quadrados, utilizando o software Excel, formando duas linhas, uma com valores mais altos (considerados os animais ovados) e uma com valores mais baixos (para animais que não desovaram), como ocorreu com *E. lucunter* quando esse teste foi realizado no laboratório (Figura 9).

Figura 9 - Gráfico do índice de condição para *Echinometra lucunter*



Fonte: Bastos, 2009. Laboratório de Ecotoxicologia Marinha FAOC/UERJ.

### 3.3.1.2 Indução de extração de gametas nas matrizes dos organismos testados

Foi aplicada a técnica de indução química na extração de gametas em ouriços-do-mar, sendo realizada através da aplicação de KCl 0,5 M na área das gônadas dos ouriços, feita através do posicionamento de agulhas hipodérmicas na membrana peristomial dos animais.

Foram realizadas duas aplicações, uma oposta a outra. Após injetar a substância, o animal foi agitado suavemente para assegurar que a solução atinja as cinco gônadas. A quantidade a ser injetada dependeu da massa e volume de cada animal. Para a espécie *A.*

*lixula*, foi usado volume de 150  $\mu\text{L}$  de KCl como uma adequação do estudo original Araújo (2018).

### 3.3.1.3 Fertilização *in vitro* e desenvolvimento embrionário à larva pluteus

A fertilização foi realizada a partir de soluções de óvulos e espermatozoides em água salina artificial para um melhor desenvolvimento dos embriões a pluteus e livres de qualquer contaminação oriundas do ambiente marinho.

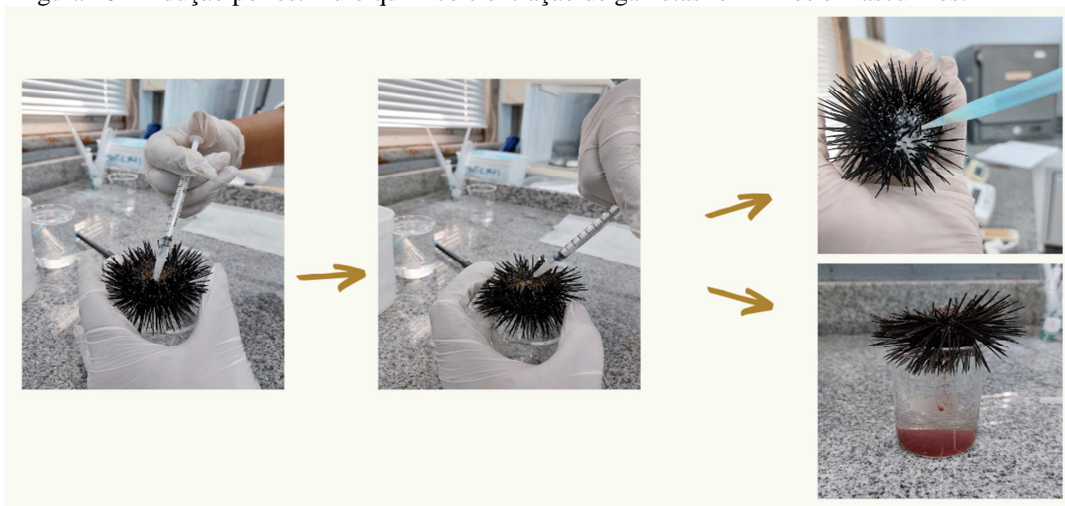
Preparação da água salina artificial (solução de gametas e lavagem dos óvulos):

- a) A água artificial teve sua salinidade igual à do mar nos aquários dos ouriços-do-mar, entre 33 psu a 34 psu;
- b) para o preparo de 33 psu de salinidade é preciso pesar 36g de sal marinho (Ocean Tech) na balança semi-analítica para 1 L de água destilada.

Extração de gametas:

- a) Para a extração de gametas femininos foi utilizado um béquer de 100 mL com água salina artificial até a faixa dos 100 mL (Figura 10);
- b) a extração de gametas masculinos foi realizada através da pipeta automática 500  $\mu\text{L}$  diretamente do orifício aboral do animal e transferido para um béquer de 100 mL sobre recipiente refrigerado com cubos de gelo (Figura 10).

Figura 10 - Indução por estímulo químico e extração de gametas femininos e masculinos.



Fonte: A autora, 2022.

#### Lavagem dos óvulos:

- a) Para facilitar a fertilização, a membrana vitelínica dos óvulos foi desintegrada através de lavagens com água salina artificial: os óvulos coletados em béquer de 100 mL de água salina e foram filtrados em peneira de malha com mesh de 0,62  $\mu\text{m}$ , adicionando mais 100 mL de água salina em béquer de 500 mL;
- b) após a filtragem, os óvulos permaneceram em decantação por 30 minutos;
- c) os óvulos decantados foram coletados através de pipeta automática de 500  $\mu\text{L}$  (descartando os óvulos sobrenadantes) e postos em béquer de 500 mL para a solução de óvulos.

#### Solução de óvulos:

- a) Em béquer de 500 mL foi adicionado a quantidade de 1 mL de óvulos lavados para 200 mL de água salina artificial;
- b) o volume de água salina artificial foi testada para 50 mL, 100 mL e otimizada para 200 mL.

#### Solução de espermatozoides:

- a) Em béquer de 100 mL foi adicionado 0,5 mL de líquido espermático para 24,05 mL de água salina artificial.

#### Solução de fertilização:

- a) Solução espermática à 25 mL foi acrescentada à solução de óvulos em béquer de 500 mL;
- b) após a homogeneização da solução de fertilização, foi preciso aguardar por 1 hora na incubadora à 25 °C para que o desenvolvimento embrionário celular chegasse ao menos a divisão de duas células. Esta etapa foi constatada por visualização microscópica;
- c) A incubação foi testada em 27 °C, 26 °C e otimizada à 25 °C.

Separação das células fertilizadas para desenvolvimento à pluteus:

- a) Com o auxílio da câmara de Sedwick-Rafter e observação microscópica, 100 células em desenvolvimento celular puderam ser separadas para cada réplica do experimento, através da pipeta de Pasteur de vidro em quantidade de 1 mL de solução de fertilização, e transportadas para tubos de ensaio à 3 mL de água salina artificial;
- b) os tubos de ensaio com cada réplica do experimento, com o total de 4 mL (1 mL solução de ovos fertilizados + 3 mL de água salina artificial) foram incubados em temperatura à 25°C, otimizados de 36 horas para 42 horas para o desenvolvimento à pluteus.

#### 3.3.1.4 Análise microscópica do desenvolvimento embrionário

Após o período de 42 horas de incubação na estufa, o material contido nos tubos de ensaio foi pipetado em 1 mL na câmara de Sedwick-Rafter, e analisado no microscópio da marca Nikon e modelo H550S. Todo o material de cada tubo foi analisado nas objetivas de 40x e 100x, respeitando a quantidade máxima de 1 mL para cada observação.

Para a quantificação do resultado dos experimentos foram organizados 5 estágios de desenvolvimento: óvulos, ovo fecundado, desenvolvimento embrionário, prisma e pluteus; de acordo com estudos de Máximo et al. (2008).

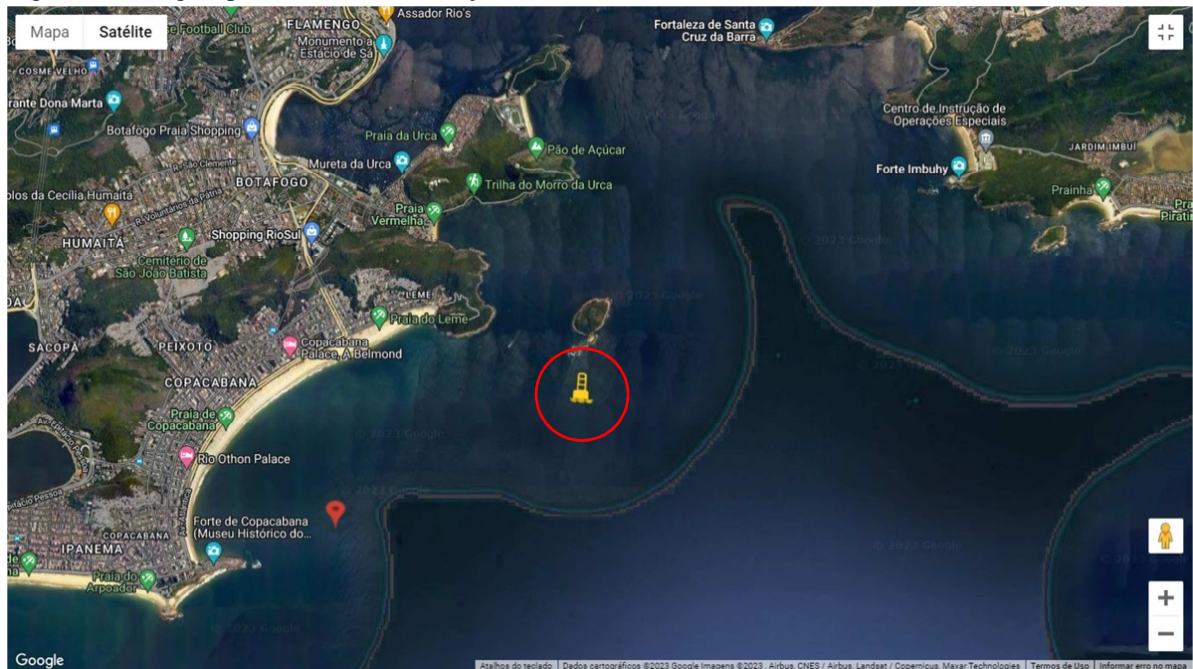
Os estágios de desenvolvimento foram quantificados a cada observação de 100 células e plotados em planilhas de observação.

### 3.3.2 Experimentação complementar de desova

#### 3.3.2.1 Análise de dados de temperatura da água do mar

Para esta análise, foram utilizados dados oceanográficos da boia RJ4 (22°58'18" S / 43°9'1" O) localizada próxima a Praia Vermelha, do Sistema de Monitoramento da Costa Brasileira (SIMCosta), que foram acessados através do site do programa (Figura 11).

Figura 11 - Imagem por satélite da localização da boia RJ4 SIMCosta.



Nota: Boia RJ4 SIMCosta sinalizada em vermelho.

Fonte: [simcosta.furg.br](http://simcosta.furg.br). Acesso em 2023.

Foram baixados dados de 28 de agosto de 2017 a 16 de janeiro de 2023. Entretanto, foram selecionados somente os dados referentes aos meses em que houveram experimentos com *A. lixula* no laboratório de Ecotoxicologia Marinha da FAOC/UERJ, em setembro, novembro e dezembro de 2017; janeiro, fevereiro e abril de 2018; de fevereiro a dezembro de 2022 e janeiro de 2023.

Em seguida, os dados foram tratados e separados por planilhas utilizando o software Excel.

Foi calculada a média semanal da temperatura da água do mar, com o intuito de analisar se existiam diferenças significativas entre as médias semanais dos experimentos realizados por Araújo (2018) e o estudo atual.

Para as temperaturas médias semanais referentes ao primeiro estudo com *A. lixula*, foram utilizadas as temperaturas médias diárias dos 7 primeiros dias de cada mês, e com esses dados foram realizadas as médias da semana em que obtivemos a coleta dos animais.

No entanto, o tratamento dos dados referentes ao estudo atual foi realizada a partir da temperatura média diária da data em que houve a coleta dos ouriços-do-mar e para a realização da temperatura média semanal foram utilizados os dados de 7 dias anteriores à data da coleta. Todas as médias citadas anteriormente foram calculadas através do Excel.

### 3.3.2.2 Experimento de avaliação de volume por dessecação

Para os testes de avaliação de volume de cada animal por dessecação, foram utilizados 14 ouriços-do-mar coletados na Praia Vermelha.

Os animais tiveram dois tipos de tratamentos na avaliação de perda de massa por evaporação de água, de 5 e 15 minutos para que cada animal pudesse dessecar ao ar, verificando o seu peso inicial e peso final após a cada tipo de tratamento

### 3.3.2.3 Experimento de comparação entre os períodos do estudo

Os dados de desovas foram comparados com os experimentos realizados por Araújo (2018) entre os meses de maio, junho, agosto, setembro, novembro e dezembro de 2017; janeiro, fevereiro e abril de 2018 e os experimentos reproduzidos entre os meses de fevereiro a dezembro de 2022, e entre janeiro a abril de 2023, seguindo pelas quatro estações climáticas do ano: verão, outono, inverno e primavera.



#### 3.3.2.4 Experimento de efeito da água marinha artificial e água marinha natural

Após a chegada dos animais secos no laboratório, quatro grupos de ouriços foram separados em quatro aquários de 20 litros para os experimentos de observação de desova em animais aclimatados em dois diferentes tipos de águas: água marinha artificial e água marinha natural.

16 animais coletados na Praia Vermelha foram aclimatados em água marinha artificial e 16 em água marinha natural.

Para os animais coletados na Praia de Itaipu, 19 ouriços foram aclimatados em água marinha artificial e 19 em água marinha natural.

#### 3.3.2.5 Experimento de efeito de local de coleta

Foi realizada uma experimentação comparativa entre duas praias distintas, Praia Vermelha, localizada na Urca, e a Praia de Itaipu, em Niterói, na avaliação dos períodos reprodutivos de *A. lixula* de dois habitats diferentes.

32 animais foram coletados na Praia Vermelha, enquanto 38 animais foram coletados na Praia de Itaipu. Todos os animais foram transportados até o laboratório e aclimatados em diferentes aquários, onde permaneceram até o final dos ensaios.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Método não destrutivo *A. lixula*

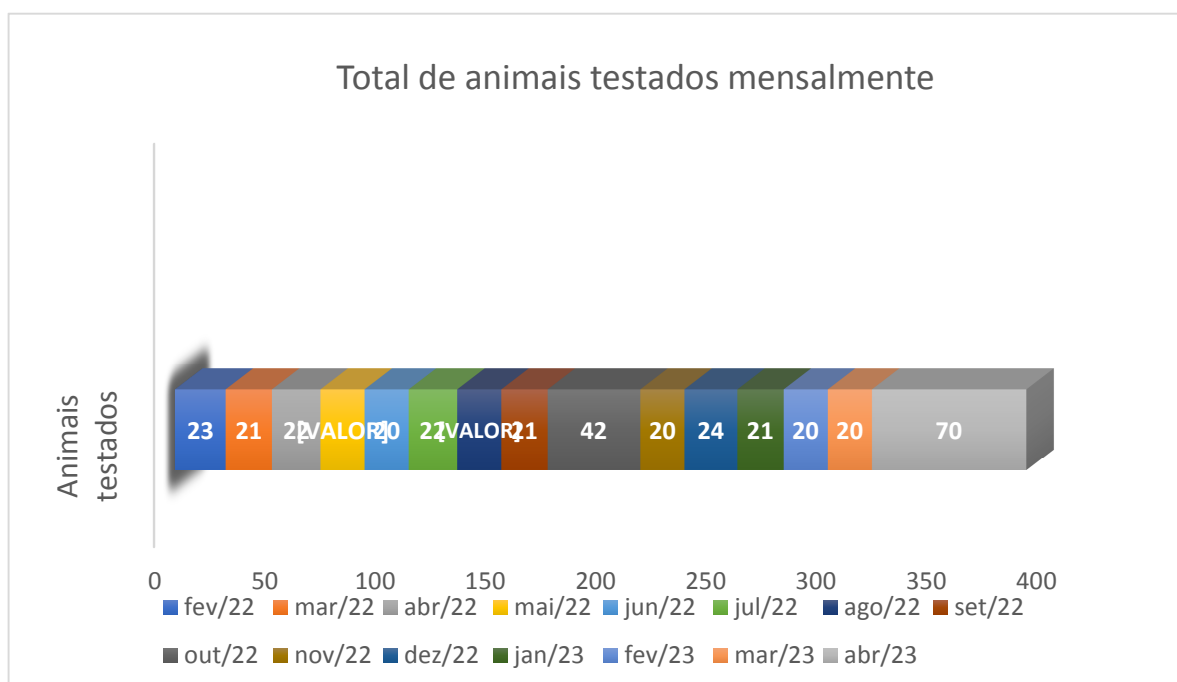
#### 4.1.1 Eficácia do método não destrutivo

Durante 15 meses, entre os meses de fevereiro de 2022 a abril de 2023, foram realizados mensalmente as experimentações do método não destrutivo para *A. lixula*, utilizando o mínimo de 20 animais, respeitando o período da primeira quinzena de cada mês (Gráfico 3).

386 ouriços-do-mar receberam o método químico otimizado. Deste montante, apenas dois animais não sobreviveram após os ensaios, enquanto 384 do total de espécimes testados se mantiveram saudáveis e devolvidos ao seu habitat natural após os ensaios (Gráfico 4).

A validação da saúde dos animais se baseou em observação comportamental, onde se avaliou a sua boa locomoção, alimentação, fixação às paredes dos aquários e mínima perda de espinhos após dois dias de observação em laboratório.

Gráfico 3 - Quantitativo de animais utilizados mensalmente em cada experimentação



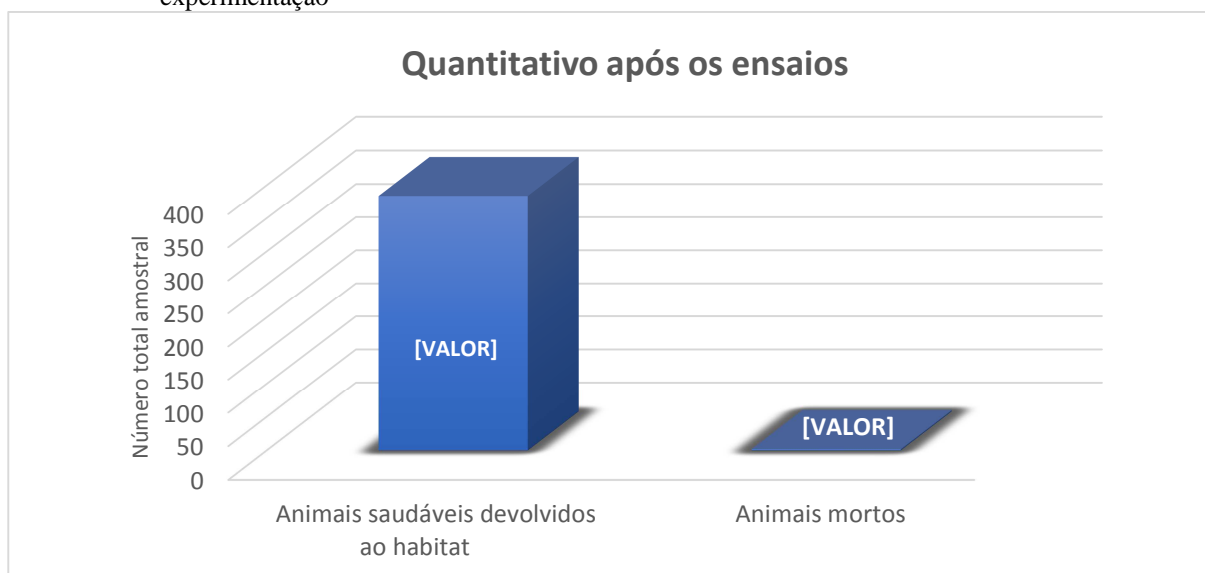
Fonte: A autora, 2023.

Os experimentos mensais foram realizados com um número amostral de no mínimo 20 animais, tendo os meses de outubro de 2022 e abril de 2023 um número amostral bem maior devido aos experimentos extras realizados nestes períodos.

Para o mês de outubro de 2022 foram realizados dois experimentos, contendo 22 e 20 animais respectivamente.

Em abril de 2023 foram realizados quatro experimentos, que comparamos os testes de desovas entre duas praias distintas, Praia Vermelha e a Praia de Itaipu, com aclimação dos ouriços em água do mar artificial e em água do mar natural, coletada diretamente da Praia Vermelha. Os animais coletados na Praia de Itaipu foram utilizados somente nos experimentos dos mês de abril de 2023.

Gráfico 4 - Quantitativo de animais devolvidos saudáveis ao habitat natural e animais mortos após a experimentação

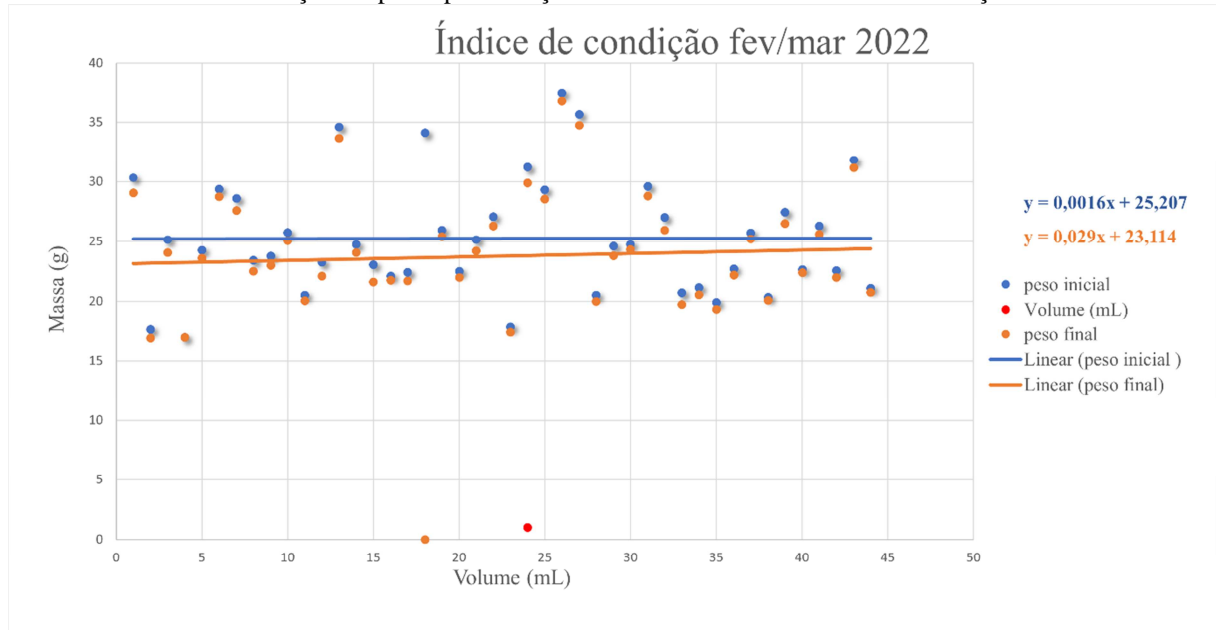


Fonte: A autora, 2023.

#### 4.1.2 Dados índice de condição

Dados do índice de condicionamento realizado através dos valores de massa inicial, medida de volume de deslocamento e valores da massa final foram contabilizados e agrupados em gráficos de dispersão de dois em dois meses para uma melhor visualização (Gráficos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12).

Gráfico 5 - Índice de condição adaptado para ouriços-do-mar dos meses de fevereiro e março de 2022



Fonte: A autora, 2023.

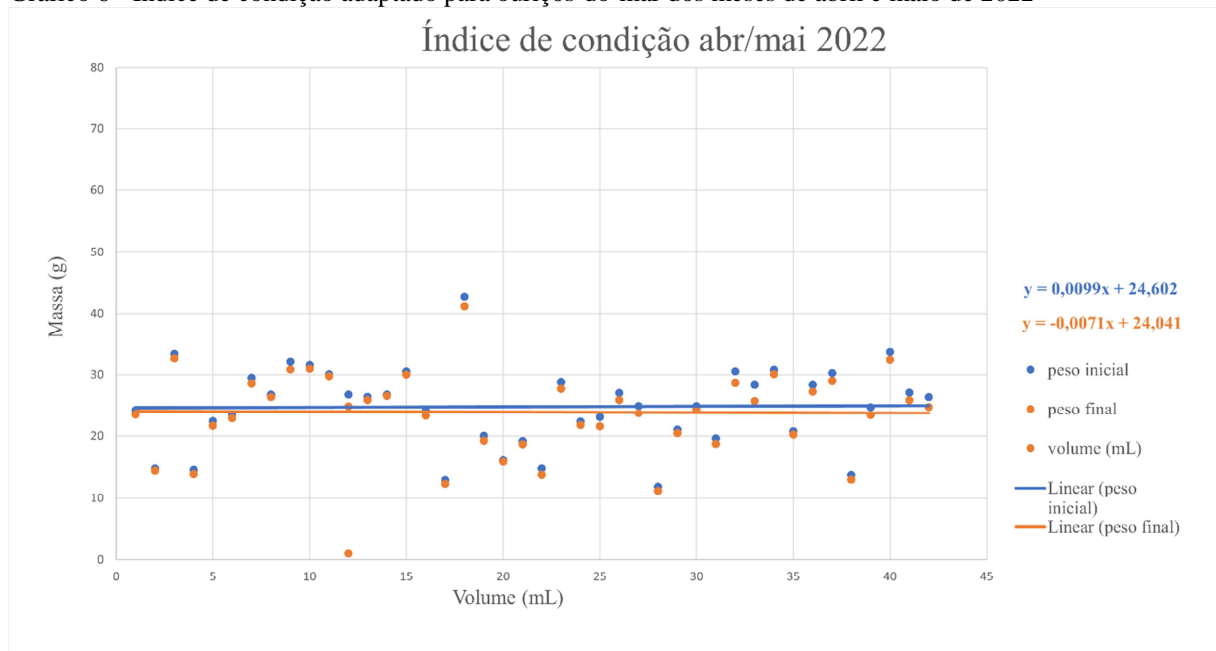
Dados expressados no Gráfico 5 mostram a emissão de gametas para os animais coletados entre os meses de fevereiro e março de 2022, indicados pelos pontos azuis e laranjas que sinalizam os valores de peso de massa inicial e o peso de massa final de cada animal após serem testados por indução química na extração de gametas, que se distanciam entre eles, significando valores expressivos de perda de massa durante as desovas. Estes pontos demonstrativos de animais ovados sobrepõem ao linear das retas que também se distanciam entre elas.

Para expressar os dados de animais que não desovaram entre os meses, os pontos tendem a estarem mais próximos, demonstrando um menor valor de perda de massa de cada animal, expressando pouca ou nenhuma desova. Nesse caso, a diferença de massa é devida a perda de água (ver experimento de dessecação adiante no tópico 4.1.3.1).

Dos 44 animais utilizados para os testes entre os meses de fevereiro e março, 100% dos animais tiveram sobrevivência e foram devolvidos ao seu habitat natural após os ensaios.

Os testes de reprodução foram realizados somente para o mês de março, enquanto a metodologia ainda estava em desenvolvimento no mês de fevereiro, otimizando apenas os testes de indução química.

Gráfico 6 - Índice de condição adaptado para ouriços-do-mar dos meses de abril e maio de 2022



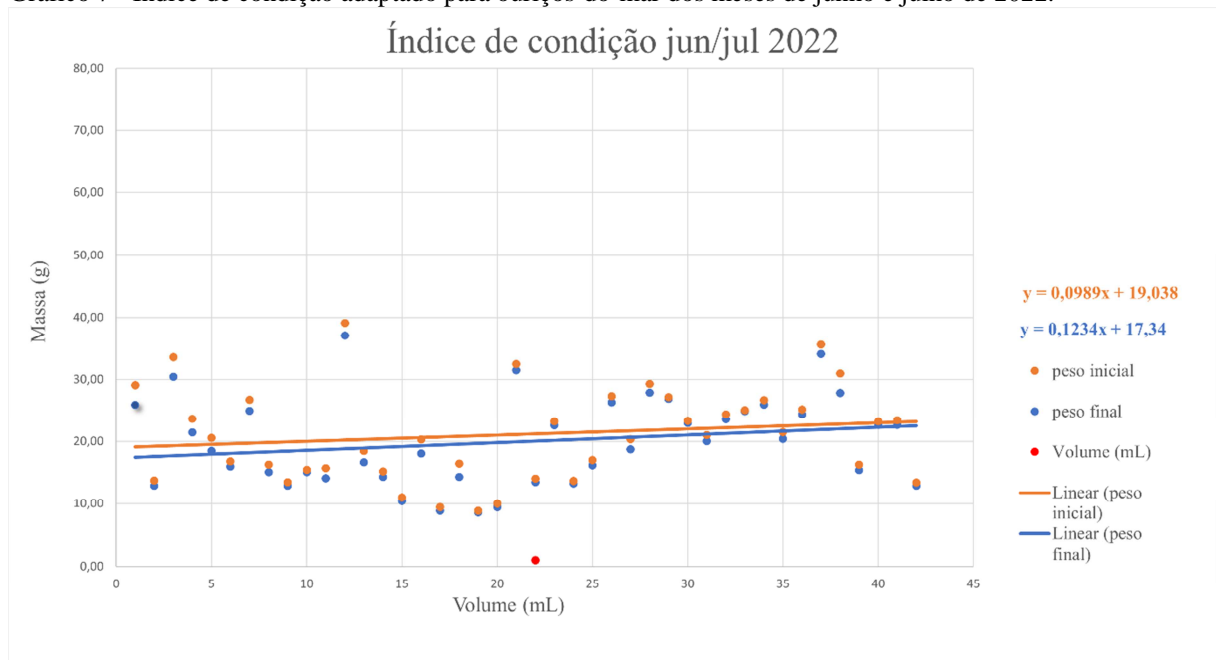
Fonte: A autora, 2023.

O Gráfico 6 representa a emissão de gametas para os animais coletados entre os meses de abril e maio de 2022, indicados pelos pontos azuis e laranjas que se distanciam entre eles, significando valores expressivos de perda de massa durante as desovas. Estes pontos demonstrativos de animais ovados sobrepõem ao linear das retas que também se distanciam entre elas, caracterizando assim, os valores de animais que desovaram durante os experimentos.

Pontos azuis e laranjas sinalizados mais próximos representam o valor de cada animal que expressou pouca ou nenhuma desova. Nesse caso, a diferença de massa é devida a perda de água (ver experimento de dessecação adiante no tópico 4.1.3.1).

Dos 42 animais testados durante os meses de abril e maio de 2022, todos tiveram sobrevida e foram devolvidos ao seu habitat natural após os ensaios.

Gráfico 7 - Índice de condição adaptado para ouriços-do-mar dos meses de junho e julho de 2022.



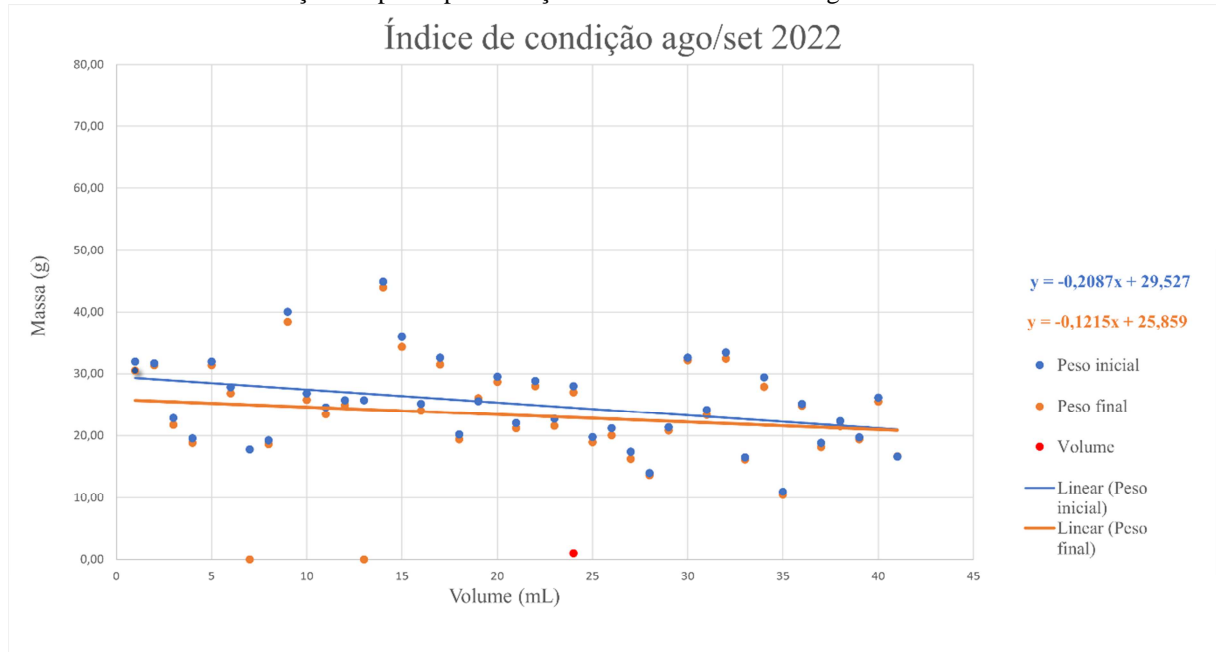
Fonte: A autora, 2023.

De acordo com os dados expressados no Gráfico 7, ocorreu a emissão de gametas para os animais coletados entre os meses de junho e julho de 2022, indicados pelos pontos azuis e laranjas que se distanciam entre eles, significando valores expressivos de perda de massa durante as desovas. Estes pontos demonstrativos de animais ovados sobrepõem ao linear das retas que também se distanciam entre elas, caracterizando assim, os valores de animais que desovaram durante os experimentos.

Para os animais que não desovaram ou apresentaram desova não significativa durante este período dos testes, os pontos tendem a se aproximarem entre eles, seguindo pelo linear mais próximos entre aos pesos inicial e final de cada animal não ovado. Nesse caso, a diferença de massa é devida a perda de água (ver experimento de dessecação adiante no tópico 4.1.3.1).

Dos 42 animais testados durante os meses de junho e julho de 2022, todos tiveram sobrevida e foram devolvidos ao seu habitat natural após os ensaios.

Gráfico 8 - Índice de condição adaptado para ouriços-do-mar dos meses de agosto e setembro de 2022



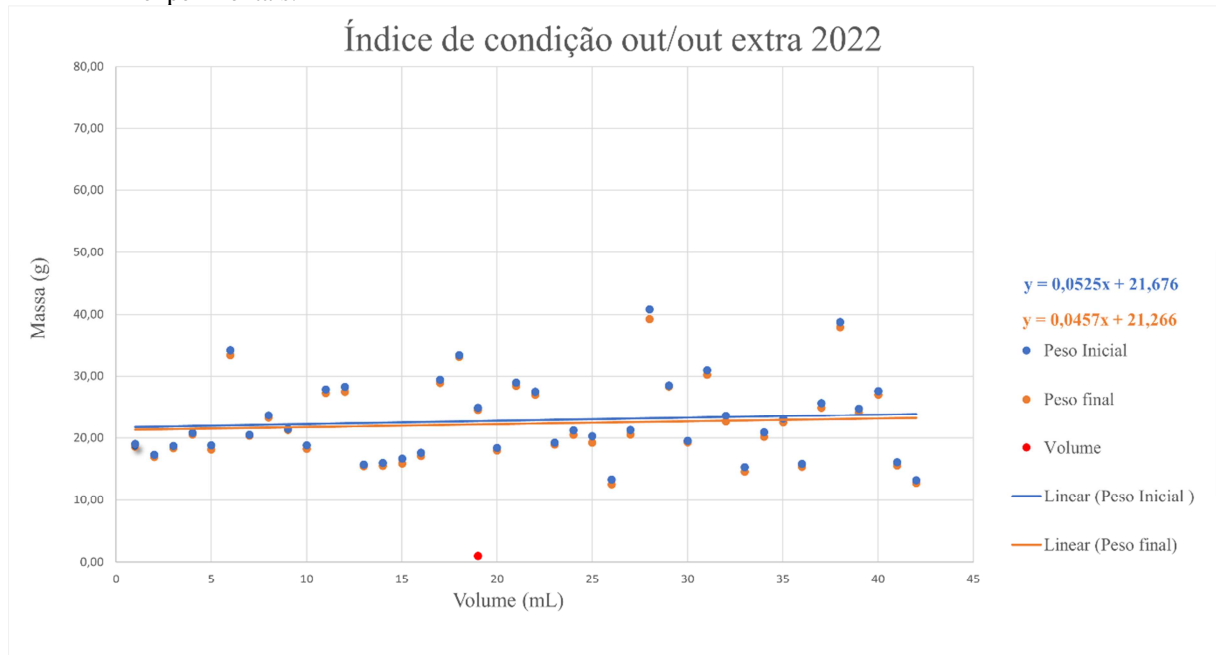
Fonte: A autora, 2023.

Dados expressados no Gráfico 8 mostram pouca emissão de gametas para os animais coletados no mês de agosto de 2022, indicados pelos pontos azuis e laranjas que se aproximam entre eles, significando valores de pouca ou nenhuma desova, representados pelo baixo valor de perda de massa durante os experimentos. Nesse caso, a diferença de massa é devida a perda de água (ver experimento de dessecação adiante no tópico 4.1.3.1).

Para os animais coletados em setembro de 2022, os valores de desova aumentaram, sendo demonstrados pelo distanciamento entre os pontos azuis e laranjas representando cada animal testado, de acordo com o distanciamento dos lineares.

Todos os 41 animais utilizados na experimentação deste período tiveram sobrevivência e foram devolvidos ao seu habitat natural após os ensaios.

Gráfico 9 - Índice de condição adaptado para ouriços-do-mar do mês de outubro de 2022 com dois testes experimentais.



Fonte: A autora, 2023.

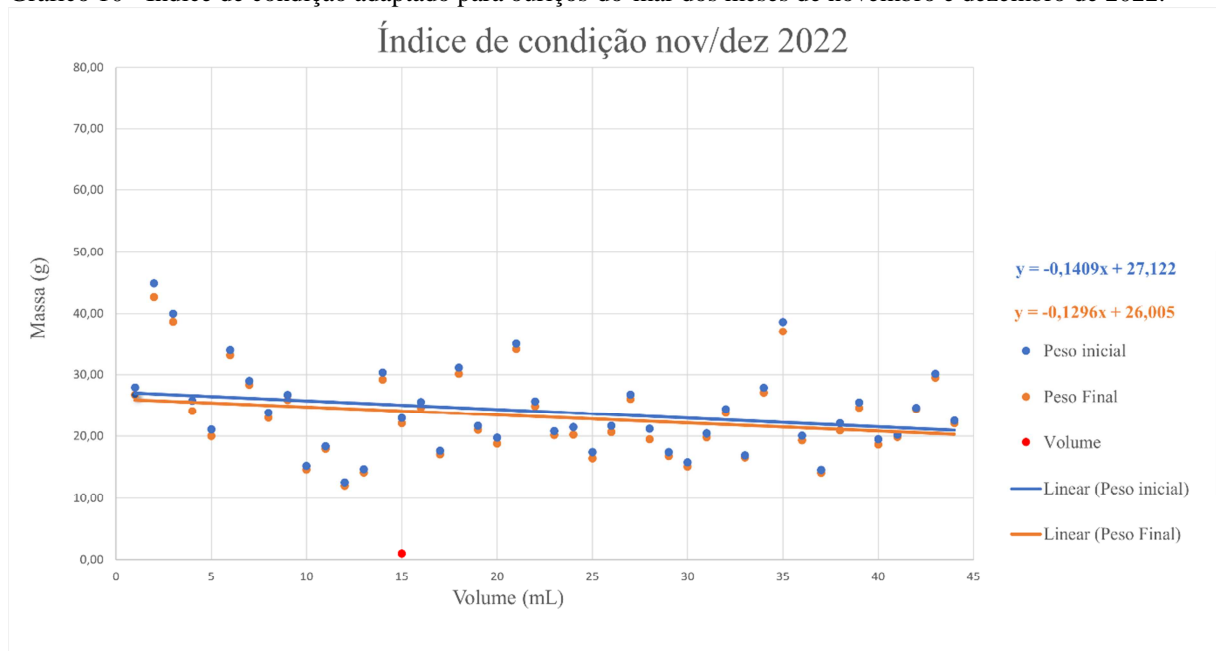
Dados expressados no Gráfico 9 mostram pouca ou nenhuma emissão de gametas para os animais coletados no mês de outubro de 2022, indicados pelos pontos azuis e laranjas que se aproximam entre eles, significando valores de pouca ou nenhuma desova, representados pelo baixo valor de perda de massa durante os experimentos. Nesse caso, a diferença de massa é devida a perda de água (ver experimento de dessecação adiante no tópico 4.1.3.1).

Com duas experimentações de desova para o mês de outubro, os dados mostram que 42 animais utilizados neste período não desovaram regularmente, caracterizando uma queda reprodutiva para a espécie testada, inviabilizando os testes de fecundação e reprodução *in vitro*.

40 animais responderam bem aos testes, sendo devolvidos ao seu habitat natural. No entanto, dois animais não resistiram aos ensaios, chegando a óbito após a observação em aquário.



Gráfico 10 - Índice de condição adaptado para ouriços-do-mar dos meses de novembro e dezembro de 2022.



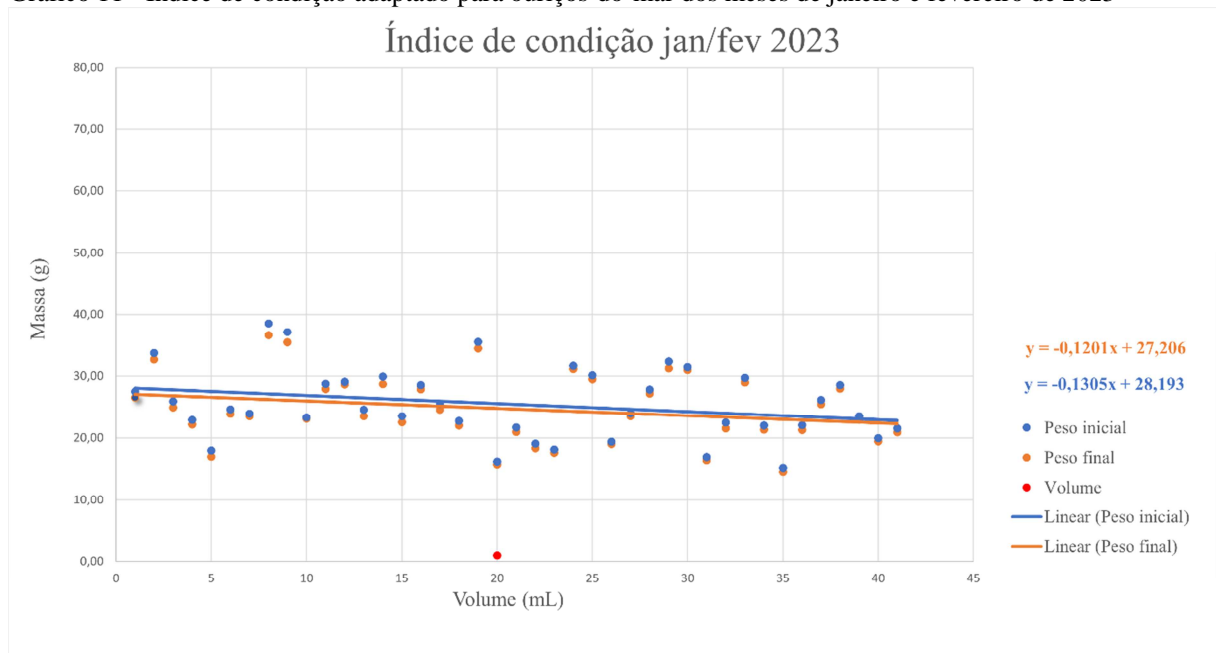
Fonte: A autora, 2023.

O Gráfico 10 demonstra pouca ou nenhuma emissão de gametas para os animais coletados nos meses de novembro e dezembro de 2022, indicados pelos pontos azuis e laranjas que se aproximam entre eles, significando valores de pouca ou nenhuma desova, representados pelo baixo valor de perda de massa durante os experimentos. Nesse caso, a diferença de massa é devida à perda de água (ver experimento de dessecação adiante no tópico 4.1.3.1).

Os dados expressados apresentam nenhuma desova regular dos animais para os meses de novembro e dezembro, inviabilizando os testes de fecundação e reprodução *in vitro*.

Dos 44 animais utilizados nos testes de indução química, todos se mantiveram saudáveis e foram devolvidos ao seu habitat natural.

Gráfico 11 - Índice de condição adaptado para ouriços-do-mar dos meses de janeiro e fevereiro de 2023



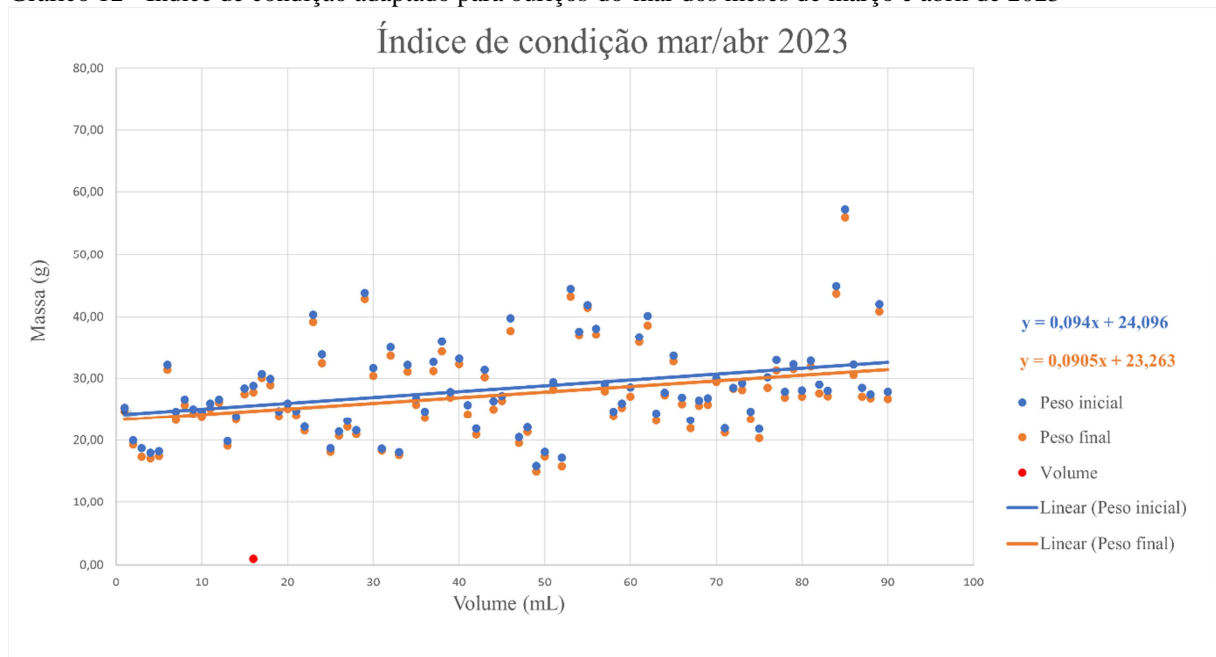
Fonte: A autora, 2023.

Dados representados no Gráfico 11 demonstram nenhuma emissão de gametas para os animais coletados no meses de janeiro e fevereiro de 2023, indicados pelos pontos azuis e laranjas que se aproximam entre eles, significando valores de pouca ou nenhuma desova, representados pelo baixo valor de perda de massa durante os experimentos. Nesse caso, a diferença de massa é devida a perda de água (ver experimento de dessecação adiante no tópico 4.1.3.1).

Os dados expressados apresenta nenhuma desova regular dos animais para os meses de janeiro e fevereiro, inviabilizando os testes de fecundação e reprodução *in vitro*.

Dos 41 animais utilizados nos testes de indução química, todos se mantiveram saudáveis e foram devolvidos ao seu habitat natural.

Gráfico 12 - Índice de condição adaptado para ouriços-do-mar dos meses de março e abril de 2023



Fonte: A autora, 2023.

Dados expressivos no Gráfico 12 demonstram nenhuma emissão de gametas para os animais coletados no meses de março e abril de 2023, indicados pelos pontos azuis e laranjas que se aproximam entre eles, significando valores de pouca ou nenhuma desova, representados pelo baixo valor de perda de massa durante os experimentos. Nesse caso, a diferença de massa é devida a perda de água (ver experimento de dessecação adiante no tópico 4.1.3.1).

Os dados obtidos não apresentaram nenhuma desova regular dos animais para os meses de janeiro e fevereiro, inviabilizando os testes de fecundação e reprodução *in vitro*.

90 animais foram utilizados nos testes de indução química, e todos se mantiveram saudáveis após os ensaios e foram devolvidos ao seu habitat natural.

Uma discussão mais detalhada sobre as possíveis variáveis que implicaram nos experimentos de desova será explicada no tópico 4.1.3 a seguir.

### 4.1.3 Experimentos complementares de desova

#### 4.1.3.1 Efeito de dessecação

Os animais utilizados na experimentação de dessecação tiveram seus pesos iniciais e finais comparados aos tempos em que foram submetidos ao dessecamento de 5 minutos e 15 minutos cada, como mostram as Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Teste de avaliação de volume por dessecação por 5 minutos ao ar

<b>Animal</b>	<b>Peso Inicial (g)</b>	<b>Peso Final (g)</b>	<b>Peso do KCl (g)</b>	<b>Perda de volume de água (g)</b>
1	29,80	29,45	0,155	0,195
2	33,90	33,25	0,155	0,495
3	24,45	24,25	0,155	0,045
4	27,35	26,95	0,155	0,245
5	27,75	27,40	0,155	0,195
6	18,85	18,60	0,155	0,095
7	23,90	23,40	0,155	0,345
8	24,05	23,95	0,155	-0,055
9	23,95	23,50	0,155	0,295
10	22,40	22,05	0,155	0,195
11	30,35	30,00	0,155	0,195
12	28,30	27,70	0,155	0,445
13	20,50	20,15	0,155	0,195
14	18,25	17,80	0,155	0,295

Nota: Pesagem para observação de perda de massa d'água por evaporação.

Tempo de evaporação: 5 minutos ao ar.

Fonte: A autora, 2023.

Os testes de dessecação foram realizados a partir da diferenciação entre os valores de massa obtidos após a indução química para cada animal que se mostrou não ovado comparados aos pesos de massa dos animais ovados para o período dos testes. Assim, foi observado que os animais que perderam massa significativa mesmo não estando em período reprodutivo, não havendo nenhuma desova, perderam água durante o processo de pesagem e indução química durante 5 minutos fora dos aquários, explicando a redução no peso final para animais não ovados, que não apresentaram nenhum tipo de desova significativa para os testes.

Tabela 4 - Teste de avaliação de volume por dessecação por 15 minutos ao ar.

<b>Animal</b>	<b>Peso Inicial (g)</b>	<b>Peso Final (g)</b>	<b>Peso do KCl (g)</b>	<b>Perda de volume de água (g)</b>
1	30,00	29,15	0,155	0,695
2	33,65	33,05	0,155	0,445
3	24,00	23,30	0,155	0,545
4	27,15	26,35	0,155	0,645
5	27,75	27,10	0,155	0,495
6	19,10	18,50	0,155	0,445
7	23,90	22,90	0,155	0,845
8	24,10	23,45	0,155	0,495
9	24,15	23,20	0,155	0,795
10	22,15	21,35	0,155	0,645
11	30,60	29,65	0,155	0,795
12	28,20	27,45	0,155	0,595
13	20,80	20,05	0,155	0,595
14	18,00	17,55	0,155	0,295

Nota: Pesagem para observação de perda de massa d'água por evaporação.

Tempo de evaporação: 15 minutos ao ar.

Fonte: A autora, 2023.

O mesmo teste foi realizado com os mesmos animais, desta vez, por 15 minutos de dessecação durante todo o processo de pesagem e indução química e a perda de massa d'água foi observada, mas em escala proporcionalmente maior.

Os testes realizados com tempo de dessecação de 5 e 15 minutos para os mesmos animais comprovaram que durante o processo de pesagem e indução química fora dos aquários há perda de massa d'água para os ouriços-do-mar mesmo que não estejam ovados. Esse foi o caso de todos os animais nessa parte do estudo.

#### 4.1.3.2 Efeito da temperatura da água do mar (SIMCosta)

As médias geradas através da utilização dos dados do SIMCosta (Anexo) foram organizadas em tabelas para uma melhor visualização da comparação entre as médias das temperaturas da água do mar próxima a Praia Vermelha obtidas do experimento de Araújo (2018) e do estudo atual, como mostram nas tabelas a seguir.

Médias semanais da temperatura do mar nas semanas em que ocorreram coletas de ouriços dos meses de setembro, novembro e dezembro de 2017 e de 2022 (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias semanais da temperatura da água do mar em setembro, novembro e dezembro de 2017 e 2022.

	setembro		novembro		dezembro	
<b>Ano</b>	2017	2022	2017	2022	2017	2022
<b>Temperatura</b>	17,64	21,5	19,5	23,85	20,07	21,73

Fonte: A autora, 2023.

Médias semanais da temperatura do mar nas semanas em que ocorreram coletas de ouriços dos meses de fevereiro e abril em 2018 e 2022 e no mês de janeiro de 2018 e 2023 (Tabela 6).

Tabela 6 - Médias semanais da temperatura da água do mar em fevereiro e abril de 2018 e 2022, e janeiro de 2018 e 2023.

	fevereiro		abril		janeiro	
<b>Ano</b>	2018	2022	2018	2022	2018	2023
<b>Temperatura</b>	23,09	22,98	25,73	21,41	24,43	24,19

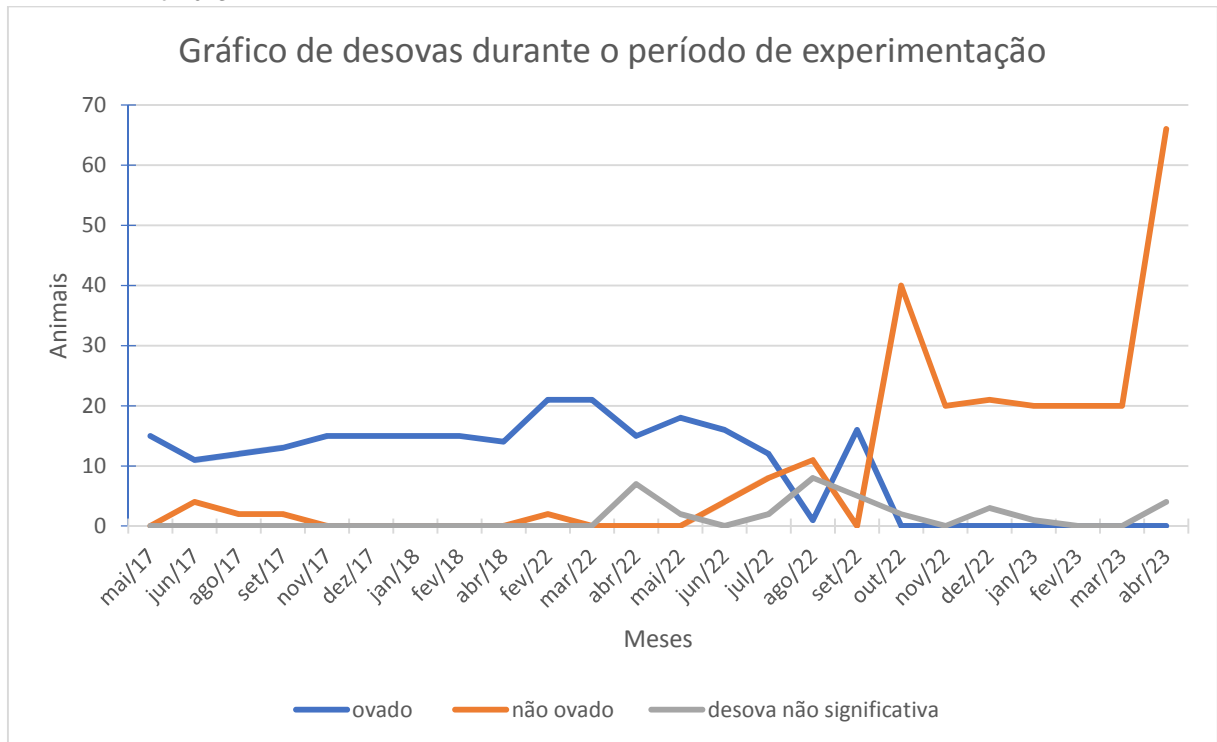
Fonte: A autora, 2023.

De acordo com a tabelas 5 e 6 é possível observar que nos meses de setembro, novembro e dezembro as médias semanais do atual estudo foram significativamente mais altas do que as de 2017. Entretanto, nos meses de fevereiro, abril e janeiro a ocorrência da maior média de temperatura é vista nos dados do estudo de Araújo (2018).

#### 4.1.3.3 Efeito da comparação entre os experimentos pela época do ano

Os dados comparados entre os estudos de 2017, 2018, 2022 e 2023 foram organizadas em gráfico de linhas para uma melhor visualização dos períodos em que os animais testados tiveram suas desovas ao longo dos meses em que o método foi aplicado (Gráfico 13).

Gráfico 13 – Comparação de desovas durante os períodos de experimentação entre os anos de 2017, 2018, 2022 e 2023



Nota: Comperação de animais ovados, não ovados e com desovas não significativas para os experimentos realizados entre os anos de 2017 e 2018 por Araújo (2018), com os experimentos realizados entre 2022 e 2023 do presente estudo.

Fonte: A autora, 2023.

O Gráfico 13 mostra desovas para os estudos de Araújo (2018) realizados entre os meses de maio, junho, agosto, setembro, novembro e dezembro de 2017 e janeiro, fevereiro e abril de 2018, apresentando uma pequena queda na capacidade reprodutiva entre os meses de junho, agosto e setembro de 2017, respectivamente entre os períodos sazonais do final do outono, inverno e início da primavera.

Para os experimentos realizados entre fevereiro de 2022 a abril de 2023, a queda na capacidade reprodutiva se deu a partir de junho de 2022 e se estendeu até abril de 2023, passando pelos períodos sazonais do final do outono, inverno, primavera, verão e início do outono de 2023, correspondendo a uma variação de animais ovados ou não comparados aos mesmos períodos sazonais em épocas diferentes.

#### 4.1.3.4 Efeito da água marinha natural e artificial e efeito de local de coleta

Não houve desova para todos os 32 animais testados em água marinha artificial e água marinha natural, coletados na Praia Vermelha, na Urca, em abril de 2023. Ambos os animais tratados nos diferentes tipos de águas não emitiram gametas após a indução química, indicando uma baixa capacidade de reprodução para os testes (Tabela 7).

Tabela 7 - Animais aclimatados em diferentes tipos de águas: marinha natural e água marinha artificial para animais coletados na Praia Vermelha, na Urca, no Rio de Janeiro.

Água marinha natural		Água marinha artificial	
Animal	Desovas	Animal	Desovas
1	Não desovou	1	Não desovou
2	Não desovou	2	Não desovou
3	Não desovou	3	Não desovou
4	Não desovou	4	Não desovou
5	Não desovou	5	Não desovou
6	Não desovou	6	Não desovou
7	Não desovou	7	Não desovou
8	Não desovou	8	Não desovou
9	Não desovou	9	Não desovou
10	Não desovou	10	Não desovou
11	Não desovou	11	Não desovou
12	Não desovou	12	Não desovou
13	Não desovou	13	Não desovou
14	Não desovou	14	Não desovou
15	Não desovou	15	Não desovou
16	Não desovou	16	Não desovou

Nota: Experimento de desova para animais coletados na Praia Vermelha, na Urca, testados em dois tipos diferentes de água para aclimação durante os ensaios.

Fonte: A autora, 2023.

Não ocorreu desova para todos os 38 animais coletados na Praia de Itaipu, em Niterói, em abril de 2023, comprovando que o efeito de lugar de coleta e o tratamento em diferentes tipos de água na aclimação durante os ensaios não se mostrou significativo para o período reprodutivo (Tabela 8).



Tabela 8 - Animais aclimatados em diferentes tipos de águas: marinha natural e água marinha artificial para animais coletados na Praia de Itaipu, em Niterói, no Rio de Janeiro.

Água marinha natural		Água marinha artificial	
Animal	Desovas	Animal	Desovas
1	Desova não significativa	1	Não desovou
2	Não desovou	2	Não desovou
3	Desova não significativa	3	Não desovou
4	Não desovou	4	Não desovou
5	Não desovou	5	Não desovou
6	Desova não significativa	6	Não desovou
7	Não desovou	7	Não desovou
8	Não desovou	8	Não desovou
9	Não desovou	9	Não desovou
10	Não desovou	10	Não desovou
11	Não desovou	11	Não desovou
12	Não desovou	12	Não desovou
13	Não desovou	13	Não desovou
14	Não desovou	14	Não desovou
15	Não desovou	15	Desova não significativa
16	Não desovou	16	Não desovou
17	Não desovou	17	Não desovou
18	Não desovou	18	Não desovou
19	Não desovou	19	Não desovou

Nota: Experimento de desova para animais coletados na Praia de Itaipu, em Niterói, testados em dois tipos diferentes de água para aclimatação durante os ensaios.

Fonte: A autora, 2023.

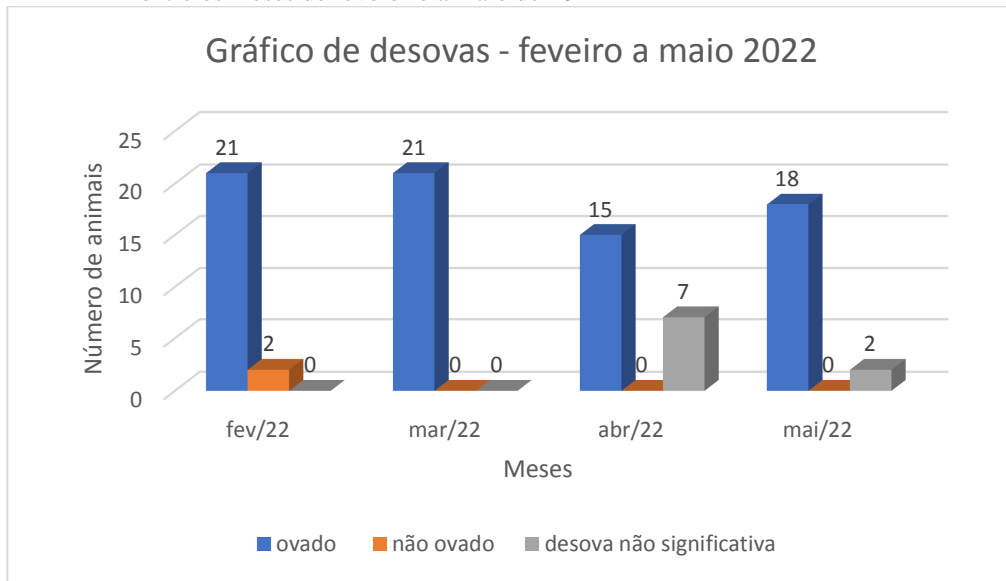
#### 4.1.4 Desova e fertilização

As induções para extração de gametas na fertilização *in vitro* foram realizadas mensalmente e todos os resultados foram contabilizados e plotados em software Excel.

As observações foram divididas em três aspectos, levando em consideração se houve desova ou não, e se ela foi significativa, o que representa um baixo volume de gametas extraído. O baixo volume de gametas na seção de “não significativo” foi capaz de permitir a sexagem de cada indivíduo, porém o volume se mostrou insuficiente para uma fertilização.

Para uma melhor visualização, os dados foram plotados em gráficos de colunas, onde se destacam os três aspectos mencionados observados, organizados de quatro em quatro meses (Gráficos 14, 15, 16 e 17).

Gráfico 14 - Resultados da desova por indução química aplicando o método não destrutivo entre os meses de fevereiro a maio de 2022



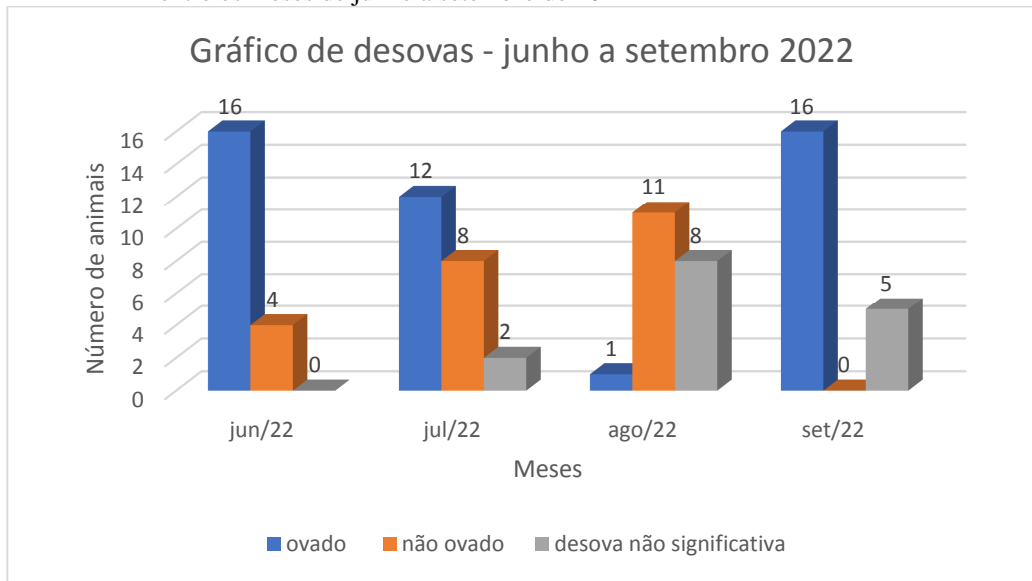
Fonte: A autora, 2023.

Para o mês de fevereiro foram testados 23 animais, sendo 21 ovados e dois animais que não apresentaram nenhum tipo de desova após a indução química.

Em março, 21 animais utilizados para os testes, todos tiveram desovas significativas.

Enquanto para os meses de abril e maio, foi observado algumas desovas consideradas não significativas que representa um baixo valor de gametas extraídos onde é possível realizar somente a sexagem dos animais, entretanto o valor é insignificante para uma fertilização, tendo o mês de abril 22 animais induzidos, sendo sete animais com desovas não significativas, enquanto 15 animais desovaram normalmente. Em maio, 20 animais puderam ser testados, havendo 18 animais ovados, enquanto apenas dois não obtiveram desovas significativas.

Gráfico 15 - Resultados da desova por indução química aplicando o método não destrutivo entre os meses de junho a setembro de 2022



Fonte: A autora, 2023.

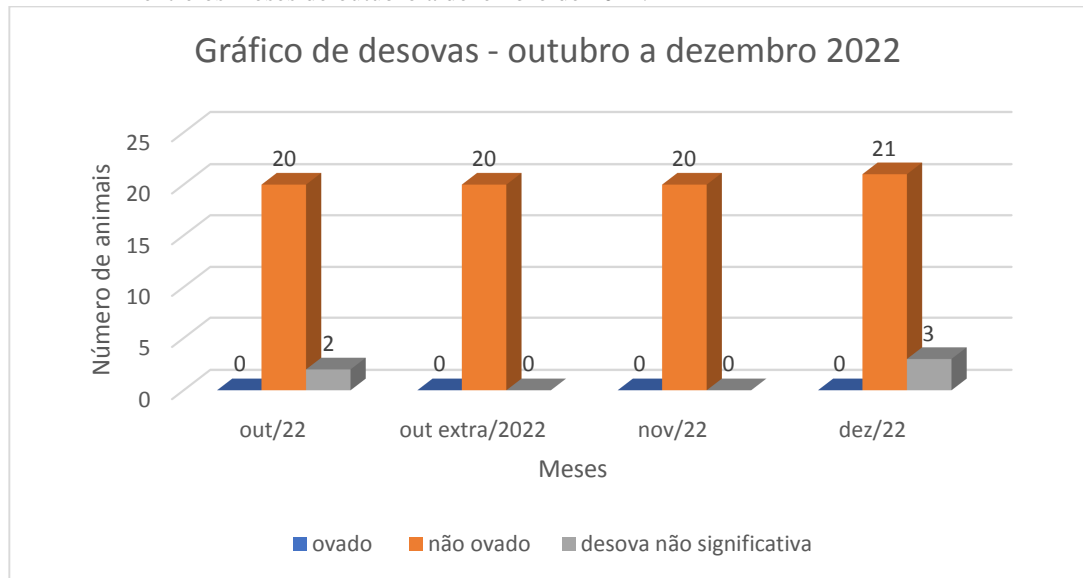
As desovas para o mês de junho foram observadas em 16 animais, enquanto quatro se apresentaram não ovados, de um total de 20 animais testados para o período.

Para o mês de julho, foram testados 22 animais. 12 animais se mostraram ovados, oito não obteve nenhum tipo de desova, enquanto dois animais apresentaram uma desova não significativa.

Em agosto, dos 20 animais testados, apenas um apresentou desova, enquanto 11 animais não se mostraram ovados para o período e oito com desovas não significativas.

Entretanto, os valores para animais ovados aumentaram no mês de setembro, dos 21 animais testados, 16 obtivemos desovas, com cinco animais com desovas não significativas para o período.

Gráfico 16 - Resultados da desova por indução química aplicando o método não destrutivo entre os meses de outubro a dezembro de 2022.



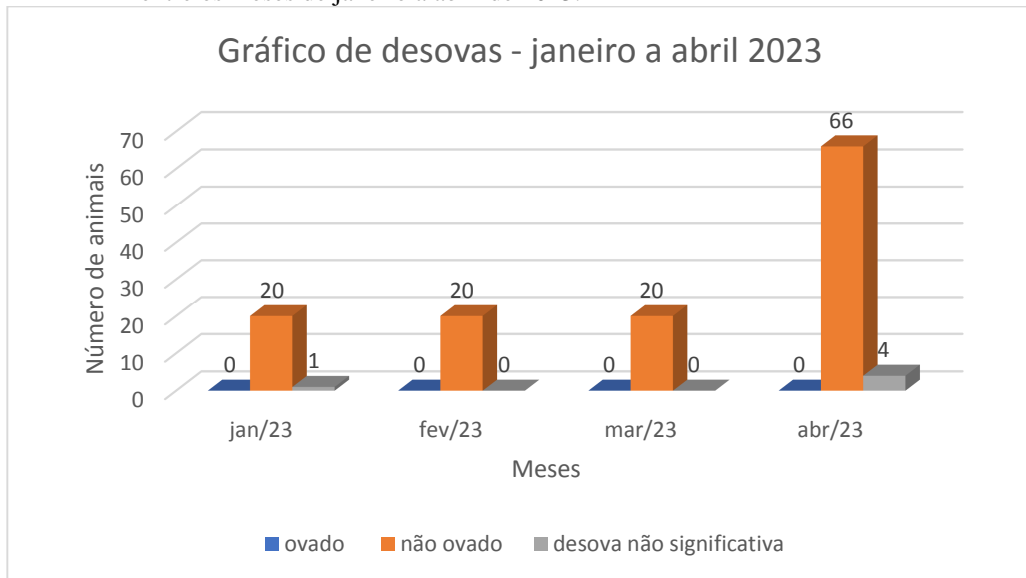
Nota: Para o mês de outubro foram realizadas duas coletas, a primeira com 22 animais para o experimento para o teste regular dos experimentos e uma segunda com 20 animais como um teste extra para confirmação de animais não ovados nesta época.

Fonte: A autora, 2023.

Para o mês de outubro foram realizados dois experimentos de indução para comprovar a baixa fertilidade dos animais para o período. O primeiro experimento utilizamos 22 animais para os testes, tendo 20 animais não ovados e dois animais com desovas não significativas. Para o segundo teste experimental, foi observado que de 20 animais testados, todos se mantiveram não ovados para o período.

A baixa fertilidade dos ouriços se manteve para os meses de novembro e dezembro de 2022, apresentando todos os 20 animais testados não ovados para novembro, enquanto os 24 animais testados para dezembro, 21 se mostraram não ovados e três animais tiveram desovas não significativas.

Gráfico 17 - Resultados da desova por indução química aplicando o método não destrutivo entre os meses de janeiro a abril de 2023.



Nota: Para o mês de abril foram realizadas quatro coletas, totalizando 70 ouriços-do-mar, em novos testes experimentais de observação dos efeitos da utilização de água marinha artificial e água marinha natural em duas praias distintas.

Fonte: A autora, 2023.

Assim, os valores de baixa fertilidade se estenderam para os meses de janeiro, fevereiro, março e abril de 2022.

Com 21 animais testados em janeiro, 20 se mostraram não ovados, enquanto um animal obteve uma desova não significativa.

Para os meses de fevereiro e março, ambos apresentam o mesmo número de 20 animais testados, mostrando-se todos não ovados.

Em abril, 70 animais foram testados, e 66 destes não obtivemos desovas, enquanto quatro apresentaram desovas não significativas.

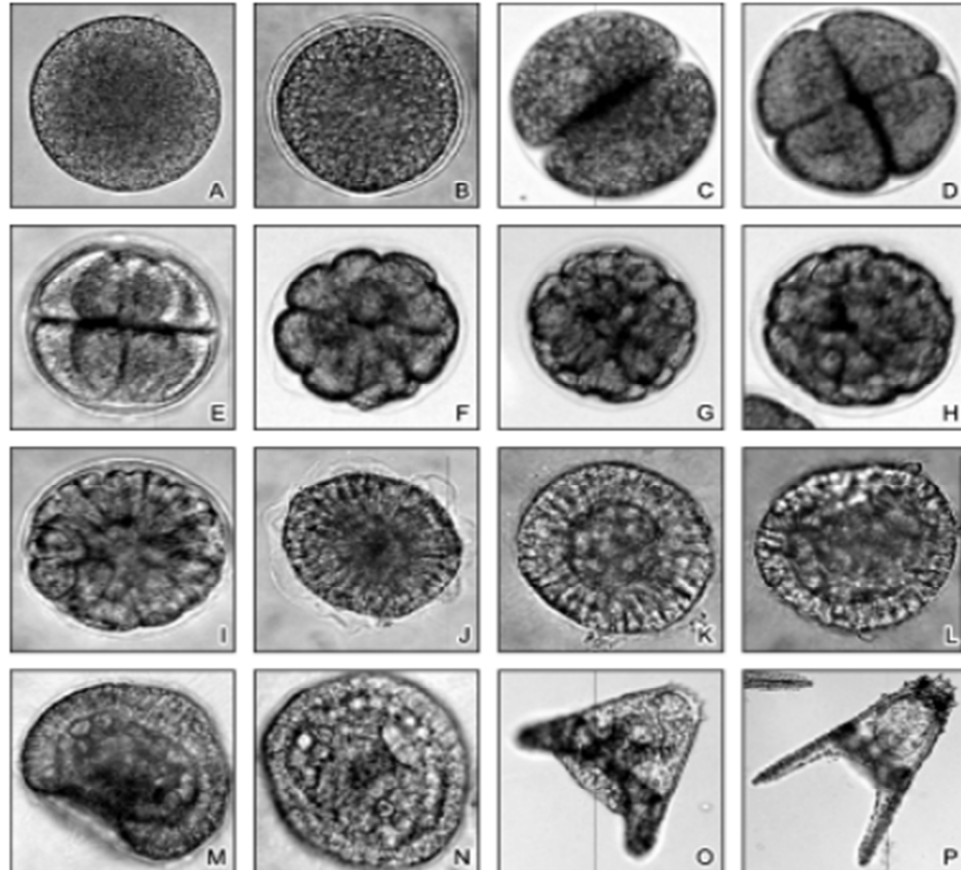
#### 4.1.5 Desenvolvimento embrionário à larva pluteus

As observações tiveram como base os resultados de fertilização de *A. lixula* de Máximo et al. (2008), ilustrados a seguir na Figura 12.

Como destacado anteriormente, os animais utilizados na experimentação tiveram desovas entre os meses de fevereiro de 2022 a setembro do mesmo ano, porém, somente a partir do mês de março de 2022 realizamos o experimento com fertilização.

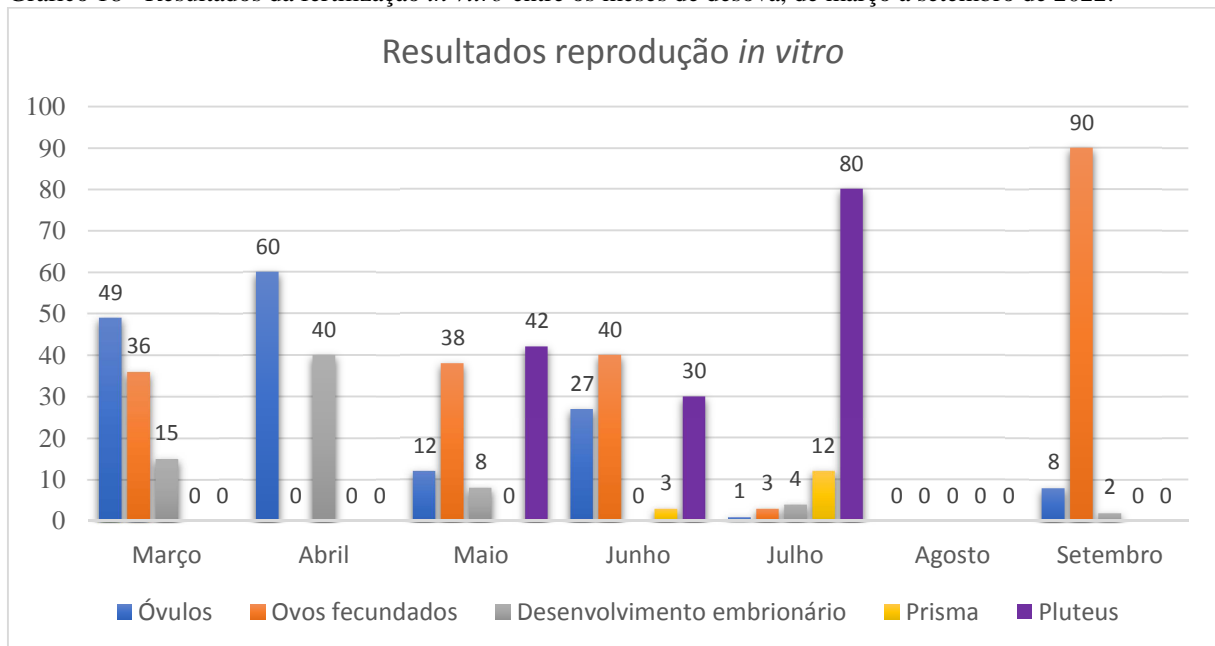
Desta forma, a experimentação de fertilização *in vitro* só pôde ser realizada entre os meses de março a setembro de 2022, sendo representados a seguir na tabela de percentual de sucesso à pluteus (Gráfico 18).

Figura 12 – Estágio de desenvolvimento de embrião de *A. lixula* após fertilização *in vitro*.



Nota: Desenvolvimento embrio-larval do ouriço *Arbacia lixula* a 25°C (e tempo de desenvolvimento acumulado). Sendo: A: óvulo; B: ovo com membrana de fertilização; C: estágio de 2 células (50 minutos); D: estágio de 4 células (1:30 hora); E: estágio de 8 células (1:40 hora); F: estágio de 16 células (2:10 horas); G: estágio de 32 células (2:40 horas); H: mórula (3:30 horas); I: blástula (4:00 horas); J: blástula natante (5:30 horas); K: blástula com mesênquima desenvolvido (7:00 horas); L: gástrula recém-formada (11:00 horas); M: gástrula plenamente desenvolvida (12:00 horas); N: estágio de prisma (14:00 horas); O: estágio entre prisma e pluteus (19:00 horas); P: estágio de larva pluteus (22:00 horas).

Fonte: Máximo et al. (2008).

Gráfico 18 - Resultados da fertilização *in vitro* entre os meses de desova, de março a setembro de 2022.

Fonte: A autora, 2023.

Apesar de estarem significativamente ovados, obtivemos um percentual de 0% no desenvolvimento a pluteus, enquanto 49% dos óvulos não foram fecundados, tendo apenas 36% de ovos fecundados e 15% em desenvolvimento embrionário para o mês de março, devido a otimização dos métodos de reprodução *in vitro* para *Arbacia lixula* no laboratório.

Apesar de estarem significativamente ovados, obtivemos um percentual de 0% no desenvolvimento a pluteus para o mês de abril, apresentando um percentual de 40% para desenvolvimento embrionário e 60% em óvulos não fecundados.

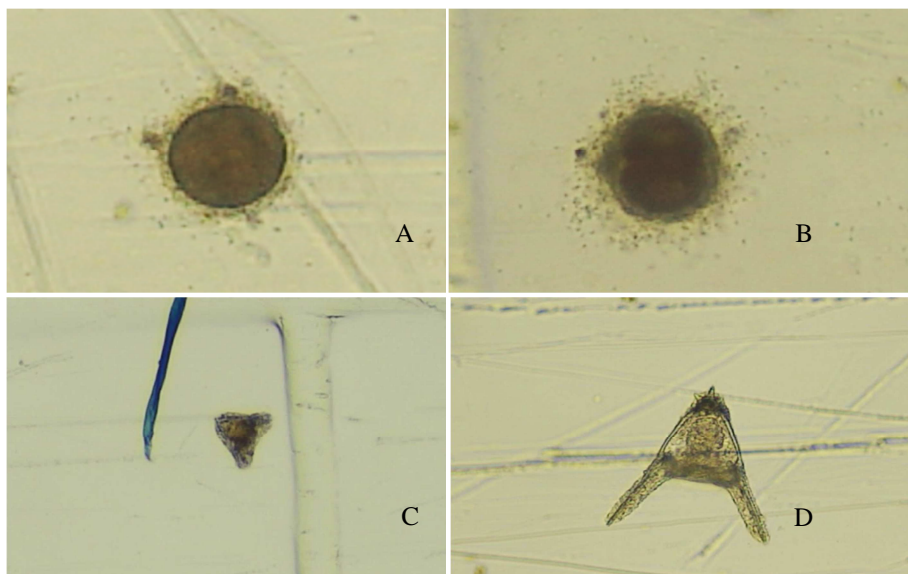
Para o mês de maio, o percentual de desenvolvimento a pluteus chegou a 42% devido aos testes de reprodução *in vitro*, apresentando um percentual de 12% para óvulos, 38% para ovos fecundados, e 8% para desenvolvimento embrionário.

Apresentando a maior quantidade de animais ovados para o mês de junho, o percentual de desenvolvimento a pluteus chegou apenas a 30% após a incubação, apresentando 3% de prisma (estágio embrionário pré pluteus), 40% para ovos fecundados, e um percentual de 27% em óvulos que não foram fecundados (Figura 13). Enquanto para o mês de julho o percentual de desenvolvimento a pluteus atingiu o valor de 80%, considerando este o valor mínimo para utilização em ensaios ecotoxicológicos e o maior valor atingido durante toda a experimentação. Foi observado também o percentual em estágio de prisma em 12%, 4% para desenvolvimento embrionário, 3% para ovos fecundados e apenas 1% em óvulos não fecundados.

Apresentando desovas não significativas para o mês de agosto, e somente um animal apresentou uma desova regular, o experimento de reprodução *in vitro* se tornou inviável pela falta de volume de gametas para a fertilização.

As desovas se mostraram regulares para o mês de setembro, permitindo assim, a fecundação. Entretanto, os valores de reprodução após a incubação chegou a 90% de somente ovos fecundados, 2% para desenvolvimento embrionário, 8% para ovos fecundados e 0% para desenvolvimento a pluteus.

Figura 13 – Estágio de desenvolvimento de embrião de *A. lixula* após fertilização *in vitro*.



Nota: Desenvolvimento embrio-larval do ouriço-do-mar *A. lixula* após fertilização *in vitro*. Sendo: A: ovo com membrana de fertilização; B:estágio de 2 células; C: prisma; D: estágio de larva pluteus.

Fonte: A autora, 2022.



## 5 DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo de inovação metodológica na avaliação da saúde e sobrevivência dos ouriços-do-mar utilizados como matrizes na obtenção de gametas para bioensaios, o método inicial proposto pelo Laboratório de Ecotoxicologia Marinha FAOC/UERJ na otimização do volume de KCl injetado se comprovou eficaz, corroborando com os estudos realizados por Araújo (2018). Dos 386 animais utilizados para indução de gametas com volume otimizado, 384 destes foram devolvidos com vida e saudáveis ao seu habitat natural, enquanto 2 animais não sobreviveram após os ensaios.

Os resultados obtidos comprovaram que a otimização de volume de solução a ser injetada se caracteriza como metodologia não destrutiva para as matrizes de ouriços-do-mar, apresentando uma percentagem de 0,52% em mortes durante o estudo.

Além de se mostrar eficaz para a sobrevivência dos animais, o volume otimizado em 150 µL, garante a emissão de gametas para a espécie testada, desde que estejam ovados.

Quanto a comparação observada com os estudos de Bastos (2009), o volume otimizado para este estudo se mostra muito menor ao volume de 2 mL aplicados nos estudos de Silva (2010), que provocou a mortalidade rápida e completa dos animais, considerando a espécie testada *E. lucunter*. Este procedimento se torna padrão para *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* de acordo com Bastos (2009), sendo recomendado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas ABNT NBR 15350 (2006) para ensaios ecotoxicológicos com ouriços-do-mar.

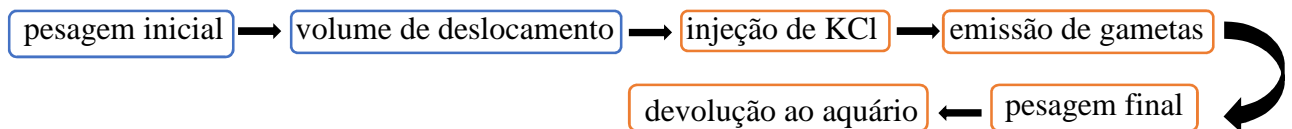
Os testes de indução padronizados para bioensaios tiveram seu volume de solução de KCl, aplicado para emissão de gametas para *L. variegatus* e *E. lucunter*, expandido para no máximo 5 mL para cada animal, enquanto para *A. lixula*, incluída como espécie padrão em 2023, seu volume foi padronizado para 1 mL para cada animal induzido (ABNT NBR 15350, 2023).

O presente estudo confirma uma lacuna a ser observada nas normas de indução química para ouriços-do-mar, uma vez que, há uma forte recomendação para a devolução dos animais após os ensaios. Entretanto, o volume indicado para a norma técnica é de 5 e 1 mL, dependendo da espécie, para cada animal independente do peso de sua massa, inviabilizando a sobrevivência dos mesmos.

Os resultados do índice de condição apontaram corretamente para animais ovados, mantendo-se os seus pontos mais distantes entre seu peso de massa inicial e peso final,

enquanto os pontos com pouca perda de massa se mantiveram mais próximos, indicando animais não ovados, sem emissão de gametas.

No entanto, animais que não apresentaram desovas mantiveram seus pesos finais com redução de massa mesmo não emitindo gametas. Esta observação se deu a partir da avaliação da perda de massa d'água para cada animal durante todo o procedimento de indução fora do ambiente aquático:



Ao comparar os efeitos da dessecação, os dados obtidos comprovaram a perda de massa d'água durante o procedimento, explicando a redução do peso final para animais não ovados.

Durante o período de experimentação houve redução no volume de gametas, inviabilizando os testes reprodutivos em grande parte do estudo. Os testes de indução que foram realizados entre fevereiro de 2022 a abril de 2023 e mostraram uma queda, chegando a nulo ao número de desovas regulares, apresentando uma baixa capacidade reprodutiva da espécie testada entre os meses de outubro de 2022 a abril de 2023. Pode-se caracterizar um período não reprodutivo atípico para *A. lixula* no litoral do Rio de Janeiro, levando em consideração que entre os meses de fevereiro a setembro de 2022 os animais se encontravam expressivamente ovados, com a exceção do mês de agosto de 2022, refutando os dados do estudo de Araújo (2018), onde a espécie apresenta um período reprodutivo entre os meses de maio, junho, agosto, setembro, novembro e dezembro de 2017, e janeiro, fevereiro e abril de 2018.

Ainda sim, vale ressaltar que os ouriços-do-mar são animais sensíveis a altas temperaturas, contudo, as análises de dados entre os anos de 2017 a 2023, adquiridos pelo SIMCosta mostrou que houve uma distinta diferenciação nas temperaturas comparadas entre os experimentos realizados em setembro, novembro e dezembro de 2017 e 2022, observado uma temperatura maior em 2022 em comparação à 2017. Entretanto, os dados analisados para os meses de fevereiro e abril entre os anos de 2018 e 2022, a temperatura se apresentou maior para o ano de 2018, obtendo desovas regulares para os mesmos períodos, enquanto o mesmo período de janeiro comparado entre os anos de 2018 e 2023 se mostraram com temperaturas praticamente iguais, havendo diferentes resultados de desovas para o ano de 2018 e 2023.

A hipótese para a interrupção de desovas durante o estudo é de que a condição atmosférica de La Niña (NOAA, 2022) estivesse interferindo na temperatura das águas do Atlântico Sul. De acordo com o NOAA (2023), em dezembro de 2022 e janeiro de 2023, os valores de anomalia das temperaturas da superfície do mar (TSM) foram de  $-0,8^{\circ}\text{C}$  e  $-0,7^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, permanecendo na categoria de intensidade fraca. Hipótese esta, que não pôde ser comprovada com os dados obtidos e apresentados neste estudo de acordo com as temperaturas obtidas pelo SIMCosta. Assim, seria necessário um estudo mais específico para as condições climáticas do Rio de Janeiro a fim de entender a existência de alguma anomalia local que esteja se sobrepondo a anomalia global de condição atmosférica e esteja interferindo na formação de gametas de *Arbacia lixula*.

De acordo com os estudos de Foo et al. (2022), embriões de *A. lixula* submetidos a altas temperaturas que representam projeções presentes e futuras para o ambiente marinho para animais invertebrados, não apresentaram anomalias no desenvolvimento embrionário expostos a aclimação de baixo pH e temperaturas entre 16 a  $34^{\circ}\text{C}$ .

Estudos que avaliaram a tolerância térmica para o desenvolvimento de embriões de *A. lixula* se sobrepõe às projeções futuras de aquecimento de águas oceânicas da região do Mediterrâneo até 2100 e também indicaram que esta espécie se aclimatou ou adaptou sua biologia reprodutiva à ampla variação das condições ambientais do Mar Mediterrâneo com exposições em altas temperaturas com até  $10^{\circ}\text{C}$  de diferença à temperatura atual. Estas análises a caracterizam como uma potencial espécie adaptada para as mudanças climáticas (Visconti et al., 2017).

De acordo com Limatola et al. (2021), óvulos de *A. lixula* podem ser alterados por osmorregulação em mudança da água natural por hipertônica, impossibilitando a fecundação pelo rompimento da membranda plasmática. Essa osmolaridade variável causa alterações nos gametas femininos e masculinos, diminuindo a capacidade de fertilização pelo espermatozoide no óvulo. O choque causado pelas mudanças dos tipos de água utilizadas na fertilização afeta a superfície do ovo, e conseqüentemente o desenvolvimento embrionário, uma hipótese a ser levantada sobre a baixa capacidade reprodutiva dos animais após o tratamento com água salina artificial nos aquários neste estudo.

Por outro lado, estudos realizados com *Paracentrotus lividus*, coletados ao longo da costa sul do Mar Adriático, e mantidos em aquários com recirculação de temperatura controlada e com condições de aporte nutricional elevado para a maturação das gônadas em período não reprodutivo tiveram sua sensibilidade testada em bioensaios ecotoxicológicos para efeitos de contaminação por Cu (Fabbrocini & D'Adamo, 2011). O tratamento utilizado

de maturação gonadal nas matrizes possa ser uma alternativa viável para *A. lixula*, caso seja comprovado o seu período de baixa capacidade reprodutiva.

Entretanto, Mauro et al. (2022) destaca os efeitos do diclofenaco, anti-inflamatório não esteroideal, sobre o impacto significativo no desenvolvimento dos embriões de *A. lixula*, apresentando uma diminuição dos embriões desenvolvidos e aumentando o número de ovos degenerados, bem como os impactos na produção de gametas para a espécie. Este fármaco está entre um dos principais poluidores de ambientes aquáticos (Bonfille et al., 2018; Ajibola et al., 2021; Pap et al., 2021), tendo em vista o despejo de águas residuais e o descarte irregular de medicamentos.

Sabe-se que medicamentos como diclofenaco causam efeitos negativos sobre invertebrados marinhos (Bonfille et al., 2018), assim como, substâncias como hormônios sintéticos formulados em fármacos para uso contraceptivo, estão presentes em efluentes das Estações de Tratamento de Águas Residuais. Esses hormônios e agonistas de hormônios liberados em ecossistemas são um risco potencial para a saúde humana e para o meio ambiente (Desforges et al., 2010). A baixa capacidade reprodutiva para os *A. lixula* coletados na Praia Vermelha e na Praia de Itaipu, poderia talvez ser explicada pelos efeitos da influência da Baía de Guanabara sobre as duas praias, afetando a produção de gametas da espécie, de acordo com o descarte irregular de medicamentos e falta de melhorias no processo de tratamento de águas residuais despejadas diretamente na Baía de Guanabara.

Acredita-se que a Baía de Guanabara seja um dos estuários mais degradados, sendo multi impactado por diversos agentes poluidores, tendo o plástico, derrames de óleos (Baptista-Neto & Fonseca, 2011), altas concentrações de metais pesados, principalmente Cu, por atividade naval (Baptista-Neto et al., 2005) e pelo aporte de efluentes urbanos não tratados (Marotta et al., 2020).

De acordo com Souza et al. (2014), um total de 18 mil litros de esgoto deságuam a cada segundo na Baía de Guanabara, tendo 10 mil litros destes despejados *in natura*. É a segunda maior em extensão baía hidrográfica do litoral brasileiro, apresentando cerca de 11 milhões de habitantes, da maior parte de municípios da região metropolitana do Rio de Janeiro (Marotta et al., 2020).

Contudo, é possível também que tenha sido introduzido um ruído não esperado no decorrer do experimento: durante a experimentação de desovas, em um certo momento, no mês de outubro, quando justamente os animais não emitiram mais gametas, a água do mar utilizada para a aclimação e condicionamento dos ouriços foi modificada para água do mar artificial. Isto ocorreu pelos seguintes fatos a serem observados:

Primeiro ponto: uso de água do mar artificial para ganhar tempo na filtração: funcionou perfeitamente com os pluteus. Os maiores valores foram obtidos assim (julho de 2022).

Segundo ponto: Para facilitar o trabalho de campo, passamos a usar água do mar artificial também nos aquários. Isso pode ser um problema, embora o nosso primeiro experimento nesse sentido não tenha sido conclusivo (dados de abril de 2023).

Esse problema foi criado pela dificuldade em obter água do mar natural em função do fato de não termos acesso aos veículos próprios para esse tipo de trabalho com facilidade, o que nos levou a tentar essa modificação nessa etapa.

Por causa do limite de tempo da dissertação, esse ponto será novamente experimentado usando os projetos IC e de Extensão do laboratório.

## CONCLUSÕES

- a) O método não destrutivo proposto aplicado a matriz de *A. lixula* se mostra eficaz quanto a preservação dos animais, sendo devolvidos saudáveis ao habitat natural após os ensaios;
- b) volumes otimizados de solução de KCl garantem as emissões de gametas somente para animais ovados, porém se tornam menos agressivos para os ouriços. Não faz sentido injetar animais não ovados;
- c) a espécie testada possui tempo de reprodução curto, facilitando os testes ecotoxicológicos;
- d) com desovas atípicas para o período, comparados aos estudos anteriores, *A. lixula* se mostrou contudo inviável para este tipo de estudo reprodutivo, já que não apresenta desova regular ao longo do ano;
- e) necessita-se de novos estudos para avaliar a periodicidade reprodutiva da espécie com uma duração de tempo maior das que foram realizadas neste trabalho;
- f) é possível obter mais dados na preservação de ouriços-do-mar utilizados como matriz para os testes de indução com o método de índice de condição proposto por Bastos (2009) para animais ovados.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo sobre inovação metodológica na aplicação de métodos não destrutivos na obtenção de gametas de ouriços-do-mar utilizados para ensaios ecotoxicológicos, com a espécie *A. lixula*, apresentou resultados positivos para a preservação das espécies padronizadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Contribuindo assim, para avançar no conhecimento sobre novas técnicas, pouco estudada do ponto de vista ecotoxicológico no Brasil e no mundo, que permitam a sobrevivência ou que sejam menos invasivas para animais utilizados em testes dentro e fora dos laboratórios.

Apesar do método comprovar sua viabilidade, os resultados revelaram um período de desova atípica para *A. lixula*, indicando a necessidade de mais estudos para as três espécies padronizadas, como: *E. lucunter*, *A. lixula*; e *L. variegatus*, recomendada novamente como espécie padrão de acordo com a ABNT NBR 15350:2023.

Levando em consideração de que não foi possível identificar a interferência na disponibilidade de gametas dos ouriços testados, se faz necessário a integração de análises mais específicas para dados de temperaturas, salinidade, balneabilidade, influência química de fármacos, bem como, as influências sobre as mudanças climáticas como consequências ambientais do aquecimento global.

Se torna importante que se reproduza e amplie estudos como este, que viabilizam a sobrevivência e conservação das espécies, e dos ecossistemas marinhos e costeiros.

## REFERÊNCIAS

- ABNT, NBR15350. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço do mar (Echinodermata:Echinoidea). 2006.
- ABNT, NBR15350. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço do mar (Echinodermata:Echinoidea). Ed. 4°. 2023.
- AJIBOLA, A. S., FAWOLE, S. T., AJIBOLA, F. O., ADEWUYI, G. O. Diclofenac and Ibuprofen Determination in Sewage Sludge Using a QuEChERS Approach: Occurrence and Ecological Risk Assessment in Three Nigerian Wastewater Treatment Plants . *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2021. doi:10.1007/s00128-021-03139-1
- ARAÚJO, A. Relatório Qualitec. Laboratório de Ecotoxicologia Marinha, FAOC/UERJ, 2018.
- ARTIFON, V., CASTRO, I. B., FILLMANN, G. Spatiotemporal appraisal of TBT contamination and imposex along a tropical bay (Todos os Santos Bay, Brazil). *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 23, N. 16, pp. 16047-16055, 2016.
- BASTOS, F. L. T. Otimização da indução de emissão de gametas no ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*. Monografia (Bacharelado em Oceanografia), Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. p.35, 2009.
- BAPTISTA-NETO, J. A., CRAPEZ, M., MCALISTER, J. J., VILELA, C. G. Concentration and Bioavailability of Heavy Metals in Sediments from Niteroi Harbour (Guanabara Bay/S.E. Brazil). *Journal of Coastal Research*, v. 21, No. 4, 2005.
- BAPTISTA-NETO, J. A. & FONSECA, E. M. Variação sazonal, espacial e composicional de lixo ao longo das praias da margem oriental da Baía de Guanabara (Rio de Janeiro) no período de 1999-2008. *Revista de Gestão Costeira Integrada / Journal of Integrated Coastal Zone Management* 11(1):31-39. 2011.



- BEIRAS, R. Comparison of Methods to Obtain a Liquid Phase in Marine Sediment Toxicity Bioassays with *Paracentrotus lividus* Sea Urchin Embryos. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 42, 23–28. 2002.
- BEIRAS, R., FERNÁNDEZ, N., BELLAS, J., BESADA, V., GONZÁLEZ- QUIJANO, A., NUNES, T. Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. *Chemosphere*. n° 52, pp. 1209–1224. 2003.
- BILA, D. M. & DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 4, 523-530, 2003.
- BONNEFILLE, B., GOMEZ, E., COURANT, F., ESCANDE, A., FENET, H. Diclofenac in the marine environment: A review of its occurrence and effects. *Marine Pollution Bulletin*, 131(), 496–506. 2018.
- BROWN, K. E., KING, C. K., & HARRISON, P. L. Impacts of petroleum fuels on fertilization and development of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 39, n. (12), pp. 2527-2539. 2020.
- CALLISTO, M., GONÇALVES JR, J. F. & MORENO, P. Invertebrados aquáticos como bioindicadores. IN: *Navegando o Rio das velhas das Minas aos Gerais*, 1, 1-12. 2005.
- CHIARELLI, R. & ROCCHERI, M. C. Marine Invertebrates as Bioindicators of Heavy Metal Pollution. *Open Journal of Metal*, 4, 93-10. 2014.
- CUI, R., IL KWAK, J., AN, YOUNG-JOO. Comparative study of the sensitivity of *Daphnia galeata* and *Daphnia magna* to heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 162, N°. 63–70, 2018.
- DESFORGES, J-P. W., PEACHEY, B. D. L., SANDERSON, P. M., WHITE, P. A., BLAIS, J. M. Plasma vitellogenin in male teleost fish from 43 rivers worldwide is correlated with upstream human population size. *Environmental Pollution*, Vol. 158, pp. 3279-3284, 2010.
- DOCILE, T. N. & FIGUEIRÓ, R. Histórico e perspectivas da utilização de macroinvertebrados no monitoramento biológico de ecossistemas aquáticos no Brasil. *Acta Scientiae & Technicae*. Vol. 1, N° 1. 2013.

- FERNANDEZ, M. A., LIMAVERDE, A. M., CASTRO, I. B., ALMEIDA, A. C. M. E WAGENER, A. L. R. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*. 18: 463-476. 2002.
- FERNANDEZ, M. A. Populations Collapses in Marine Invertebrates Due to Endocrine Disruption: A Cause for Concern? *Frontiers in Endocrinology*. Volume 10:721. 2019. doi: 10.3389/fendo.2019.00721
- FERNÁNDEZ, N. & BEIRAS, R. Combined Toxicity of Dissolved Mercury with Copper, Lead and Cadmium on Embryogenesis and Early Larval Growth of the *Paracentrotus lividus* Sea-Urchin. *Ecotoxicology*, 10, 263–271, 2001.
- FABBROCINI, A. & D'ADAMO, R. Gametes and embryos of sea urchins (*Paracentrotus lividus*, Lmk., 1816) reared in confined conditions: their use in toxicity bioassays. *Chemistry and Ecology*, Vol. 27, n°. S2, pp. 105–115. 2011.
- FOO, S. A., MUNARI, M., GAMBI, M. C., BYRNE, M. Acclimation to low pH does not affect the thermal tolerance of *Arbacia lixula* progeny. *Biology Letters*. 18:20220087. 2022. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0087>
- GAGO, J. & LUIS, O. J. Comparison of spawning induction techniques on *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) broodstock. *Aquacult. Int.* 19:181–191. 2011.
- GRAY, J. S., BEWERS, J. M., HE, X. Pollution: Approaches to Pollution Control. *Encyclopedia of Ocean Sciences*, 3rd Edition, Vol. 6, pp. 366-371, 2019.
- KOBAYASHI, N. Fertilized sea urchin eggs as an indicatory material for marine pollution bioassay, preliminary experiments. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory*, Vol. 18, N°. 6, pp. 379-406, 1971.
- LIMATOLA, N., CHUN, J. T., SANTELLA, L. Fertilization and development of *Arbacia lixula* eggs are affected by osmolality conditions. *BioSystems*, 206, 104448. 2021.
- MANZO, S. Sea urchin embryotoxicity test: proposal for a simplified bioassay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 57, 123–128. 2004.

MARKICH, S. J. Sensitivity of the glochidia (larvae) of freshwater mussels (Bivalvia: Unionida: Hyriidae) to cadmium, cobalt, copper, lead, nickel and zinc: Differences between metals, species and exposure time. *Science of the Total Environment*, 601–602, pp. 1427–1436. 2017.

MAROTTA, H., PEIXOTO, R. B., FERNANDES, T. F., OLIVEIRA, V. P., COSTA, R., KEIM, R., MUNETTI, C., CUNHA, L. C., MOSER, G., POLLERY, R. & PINHO, L. Biomonitoramento contínuo de águas do PELD-Baía de Guanabara: intensa variação nictemeral de gases metabólicos na condição eutrófica tropical. *Oecologia Australis* 24(2):365-388, 2020.

MAURO, M., CAMMILLERI, G., CELI, M., CICERO, A., ARIZZA, V., FERRANTELLI, V., & VAZZANA, M. Effects of diclofenac on the gametes and embryonic development of *Arbacia lixula*. *The European Zoological Journal*, 535–545 Vol. 89, No. 1. 2022. <https://doi.org/10.1080/24750263.2022.2059582>

MÁXIMO, M. V., MOTTOLA, L. S. M & RESGALLA J. C. Sensibilidade do Ouriço *Arbacia lixula* (Echinodermata: Echinoidea) em Testes de Toxicidade. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 3, n. 1, 2008.

MESQUITA, M. C. B., PRESTES, A. C. C., GOMES, A. M. A., MARINHO, M. M. Direct Effects of Temperature on Growth of Different Tropical Phytoplankton Species. *Microbial Ecology. Microbiology of Aquatic Systems*. 2019.

MMA, 2014: Portaria MMA n°445, de 17 de dezembro de 2014, retificada pela Portaria MMA n° 98, de 28 de abril de 2015.

MORRONI, L., GIULIANI, S., PELLEGRINI, D., SARTORI, D. In situ embryo toxicity test with sea urchin: Development of exposure chamber for test execution. *Chemosphere*, 196, 354-360. 2018.

MORRONI, L., GAION, A., BROCCOLI, A., FERRARI, S., PELLEGRINI, D., SARTORI, D. Influence of Salinity on Copper Toxicity in *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* Embryos. *Water*, 15, 65. 2023. <https://doi.org/10.3390/w15010065>

NATIONAL OCEANIC ATMOSPHERIC ADMINISTRATION- NOAA, 2022.

NATIONAL OCEANIC ATMOSPHERIC ADMINISTRATION- NOAA, 2023.

OKADA, Y., IWATA, K. S., & YANAGIHARA, M. Synchronized rhythmic contractions among five gonadal lobes in the shedding sea urchins: coordinative function of the aboral nerve ring. *The Biological Bulletin*, Vol. 166, No. 1, pp. 228-236, 1984.

PAP, S., TAGGART, M. A., SHEARER, L., LI, Y., RADOVIC, S., MAJA, T. S. Removal behaviour of NSAIDs from wastewater using a P-functionalised microporous carbon. *Chemosphere*, 264, 128439, 2021. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128439

PÉREZ-PORTELA, R., WANGENSTEEN, O. S., GARCIA-CISNEROS, A., VALERO-JIMÉNEZ, C., PALACÍN, C., TURON, X. Spatio-temporal patterns of genetic variation in *Arbacia lixula*, a thermophilous sea urchin in expansion in the Mediterranean. *Heredity*, 122:244–259. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0098-6>

PERINA, F. C., ABESSA, D. M. S., PINHO, G. L. L., FILLMANN, G. Comparative toxicity of antifouling compounds on the development of sea urchin. *Ecotoxicology*. 2011.

PRESTES, R. M & VINCENCI, K. L. Bioindicadores como avaliação de impacto ambiental. *Braz. J. Anim. Environ. Res.*, Curitiba, v. 2, n. 4, p. 1473-1493, jul./set. 2019.

PRÓSPERI, V. A., MIGOTTO, A. E. Desenvolvimento embrionário dos ouriços do mar. Centro de Biologia Marinha, USP, São Sebastião, SP, Brasil. 2007.

QUINIOU, F., GUILLOU, M., JUDAS, A. Arrest and Delay in Embryonic Development in Sea Urchin Populations of the Bay of Brest (Brittany, France): Link with Environmental Factors. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 38, No. 5, pp. 401- 406, 1999.

SANTOS, D. M., ARAÚJO, I. P., MACHADO, E. C., CARVALHO-FILHO, M. A. S., FERNANDEZ, M. A., MARCHI, M. R. R., GODOI, A. F. L. Organotin compounds in the Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil: Evaluation of biological effects, surface sediment, and suspended particulate matter. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 58, pp. 1926-1931, 2009.

SILVA, P. B. A. Avaliação operacional do procedimento não destrutivo para extração de gametas em ouriço-do-mar. Monografia (Bacharelado em Oceanografia), Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. p.49. 2010.

SOARES, J. B. & RESGALLA JUNIOR, C. Echinodermata in ecotoxicological tests: maintenance and sensitivity. *Brazilian Journal of Oceanography*, 64 (1):29-36. 2016.

SOUZA, L. G. R., MIRANDA, A. C., MEDEIROS, H. B. O lixo, o esgoto na Baía de Guanabara e os programas de despoluição: a mídia versus os dados. *X Fórum Ambiental da Alta Paulista*, ISSN 1980-0827. v. 10, n. 2, pp. 183-198. 2014.

TEIXEIRA DE LIMA, D., MOSER, G. A. O., PIEDRAS, F. R., DA CUNHA, L. C., TENENBAUM, D. R., TENÓRIO, M. M. B., CAMPOS, M. V. P. B, CORNEJO, T. O., BARRERA-ALBA, J. J. Abiotic Changes Driving Microphytoplankton Functional Diversity in Admiralty Bay, King George Island (Antarctica). *Frontiers in Marine Science*. Vol. 6. N° 638. 2019.

TELLIS, M. S., LAUER, M. M., NADELLA, S., BIANCHINI, A., WOOD, C. M. The Effects of Copper and Nickel on the Embryonic Life Stages of the Purple Sea Urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 67, 453–464. 2014.

TOSTE, R., PESSOA, I. A., DORE, M. P., PARAHYBA, M. A., FERNANDEZ, M. A. Is aphallic vas deferens development in females related to the distance from organotin sources? A study with *Stramonita haemastoma*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 91, pp. 162-170, 2013.

TRIFUOGGI, M., DONADIO, C., MANGONI, O., FERRARA, L., BOLINESE, F., NASTRO, R. A., STANISLAO, C., TOSCANESI, M., NATALE, G. D., ARIENZO, M. Distribution and enrichment of trace metals in surface marine sediments in the Gulf of Pozzuoli and off the coast of the brownfield metallurgical site of Ilva of Bagnoli (Campania, Italy). *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 124, N° 1, pp. 502-511, 2017.

VISCONTI, G., GIANGUZZA, F., BUTERA, E., COSTA, V., VIZZINI, S., BYRNE, M. & GIANGUZZA, P. Morphological response of the larvae of *Arbacia lixula* to near-future ocean warming and acidification. – *ICES Journal of Marine Science*, 74 (4): 1180–1190. 2017.

WELLS, P. G. Biomonitoring the Health of Coastal Marine Ecosystems - The Roles and Challenges of Microscale Toxicity Tests. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 39, N° 1-12, pp. 39-47, 1999.

WILSON, D. P. A biological difference between natural sea waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, Vol. 30, N° 1, 1951.

ZÚÑIGA, M., ROA, R. & LARRAIN, A. Sperm Cell Bioassays with the Sea Urchin *Arbacia spatuligera* on Samples from Two Polluted Chilean Coastal Sites. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 30, No. 5, pp. 313-319, 1995.

**ANEXO** – Tabela com dados de temperatura a partir dos dados do SIMCosta tratados com as médias semanais e diárias comparados com os estudos de Araújo em 2018

<b>ARAÚJO (2018)</b>		<b>ALCANTARA (2023)</b>		
MÊS	SEMANAL	MÊS	SEMANAL	DIÁRIA
maio-17		fevereiro-22	21,41	23,84
junho-17		março-22	20,92	19,99
agosto-17		abril-22	24,19	23,62
setembro-17	17,64	maio-22	24,78	24,98
novembro-17	19,5	junho-22	22,93	23,16
dezembro-17	20,07	julho-22		22,23
janeiro-18	23,09	agosto-22	22,63	22,61
fevereiro-18	25,73	setembro-22	21,5	22,66
abril-18	24,43	outubro-22	22,18	21.83*
		out extra-22	22,78	23,58
		novembro-22	23,85	24,14
		dezembro-22	21,73	23,39
		janeiro-23	22,98	23,64

Fonte: A autora, 2023.