

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO AUMENTO DA TEMPERATURA,
DIMINUIÇÃO DO PH E CONTAMINAÇÃO POR CHUMBO NO
DESENVOLVIMENTO EMBRIO-LARVAL DE OURIÇO-DO-MAR
(*ECHINOMETRA LUCUNTER*)**

LÍVIA SPERANDIO CAETANO

VILA VELHA

JULHO / 2018

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO AUMENTO DA TEMPERATURA,
DIMINUIÇÃO DO PH E CONTAMINAÇÃO POR CHUMBO NO
DESENVOLVIMENTO EMBRIO-LARVAL DE OURIÇO-DO-MAR
(*ECHINOMETRA LUCUNTER*)**

LÍVIA SPERANDIO CAETANO

VILA VELHA

JULHO / 2018

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO AUMENTO DA TEMPERATURA,
DIMINUIÇÃO DO PH E CONTAMINAÇÃO POR CHUMBO NO
DESENVOLVIMENTO EMBRIO-LARVAL DE OURIÇO-DO-MAR
(*ECHINOMETRA LUCUNTER*)**

LÍVIA SPERANDIO CAETANO

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestra em Ecologia.

VILA VELHA

JULHO / 2018

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C127e Caetano, Livia Sperandio.
Efeitos da associação do aumento da temperatura,
diminuição do ph e contaminação por chumbo no
desenvolvimento embrio-larval de ouriço-do-mar (echinometra
lucunter) / Livia Sperandio Caetano. – 2018.
71 f.: il.

Orientadora: Adriana Regina Chippari-Gomes.
Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) -
Universidade Vila Velha, 2018
Inclui bibliografias.

1. Ecologia. 2. Embriologia. 3. Mudanças climáticas.
I. Chippari-Gomes, Adriana Regina. II. Universidade Vila Velha
III. Título.

CDD 577

LÍVIA SPERANDIO CAETANO

EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO AUMENTO DA TEMPERATURA, DIMINUIÇÃO DO PH E CONTAMINAÇÃO POR CHUMBO NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONARVAL DE OURIÇO-DO-MAR (*ECHINOMETRA LUCUNTER*)

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha - UVV, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestra em Ecologia.

Aprovada em 30 de julho de 2018,

Banca examinadora

Dra. Mércia Barcelos da Costa - UFES

Dr. Marcelo da Silva Moretti - UVV

Dra. Adriana Regina Chippari-Gomes - UVV
Orientadora

Esse trabalho é dedicado aos meus pais, às pessoas mais importantes da minha vida.

Tenho muita sorte em tê-los.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha Orientadora, Professora Doutora Adriana Chippari Gomes pelo incentivo, atenção e orientação nesses dois anos.

Ao Professor Doutor Levy de Carvalho Gomes, por toda ajuda e orientação, mesmo não sendo meu orientador sempre esteve presente e disposto.

Aos meus pais pelo apoio incondicional, paciência e amor. Ao meu pai querido por me ajudar efetivamente nas coletas e trabalho de campo. Mesmo nas férias dele, de madrugada e com chuva, sempre me incentivando a dar meu melhor. Minha amada mãe por me ajudar no inglês, na tradução de artigos, por me ouvir sempre que precisei às vezes por horas a fio sobre minhas angústias, anseios e medos. Ambos sempre me apoiando nas atividades de dentro e de fora da vida acadêmica. Eu tenho muita sorte de tê-los em minha vida.

À minha querida Equipe do LabPeixe, que esteve do meu lado em TODOS os momentos me ajudando nas coletas, análises químicas, coletas de água e inúmeras tarefas que realizei para concluir essa dissertação. Sem vocês eu não teria conseguido! Dandara Cabral, por ser meu braço direito (e esquerdo) nas tarefas diárias, que esteve comigo mesmo nas “férias”, finais de semana, dia e noite! Compartilhando experiências, histórias de vida e amizade. Jéssica Dandara, sempre com um sorriso no rosto e disposta a ajudar, tanto dentro quanto fora do Laboratório, me acompanhando e perguntando SEMPRE “amiga, como você está?”, quando ela sabia que eu precisava de um ombro amigo! Eu não esqueço quando ela apareceu, sem que eu pedisse, um DOMINGO na UVV (isso que é amizade, hein!). Gabriel, por dividir coletas, experiências, vindas ao laboratório de madrugada, expectativas e frustrações com nossos ouriços. À minha estagiária querida, Letícia, que sempre com seu bom humor me ajudou nas tarefas diárias. Agradeço a Tati que compartilhou comigo sua experiência e sempre esteve disposta a me ajudar. Anderson, pelas palavras de força em um momento que eu precisei muito e, claro, pela ajuda nas análises estatísticas! Bárbara, que mesmo não sendo bióloga me auxiliou nos momentos que precisei, ajudou com sua força e liderança nas coletas, além da sua linda companhia e bom humor no dia a dia. Mais que ajuda nas atividades efetivamente, vocês me ajudaram a levantar meu astral, a suportar as angústias, a melhorar meu humor cada dia que pensei em desistir. Aos amigos que

fiz no laboratório e vou levar para a vida. Poderia ficar um dia inteiro falando o quanto são especiais para mim. Eu amo vocês!

Amigos de fora do LabPeixe que também me ajudaram mesmo que com companhia às minhas idas de madrugada ao laboratório.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem participar e a contribuir com este trabalho.

À Fapes, pela concessão da bolsa.

À Universidade Vila Velha e aos professores da instituição, pelos ensinamentos e pela estrutura concedida para desenvolver minha dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução	1
2. Fundamentação teórica	4
2.1. Aumento da temperatura da água e acidificação dos oceanos	4
2.2. Poluição aquática e contaminação por metais	6
2.3. Estudos ecotoxicológicos	8
2.4. Bioindicadores (ouriço-do-mar - <i>Echinometra lucunter</i>)	9
2.5. Ensaio com gametas e embriões de ouriço-do-mar - <i>Echinometra lucunter</i>	9
2.6. Biomarcadores (enzimas)	10
2.7 Ecologia da espécie <i>Echinometra lucunter</i>	11
3. Material e métodos	13
3.1. Coleta de Organismos	13
3.2. Obtenção de gametas utilizada nos protocolos I e II	13
3.3 Protocolo Experimental I	13
3.3.1 Bioensaio com Gametas e Embriões de <i>Echinometra lucunter</i>	17
3.4 Protocolo Experimental II	18
3.4.1 Período de aclimatação dos ouriços-do-mar adultos	18
3.4.2 Bioensaio com adultos de <i>Echinometra lucunter</i>	18
3.4.3 Coleta de órgãos e análises bioquímicas	20
3.4.4.1 Catalase ((CAT) E.C. 1.11.1.6)	21
3.4.4.2 Glutathione S-Transferase ((GST) E.C. 2.5.1.18)	21
3.4.4.3. Proteínas Totais.....	22
3.4.5 Obtenção de gametas e teste de fertilização	22
3.5 Análise estatística	22
4. Resultados	23

4.1. Exposição de gametas e embriões	23
4.1.1. Teste de toxicidade crônica com gametas (Teste de Fertilização)	24
4.2. Teste de toxicidade crônica com embriões (Larva pluteus)	24
4.3. Exposição de adultos de <i>Echinometra lucunter</i> ao pH reduzido	26
4.4. Taxa de fecundidade dos gametas e embrião dos indivíduos adultos de <i>Echinometra lucunter</i> expostos ao pH reduzido	27
4.5. Avaliação do estresse oxidativo dos indivíduos adultos de <i>Echinometra lucunter</i> expostos ao pH reduzido	27
4.5.1. Catalase (CAT) e Glutathione S- Transferase (GST)	27
4. Discussão	29
5.1 Teste de toxicidade crônica com gametas e embriões de <i>Echinometra lucunter</i>	32
5.2 Taxa de fecundidade dos gametas e embrião dos indivíduos adultos de <i>Echinometra lucunter</i> expostos ao Ph	36
5.3 Avaliação do estresse oxidativo	37
6. Conclusão	39
7. Referências	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gametas femininos de fêmeas de *Echinometra lucunter* sendo coletados em béqueres. 14
- Figura 2.** Espécimes macho de *Echinometra lucunter* no momento da liberação dos gametas. A cor esbranquiçada dos gametas indica que os espécimes são machos. 14
- Figura 3.** Espécime fêmea de *Echinometra lucunter* no momento da liberação dos gametas. A cor alaranjada dos gametas indica que os espécimes são fêmeas. 15
- Figura 4.** Desenho experimental indicando os tratamentos testados com gametas e embriões de *Echinometra lucunter*. 15
- Figura 5.** Líquido espermático de *Echinometra lucunter* diluído em água do mar à esquerda. Óvulos de *E. lucunter* acondicionados em um béquer de 1L, à direita. 18
- Figura 6.** Aquários de polietileno com capacidade de 20 L em que os adultos de *Echinometra lucunter* foram mantidos, com três indivíduos em cada aquário, totalizando 42 indivíduos para o bioensaio. 20
- Figura 7.** Espécime de *Echinometra lucunter* seccionado ao meio para extração das gônadas 21
- Figura 8.** Taxa de Fecundação de Gametas de *Echinometra lucunter* expostos aos seguintes tratamentos: **Controle** (temperatura: 26 °C; pH: 8,2 e sem contaminação de chumbo), **T1** (temperatura: 26 °C; pH: 8,2 e contaminação de chumbo nas concentrações M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L), **T2** (temperatura: 26 °C e pH reduzido: 7,5), **T3** (temperatura: 26 °C; pH reduzido: 7,5 e contaminação de chumbo nas concentrações M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L), **T4** (temperatura elevada: 28 °C e pH: 8,2) 23
- Figura 9.** Taxa de Fecundação de Gametas de *Echinometra lucunter* expostos aos seguintes tratamentos: **Controle** (temperatura: 26 °C; pH: 8,2 e sem contaminação de chumbo), **T5** (temperatura elevada: 28 °C, pH: 8,2 e concentração de chumbo nas concentrações M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L) e **T6** (temperatura elevada: 28 °C e pH reduzido: 7,5) e **T7** (temperatura elevada: 28 °C; pH reduzido: 7,5 e contaminação de chumbo nas concentrações M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L). O valor de pCO₂ para o tratamento Controle é de 5±2 mg/L e para os tratamentos com pH reduzido é de 39±3 mg/L.24
- Figura 10.** Taxa de Desenvolvimento de Embriões de *Echinometra lucunter* expostos aos seguintes tratamentos: **Controle** (temperatura: 26 °C; pH: 8,2 e sem contaminação de chumbo), **T1** (temperatura: 26 °C; pH: 8,2 e contaminação de chumbo nas concentrações M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L), **T2** (temperatura: 26 °C e pH reduzido: 7,5), **T3** (temperatura: 26 °C; pH reduzido: 7,5 e contaminação de chumbo nas concentrações M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L), **T4** (temperatura elevada: 28 °C e pH: 8,2. 25

Figura 11. Taxa de Desenvolvimento de Embriões de *Echinometra lucunter* expostos aos seguintes tratamentos: **Controle** (temperatura: 26 °C; pH: 8,2 e sem contaminação de chumbo), **T5** (temperatura elevada: 28 °C; pH: 8,2 e concentração de chumbo nas concentrações M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L) e **T6** (temperatura elevada: 28 °C e pH reduzido: 7,5) e **T7** (temperatura elevada: 28 °C; pH reduzido: 7,5 e contaminação de chumbo nas concentrações M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L). O valor de pCO₂ para o tratamento Controle é de 5±2 mg/L e para os tratamentos com pH reduzido é de 39±3 mg/L..... 26

Figura 12. Taxa de fecundação de gametas (a) e Taxa de desenvolvimento de embriões (b) de adultos de *Echinometra lucunter* expostos à condição de pH reduzido: 7,5 (**T1**) e controle (C – pH: 8,2). Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). O valor de pCO₂ para o tratamento Controle é de 5±2 mg/L e para os tratamentos com pH reduzido é de 39±3 mg/L. 27

Figura 13. Atividade das enzimas catalase (CAT) (a) e glutathione S-transferase (GST) (b) em gônadas de *Echinometra lucunter* expostos ao pH reduzido (T1 – pH 7,5) e controle (C – pH: 8,2), não houve diferença significativa do grupo exposto em relação ao grupo C (controle) ($p > 0,05$). 28

LISTA DE ABREVIACOES

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ABNT-NBR - Associação Brasileira de Normas Técnicas – Norma Brasileira

BOD - Biochemichal oxygen demand

CAT - Catalase

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo

CO₂ - Gás Carbnico – Dióxido de Carbono

EROs - Espécies reativas de oxignio

FSD - Fração solúvel do óleo diesel

GST - Glutaciona S-Transferase

GSH - Glutaciona

GPx - Glutaciona Peroxidase

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IPCC - Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas

L - Litros

mL - Mililitros

M - Molar

mg/L - Miligramas por litro

µg/L - Microgramas por Litro

ONU - Organização das Nações Unidas

pCO₂ - Pressão Parcial de Dióxido de Carbono

RCP - Representative Concentration Pathways

SET - Sea-urchin embryo test

SOD - Superóxido Dismutase

UNEP - Programa Ambiental das Nações Unidas

UVV - Universidade de Vila Velha

WMO - Organização Metrológica Mundial

RESUMO

Caetano, Livia Sperandio, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, junho de 2018. Efeitos da associação do aumento da temperatura, diminuição do pH e contaminação por chumbo no desenvolvimento embrio-larval de ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*). Orientadora: Adriana Regina Chippari Gomes.

O aumento da temperatura e a diminuição do pH da água (provocado pela elevação de CO₂) juntamente com a contaminação de metais, incluindo o chumbo, possuem enorme potencial toxicológico apresentando diversos efeitos nos organismos vivos deste ambiente. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos de alterações nas condições de desenvolvimento embrio-larval de *Echinometra lucunter* relacionados com mudanças climáticas (excesso de CO₂ e aumento da temperatura) e contaminação por chumbo. A toxicidade do excesso de CO₂ (pH reduzido) também foi avaliada em gônadas de indivíduos adultos dessa mesma espécie, por meio de análises de estresse oxidativo (atividade das enzimas GST e CAT), assim como, o potencial tóxico do pH nas taxas de reprodução desses indivíduos adultos. Foram realizados testes de taxa de fecundidade (gameta) e taxa de desenvolvimento embrio-larval expondo gametas e embriões às temperaturas de 26 °C (controle) e 28 °C, aos pHs 8,2 (controle) e 7,4, às concentrações de chumbo de 0 (controle), 125, 250 e 500 µg/L. Essas condições foram testadas de forma isolada e associadas umas com as outras. Os testes com os embriões demonstraram serem mais sensíveis às mudanças das condições do meio do que em relação ao teste com os gametas. O teste de desenvolvimento larval apresentou quase todos os tratamentos com taxas menores em relação ao controle. Enquanto que o teste com embriões apresentou a viabilidade reduzida apenas nos tratamentos com temperatura elevada (28 °C) e o tratamento com combinação de temperatura elevada e pH reduzido (28 °C e 7,5). Em relação ao teste com os ouriços adultos, as atividades das enzimas GST e CAT não sofreram alterações significativas nos diferentes tratamentos. E as taxas de fecundação e desenvolvimento larval também não apresentaram diferenças significativas nos diferentes tratamentos. Em geral, o presente estudo sugere que as mudanças previstas com a acidificação e elevação da temperatura, juntamente com a poluição de metais do oceano ao longo do próximo século podem ter um impacto significativo nas taxas de fecundidade e de desenvolvimento embrio-larval de *E. lucunter*.

Palavras chaves: Taxa de fecundidade, teste de desenvolvimento embrio-larval, gametas, mudanças climáticas.

ABSTRACT

Caetano, Livia Sperandio, M.Sc., Vila Velha University - ES, June, 2018. Effects of the temperature increase, pH decrease and lead contamination association on embryo-larval development of sea urchin (*Echinometra lucunter*). Advisor: Adriana Regina Chippari Gomes.

The increase in temperature and the decrease in water pH, the main consequences of global warming, have different effects that can harm all marine biota. These damages can be potentiated if associated with metals contamination, including lead, which has enormous toxicological potential and has several effects on living organisms in this environment. Thus, the objective of this work was to evaluate the effects of changes in *Echinometra lucunter* embryo-larval development conditions related to climate change (CO₂ excess and temperature increase) and lead contamination. The toxicity of pCO₂ (reduced pH) was also evaluated in gonads of adult individuals of the same species, by oxidative stress analyzes (GST and CAT enzyme activity), as well as the toxic potential of pH in reproduction rates of these adult individuals. Fertility rate (gamete) and embryo-larval development rate were determined by exposing gametes and embryos at pH 8.0 (control) and 7.4 at 26 °C (control) and 28°C at the concentrations of 0 (control), 125, 250 and 500 µg/L. These conditions were tested isolated and associated with each other. The embryo test was shown to be more sensitive to changes in environmental conditions than to the gametes test. The larval development test presented almost all treatments with lower rates in relation to the control. While the embryo test showed reduced viability only in high temperature treatment (28 °C) and high temperature and low pH (28 °C and 7.5) treatment. Regarding the test with the adult urchins, GST and CAT enzymes activities did not undergo significant alterations in the different treatments. And the rates of fertilization and larval development also did not show significant differences in the different treatments. In general, the present study suggests that the predicted changes with acidification and elevation of temperature along with pollution of ocean metals over the next century may have a significant impact on embryo-larval embryo-larval development rates of *Echinometra lucunter*.

Key words: Fertility rate, embryo-larval development test, gametes, climatic changes.

1. INTRODUÇÃO

A acidificação da água do mar, juntamente com o aumento da temperatura global, são as principais consequências do fenômeno conhecido como aquecimento global. Este fenômeno é causado pelo aumento das emissões dos gases que intensificam o efeito estufa. Estudos sugerem que tanto o aumento da temperatura quanto a diminuição do pH da água (devido ao aumento da $p\text{CO}_2$) possuem diferentes efeitos que podem prejudicar toda biota marinha, como por exemplo aumentar a biodisponibilidade de metais e conseqüentemente aumentar a bioacumulação nos tecidos; afetam o desenvolvimento, as taxas de mortalidade, a sobrevivência, a resposta imunológica dos organismos viventes nesse ambiente e entre outros fatores (Campbell e Strokes, 1985; Pepin, 1991; Dupont, et al., 2010; Wang et al., 2016a).

Associados a essas mudanças nas condições ambientais somam-se os efeitos da contaminação por diversos agentes tóxicos no ambiente marinho sobre a biota. Dentre esses agentes tóxicos, os metais são um dos mais amplamente distribuídos e uma vasta documentação na literatura é encontrada relatando a toxicidade dos metais em organismos aquáticos (Atchison et al., 1987; Oliveira et al., 2014; Nascimento e Martinez, 2016). Dentre os metais, o chumbo é um dos cinco de maior toxicidade e um dos mais presentes no ambiente marinho, sendo que a média de chumbo na água do mar é de $0.003 \mu\text{g/L}$ (Farombi et al., 2007). A introdução do chumbo em ambientes aquáticos ocorre naturalmente por processos geoquímicos, como emissões vulcânicas e intemperismo químico. Porém atividades antrópicas têm contribuído para o aumento substancial desse metal na natureza, devido ao seu amplo uso em atividades industriais (Socolow et al., 1994). A contaminação desse metal no ambiente marinho possui enorme potencial toxicológico apresentando diversos efeitos nos organismos viventes deste ambiente, como distúrbios neurológicos, renais e reprodutivos (Landrigan, 1989), especialmente se associados à acidificação da água (Wang et al., 2016b).

Uma gama de testes de toxicidade em organismos vem sendo utilizada para identificar os efeitos desses agentes tóxicos no ambiente marinho e assim fornecer

informações que dão suporte para determinação dos impactos dessas substâncias no ambiente (Singh et al., 1988; Dinnel et al., 1989; Brendler-Schwaab et al., 2005). O teste com gametas e embriões de espécies de ouriços-do-mar (Teste do Ouriço) é um dos testes de toxicidade que tem sido amplamente utilizado como ferramenta de análise da qualidade do ambiente marinho (Kobayashi, 1971, 1977; Rouchon et al., 2016; Pagano et al., 2017). No Brasil, esse teste foi introduzido pela CETESB e adotado como base pela ABNT devido sua facilidade relativa de realização, rapidez na obtenção de resultados, confiabilidade dos resultados e baixo custo de realização do teste (Soares et al., 2016).

Testes bioquímicos enzimáticos também têm trazido bons resultados para acessar a toxicidade de substâncias exógenas (por exemplo, os metais) em diversos organismos e de propriedades físico-químicas da água como temperatura e pH (Qu et al., 2014; Primost et al., 2015). Assim, são considerados bons biomarcadores da qualidade da água, uma vez que o aumento ou inibição enzimática pode ser indicativo de algum estresse ambiental (Javed et al., 2016), já que algumas enzimas estão envolvidas na detoxificação desses organismos (Glutathione S-Transferase - GST e Glutathione Peroxidase - GPx) e em processos antioxidantes (Superóxido Dismutase - SOD e Catalase - CAT).

Esses testes de toxicidade e análises referentes às diferentes respostas dos organismos frente aos agentes tóxicos vêm sendo realizados em organismos tidos como bioindicadores. Adams e Greeley (2000) define bioindicadores como organismos que são utilizados como indicadores dos primeiros efeitos da contaminação de um habitat. Estudos tem demonstrado que ouriços-do-mar são excelentes bioindicadores por se apresentarem sensíveis a contaminantes exógenos (Dinnel et al., 1989; Resgalla et al. 2002), além de características como sua ampla distribuição geográfica, baixa mobilidade, grande importância ecológica, abundância e fácil identificação no ambiente (Mcperson, 1965; Lawrence, 1975).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos de alterações nas condições de desenvolvimento embrio-larval de ouriço-do-mar relacionados com as mudanças climáticas e com a contaminação por chumbo. Para tal promoveu-se o aumento da temperatura, a alteração do pH da água (por meio do aumento da pCO₂) e adição de chumbo à água dos testes de fecundidade dos gametas e de

desenvolvimento larval. O efeito do aumento da $p\text{CO}_2$ também foi avaliado em ouriços adultos expostos a redução do pH, nos quais foram analisados o estresse oxidativo utilizando os biomarcadores bioquímicos GST e CAT, assim como, o possível potencial tóxico do pH nas taxas de reprodução desses indivíduos adultos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aumento da temperatura da água e acidificação dos oceanos:

O aumento das temperaturas médias dos oceanos e da atmosfera faz parte do fenômeno conhecido como aquecimento global, sendo esta a mais importante consequência do efeito estufa. O efeito estufa é um processo natural, o qual parte do calor é retido próximo à superfície da Terra devido a presença de determinados gases, chamados de gases estufa (CO_2 e metano, óxido nitroso). Esse fenômeno é importante, pois permite que a temperatura se mantenha estável e agradável favorecendo a manutenção da vida. Porém, devido à atividade antrópica, principalmente em relação à queima de combustíveis fósseis, houve um aumento nas emissões desses gases, acarretando no agravamento acelerado desse processo (IPCC, 2013^a; Cline, 2016). O aumento da temperatura afeta diretamente na fisiologia (taxas de crescimento, metabolismo); na fenologia (ciclos de vida); na distribuição individual das espécies, que poderão afetar toda a ecologia no que diz respeito às interações, competição, taxa de extinção, e em entre outros diversos fatores entre as espécies (Hudhes et al., 2000).

A acidificação dos oceanos é uma das principais consequências do aumento das emissões de gás carbônico (CO_2) na atmosfera, além do aumento da temperatura global, sendo conhecida na literatura como “O outro problema do CO_2 ” (Brewer e Barry, 2008). O gás carbônico é, sem dúvida, o mais importante dos gases estufa e sua concentração na atmosfera aumentou de aproximadamente 280 ppm antes da Revolução Industrial para 403 ppm no ano de 2016 (ESRL - Earth System Research Laboratory, 2016), atingindo o seu nível mais alto dos últimos 800 mil anos (Lüthi et al., 2008). Cerca de 25% do CO_2 emitido na atmosfera é absorvido pelos oceanos (Canadell et al., 2007), levando a uma diminuição do pH e aumento de pCO_2 da água. Como consequência desse processo, o pH do mar já diminuiu em 0,1 unidade desde 1800 (IPCC, 2013b e se as emissões de CO_2 na atmosfera continuarem no mesmo nível a redução de pH pode chegar em 0,7 unidades em 2100 (Caldeira e Wicket, 2003).

O fenômeno de acidificação ocorre quando o CO_2 é absorvido pelo oceano e ao entrar em contato com a água provoca uma reação química formando o ácido

carbônico (H_2CO_3). Este ácido, por sua vez, se dissocia liberando hidrogênio (H^+) e íons carbonato (CO_3^{3-}), segundo a equação 1. O aumento da quantidade de H^+ na água fará com que o seu pH diminua (Doney et al., 2009).



Acerca deste problema, com o objetivo de prevenir ou mitigar as mudanças climáticas, a Organização das Nações Unidas (ONU) em parceria com a Organização Meteorológica Mundial (WMO) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) estabeleceram o Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC), que é responsável por elaborar relatórios que descrevem os cenários ambientais futuros. Esses cenários são chamados de RCPs (Representative Concentration Pathways) e se baseiam em premissas sobre crescimento populacional, crescimento econômico, consumo de energia e uso das terras. O relatório do IPCC 2013a (5° AR5 – Fifth Assessment Report) estabeleceu quatro cenários de mitigação de emissão de gases estufa: RCP 2.6, cenário mais otimista, o qual prevê que as emissões de CO_2 irão atingir 440 ppm no meio do século e depois irão diminuir lentamente; RCP 4.5, cenário brando, as emissões de CO_2 atingirão aproximadamente 500 ppm em 2100; RCP 6, é o cenário moderado que prevê aproximadamente 600 ppm em 2100; RCP 8.5, cenário drástico, na qual as emissões de carbono irão aumentar rapidamente, prevendo atingir 950 ppm em 2100.

O aumento da concentração de CO_2 na água, causado pela absorção desse gás pelos oceanos e sua consequente diminuição no pH é um fenômeno preocupante, pois apresenta diversas consequências para o ecossistema marinho, tanto como fator isolado (Havenhand et al., 2002; Kapsenberg et al., 2017) mas também nas interações com metais, por exemplo. A diminuição do pH da água do mar pode levar a diminuição da taxa de fecundidade de alguns organismos, como os equinoides (Havenhand et al., 2008.; Byrne et al., 2010a; Passarelli et al., 2017). Isso pode afetar todas as interações ecológicas de uma cadeia trófica, já que os ouriços são organismos de grande importância ecológica (Lawrance, 1975). No que diz respeito à bioacumulação de metais, o pH reduzido pode potencializar o efeito tóxico de metais em organismos. Estudos sugerem que indivíduos que habitam águas acidificadas frequentemente possuem maior presença de metais em seus

tecidos (Spry e Wiener, 1991; Wang et al., 2016), já que o pH influencia na especiação química e solubilidade da maioria dos metais de forma que solubilidade aumenta e uma maior proporção de metal aquoso total fica disponível como íon metálico livre (Campbell e Stokes, 1985; Spry e Wiener, 1991).

2.2 Poluição aquática e contaminação por metais:

Desde os primórdios da humanidade, com a descoberta do fogo, o meio ambiente vem sendo contaminado por metais através da queima da madeira, liberando pequenas quantidades de metais no meio ambiente (Etiégni e Campbell, 1991). Embora muitas destas substâncias possam ser originadas de fontes naturais, tais como lixiviação de rochas e erosão (Georgopoulos et al., 2002), as atividades humanas têm aumentado, consideravelmente, a concentração deste poluidor nos mais diversos ecossistemas. Assim, a partir do século 19, com a Revolução Industrial, a quantidade de metais liberados no meio aumentou drasticamente pelo seu uso indiscriminado e, desde então, vem sobrecarregando os ciclos biogeoquímicos de metais em diversos ecossistemas (Nriagu, 1996). No ambiente aquático a contaminação se dá, principalmente, pelo descarte de resíduos dos processos industriais, de mineração e esgoto doméstico lançado diretamente nos rios; por lixiviação de resíduos de pesticidas e fertilizantes da agricultura; além da contaminação indireta pela precipitação dessas substâncias presentes no ar contaminado (He et al., 2005).

O chumbo está entre os cinco metais de maior toxicidade, é um elemento químico cujo símbolo é Pb, possui número atômico 82 e massa atômica igual a 207,2 u. Apesar de ocorrer naturalmente no ambiente, atividades antropogênicas contribuíram o aumento da sua concentração. Esse metal apresenta largo uso na indústria e agricultura, pelas suas características de maleabilidade, baixo ponto de fusão e densidade elevada. As principais atividades consideradas fontes emissoras de chumbo são as atividades de mineração e produção de baterias, mas também podem ser encontrados em inúmeras outras atividades (Capitani et al., 2009). O chumbo pode estar presente em todos os tipos de ambiente, tanto no ar, solo e ambientes aquáticos (Landrigan et al., 1994), no ambiente marinho a quantidade

média de chumbo que existe é de 0,003 $\mu\text{g/L}$ (Farombi et al., 2007). Na baía de Vitória, ES, o chumbo possui uma das maiores concentrações entre os metais, alcançando um valor médio de 0,44 $\mu\text{g/L}^{-1}$ (Medeiros et al., 2016). Esse valor é superior às quantidades permitidas pelos limites da legislação CONAMA nº357/2005, sendo um valor preocupante.

Em novembro de 2015 um houve um desastre de grandes proporções que contribuiu bastante no que diz respeito à contaminação de metais no ambiente aquático, que foi o rompimento de uma barragem de Fundão da Mineradora Samarco. Esse acidente ocorreu no distrito de Mariana (MG) e derramou cerca de 62 milhões de metros cúbicos de lama com rejeitos de mineração, que seguiu pelo curso do Rio Doce afetando uma extensão de 650 quilômetros até desaguar no mar de Regência, no município de Linhares no Espírito Santo. Acerca desse contexto o ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade) realizou um estudo no sentido de esclarecer as quantidades de metal presentes em diversos ponto da costa do Espírito Santo. Nos pontos estudados foram encontrados os seguintes metais: arsênio, cádmio, cromo, cobre, ferro, manganês e chumbo, sendo que em muitos casos os níveis observados representaram concentrações acima dos limites permitidos pela Resolução 347 do CONAMA para as águas de Classe I (10 $\mu\text{g/L}$ Pb Total). O chumbo apresentou uma das maiores concentrações encontradas nas amostras de água (130,4 $\mu\text{g/L}$ Pb Total), perdendo apenas para o Ferro (Bianchini, 2016). Nesse contexto, uma grande gama de estudos tem se direcionado a entender os efeitos dessas substâncias tóxicas na fisiologia, reprodução, sobrevivência, até mesmo no comportamento, dentre outros aspectos nos organismos marinhos (Sphear, 1978; Dinnel et al., 1989; Malik et al., 2010; Oliveira et al., 2014) no sentido de compreender as interações dos metais com os organismos a fim de avaliar os seus potenciais danos à biota aquática dessa região.

Os metais, incluindo o chumbo, possuem enorme potencial toxicológico para os organismos aquáticos, podendo prejudicar vários processos como, por exemplo, a reprodução, especialmente no que diz respeito ao desenvolvimento larval de ouriços-do-mar (Hardy et al., 2014). Muitos pesquisadores relataram que anomalias no desenvolvimento embrio-larval podem ser induzidas por alguns metais, assim

essas anomalias podem atuar como bons indicadores em bioensaios de poluição aquática (Kobayashi e Okamura, 2004).

2.3 Estudos ecotoxicológicos:

Tanto os efeitos tóxicos dos metais no ambiente marinho, quanto os fatores abióticos como temperatura e pH da água têm sido amplamente estudados pela comunidade científica. Estes efeitos podem apresentar diversas propriedades, tais como: bioacumulação nos tecidos, alterações morfológicas e metabólicas, efeitos carcinogênicos, os quais podem prejudicar o organismo como um todo (Swell et al., 1999; Radenac et al., 2001; Kobayashi e Okamura, 2004; Parker et al., 2009; Byrne et al., 2010).

O estudo da ecotoxicologia integra princípios de várias ciências e tem sido realizado no sentido de acessar a interação de substâncias tóxicas e sistemas biológicos. Deste modo, é realizada não só a análise dos efeitos abióticos do sistema, mas também os efeitos provocados nos organismos presentes nesse ambiente para que todos os fatores que apresentam influências sejam englobados, a fim de representar o cenário completo de intoxicação (Connolly, 1985; Borgmann e Norwood, 1995). Essa ferramenta é, portanto, importante para avaliação de aspectos sobre a qualidade do ecossistema, atividades de monitoramento ambiental e ainda pode ser utilizada na previsão dos efeitos do impacto de um contaminante exógeno no meio ambiente (Adams et al., 1989; Adams e Greeley, 2000). Para realização de tais estudos toxicológicos são feitos testes de toxicidade, também chamados de bioensaios, em organismos-teste, denominados bioindicadores, para estimar a toxicidade das substâncias (Azevedo e Chasin, 2003).

Para compreender a toxicidade dos metais, fatores abióticos (como temperatura e pH) e seus efeitos na biota marinha, uma enorme gama de estudos tem sido conduzida, e esses estudos tem demonstrado algumas alterações em espécies aquáticas, principalmente em relação à alterações nas taxas de fertilização e sensibilidade embrio-larval, taxas metabólico-enzimáticas e imunológicas (Dinnel

et al., 1989; Sewell e Young, 1999; Parker et al., 2009; Byrne et al., 2010a; Hardy et al., 2014; Primost et al., 2015; Brothers et al., 2016; Passarelli et al., 2017).

2.4 Bioindicadores (*ouriço-do-mar - Echinometra lucunter*):

Bioindicador é um conceito usado para a avaliação de risco ecológico e biomonitoramento ambiental (McCarty et al., 2002). A abordagem de bioindicador utiliza organismos, populações ou comunidades de organismos, que indicam os primeiros efeitos de um poluidor em um ambiente ou organismos através de variações em nível bioquímico, fisiológico ou funcional (biomarcadores) (Adams et al., 1989; Adams e Greeley, 2000). Desta forma, é mais eficiente o uso de bioindicadores em estudos de biomonitoramento do que apenas realizar medidas de parâmetros físicos e químicos do ambiente (temperatura, pH, nutrientes, entre outros), pois essa abordagem oferece uma resposta integrada dos organismos com as modificações ambientais (Keeler e McLemore, 1996).

Um bioindicador ideal deve apresentar características especiais, como: resistência relativa ao contaminante, no sentido de não ser sensível demais e nem apresentar alta resistência; abundância; fácil identificação; aspectos de sua biologia e ecologia bem conhecidos; ampla distribuição geográfica, importância ecológica e, além disso, adaptabilidade a ensaios laboratoriais (Johnson et al., 1993). Apesar de ainda pouco estudados, estudos recentes têm demonstrado que o ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) tem grande potencial, sendo excelentes bioindicadores (Resgalla, 2002).

2.5 Ensaio com gametas e embriões de ouriço-do-mar - *Echinometra lucunter*:

Bioensaios utilizando gametas e embriões de ouriços-do-mar (sea-urchin embryo test – SET) foram desenvolvidos por pesquisadores no sentido de proporcionar um teste que apresente sensibilidade na identificação de contaminantes, rapidez e facilidade de aplicação para uso no biomonitoramento ambiental (Resgalla, 2002). Os ouriços-do-mar possuem fecundação externa, assim

qualquer distúrbio no ambiente pode gerar grandes consequências à ecologia da espécie devido à exposição das fases mais sensíveis (embriões e gametas) ao ambiente.

No Brasil, o órgão responsável pelo desenvolvimento de protocolos de testes de toxicidade é a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Apesar de que a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) também tem padronizado testes de toxicidade. A padronização dos procedimentos adotados permite que os resultados obtidos possam ser utilizados com maior segurança e confiabilidade para avaliar os impactos ambientais do ambiente. Em 2006, a ABNT desenvolveu um protocolo para a espécie *Echinometra lucunter*, e a partir de então essa espécie vem sendo cada vez mais utilizada em testes toxicológicos. No Brasil, o uso de teste com gametas e embriões foi amplamente difundido pela sua facilidade relativa de realização, sensibilidade a contaminantes, rapidez e baixo custo de realização, já que utiliza ferramentas simples de laboratório (Dinnel et al., 1989; Kobayashi, 1977). Por isso é considerado uma excelente ferramenta para acessar os danos de contaminantes em ensaios toxicológicos e com a recente elucidação da ecologia reprodutiva por alguns estudos (Mariane et al., 2009) esta espécie está se tornando cada vez mais popular.

2.6 Biomarcadores (enzimas):

Como consequência das interações biológicas entre agentes químicos e organismos, podem surgir diversas alterações nos parâmetros biológicos, que podem ser usados como indicadores de contaminação, denominados de biomarcadores. Assim sendo, os biomarcadores são definidos como toda substância ou seu produto de biotransformação ou ainda qualquer alteração bioquímica, cuja quantificação indique a intensidade da exposição do organismo a determinado contaminante e seu risco à saúde como um todo (Hook et al., 2016). Segundo McCarty e Munkittrick (1996), existem quatro classes de biomarcadores: bioquímicos (enzimas, hormônios), fisiológicos (crescimento, reprodução), toxicológicos

(comportamento, mutagenicidade, carcinogenicidade, letalidade) e ecológicos (mudanças em nível de comunidades).

Testes bioquímicos enzimáticos têm trazido bons resultados para avaliar a toxicidade em organismos aquáticos, já que algumas enzimas estão envolvidas na detoxificação desses organismos (Glutathione S-Transferase - GST) e em processos antioxidantes (Catalase – CAT). A GST é uma das enzimas detoxificantes mais estudadas em diferentes organismos, uma vez que possuem um papel essencial em mecanismos de detoxificação intracelular tanto de compostos endógenos, quanto de xenobióticos. Esta enzima desempenha a função de iniciação no processo de detoxificação, catalisando a conjugação de glutathione (GSH) com vários compostos tornando os produtos da reação menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando a excreção desses metabólitos. Sendo assim, a GST é considerada a principal enzima detoxificante da fase II (Habig, 1974; Torres et al., 2004). Enquanto que a catalase é uma enzima muito importante que está presente em todos os organismos vivos. Sua principal função é a defesa contra peróxidos, protegendo os organismos do estresse oxidativo, transformando peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Aebi, 1974).

2.7 Ecologia da espécie *Echinometra lucunter*:

Ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunter* são pertencentes ao grupo dos equinodermos (filo Equinodermata). Estes animais são invertebrados, exclusivamente marinhos e estão distribuídos ao longo de todos os oceanos. Existem 5 Classes de Equinodermos: crinoidea (lírios-do-mar), asteroidea (estrelas-do-mar), ophiuroidea (serpentes-do-mar), holothuroidea (pepinos-do-mar), sendo que *E. lucunter* pertence a Classe Echinóidea junto com os outros ouriços-do-mar (Sugni et al., 2007).

Echinometra lucunter são bentônicos e podem ser encontrados em quase todo litoral brasileiro em regiões rochosas. Possuem corpo globoso, simetria radial e pouca mobilidade. Têm espinhos móveis de tamanho variado, presos a uma carapaça calcária rígida. São organismos com intenso potencial berosivo, e como se

alimentam de algas e pequenos benton podem controlar essas populações no ecossistema marinho possuindo assim grande importância ecológica dentro de uma cadeia trófica (Lawrance, 1975).

Com relação à reprodução de *E. lucunter*, os indivíduos não apresentam dimorfismo sexual, sua fecundação é externa e o desenvolvimento é indireto, com formação de uma larva equinoplúteo que irá sofrer metamorfose para posteriormente se desenvolver e se tornar adulto (Hendler et Al., 2009). O período de reprodução apresenta sazonalidade, com o maior pico de desova ocorrendo no verão (Lima et al., 2009; Mariante et al., 2009). Outro aspecto interessante sobre a desova da espécie *E. lucunter* é o fato de esta estar relacionada com o ciclo lunar, sendo maior o Índice Gonadossomático nas fases de lua crescente e cheia (Mariante et al., 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de Organismos:

Ouriços-do-mar da espécie *E. lucunter* foram coletados em uma região de lateritos ferruginosos localizado na praia Curva da Baleia em Jacaraípe, litoral norte do Estado do Espírito Santo (20°10'24.32"S, 40°11'11.89"O), os quais foram utilizados em dois protocolos experimentais. Para o protocolo experimental I, foram coletados 20 indivíduos, por coleta, a fim de se ter uma proporção considerável de machos e fêmeas para extração de gametas. Para o protocolo experimental II, foram coletados 42 indivíduos a fim de ser ter o número amostral adequado para o bioensaio com indivíduos adultos.

Os ouriços-do-mar foram coletados manualmente na maré baixa, entre os meses de novembro de 2017 a abril de 2018, as coletas foram realizadas ao final da lua crescente e início da lua cheia de cada mês (período reprodutivo) e período de maré baixa de acordo com o proposto por Mariantes et al. (2009). As coletas foram realizadas mensalmente e imediatamente após a coleta, os ouriços foram transportados para o Laboratório de Ictiologia Aplicada (Lab Peixe – Complexo Biopráticas da Universidade Vila Velha – UVV) onde permaneceram devidamente acondicionados em aquários de polietileno com capacidade de 20 L (3 animais por aquário) e com aeração constante até o momento da obtenção da desova imediata para obtenção dos gametas ou do início dos experimentos com os adultos. A água do mar coletada (no mesmo lugar de coleta dos organismos) foi filtrada e mantida as condições físico-químicas, respeitando os valores adequados de salinidade (35), temperatura (25 °C) e pH (7,8-8,3) para os testes com ouriços-do-mar, de acordo com a norma da ABNT-NBR 15350 de métodos de ensaio com ouriços-do-mar (Echinodermata:Echinoidea)/2006.

3.2 Obtenção de gametas utilizados nos protocolos I e II:

A indução da liberação de gametas foi realizada por meio da injeção de 2,5 mL de solução 0,5 M de cloreto de potássio (KCl) na cavidade celomática dos ouriços. Os óvulos das fêmeas foram coletados em béqueres de 50 mL contendo água do mar filtrada (Figura 1). Após a observação de sua qualidade com o auxílio

de um microscópio invertido (aumento 40x), os óvulos de todas as fêmeas foram peneirados (malha de 45 μm) para retenção de detritos, transferidos e acondicionados em um único béquer de 1 L. Sua densidade (n° de óvulos/ mL) foi estimada, visando calcular o volume de solução de óvulos acondicionados em cada réplica. O líquido espermático dos machos foi coletado com auxílio de uma pipeta Pasteur e acondicionado em um béquer de 50 mL sem presença de água e mantido em gelo até o momento de sua utilização. Para uma desova de qualidade deve se ter no mínimo três indivíduos machos e no mínimo de três indivíduos fêmeas. Para garantir esse número foram coletados cerca de 20 indivíduos em cada coleta, uma vez que nem todos os indivíduos apresentam liberação de gametas e a diferenciação do sexo ocorre apenas no momento em que os gametas são liberados (Figura 2 e 3). A obtenção de gametas seguiu a norma ABNT-NBR 15350 de métodos de ensaio com ouriços-do-mar (Echinodermata:Echinoidea)/2006.



Figura 1. Gametas femininos de fêmeas de *Echinometra lucunter* sendo coletados em béqueres.



Figura 2. Espécimes macho de *Echinometra lucunter* no momento da liberação dos gametas. A cor esbranquiçada dos gametas indica que os espécimes são machos.



Figura 3. Espécime fêmea de *Echinometra lucunter* no momento da liberação dos gametas. A cor alaranjada dos gametas indica que os espécimes são fêmeas.

3.3 Protocolo Experimental I:

Os tratamentos testados nos bioensaios com gametas e embriões de *Echinometra lucunter* (com gametas e embriões) estão descritos conforme o desenho experimental detalhado na Figura 4.

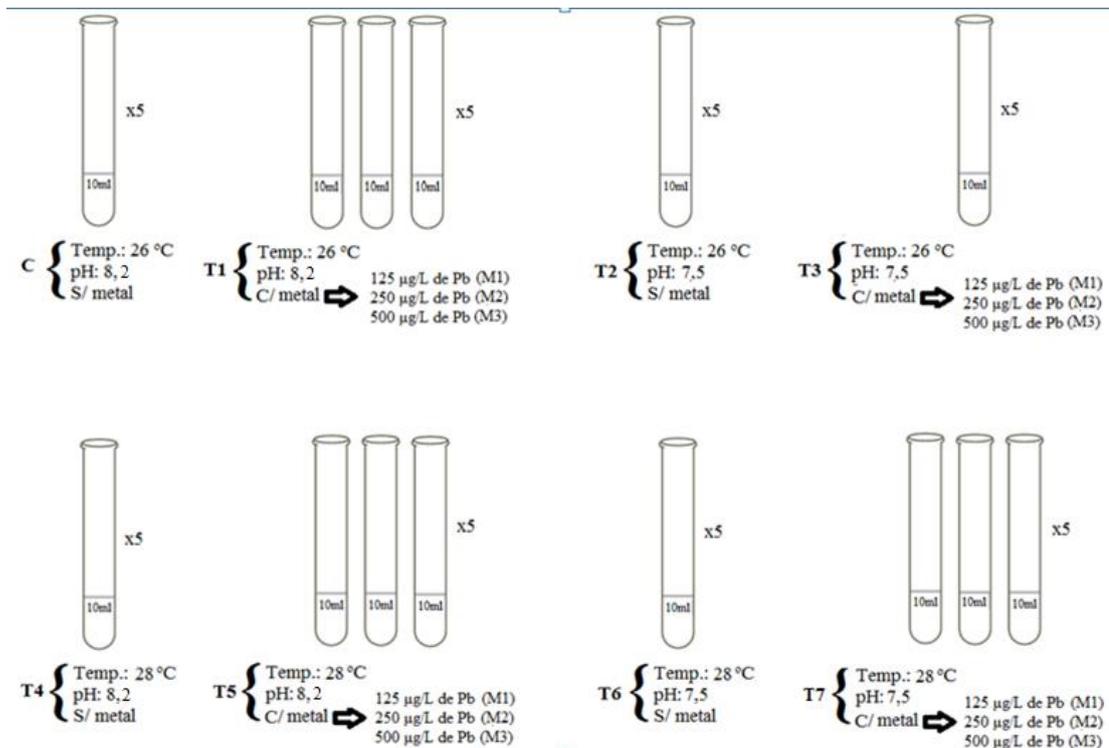


Figura 4. Desenho experimental indicando os tratamentos testados com gametas e embriões de *Echinometra lucunter*.

As concentrações de metais foram escolhidas de acordo com as concentrações encontradas no Relatório do ICMBio, na qual foram encontradas concentração de chumbo de aproximadamente 10 a 135 µg/L (Bianchini, 2016); Porém os efeitos danoso nos testes pretéritos ocorreram apenas acima de 125 µg/L de chumbo, assim foi utilizado como sendo esta a menor concentração testada. Também foi testado o valor correspondente ao valor de EC₅₀ para o chumbo da espécie: 250 µg/L de chumbo de acordo com Soares e Resgalla (2016) e valores realizados em testes piloto (500 µg/L de chumbo). A temperatura e o pH foram determinados baseados nas previsões do relatório do IPCC (2013b) para 2100 (diminuição de 0,7 no pH e aumento de 2 graus da temperatura) no intuito de simular cenários futuros.

Esse desenho experimental foi dividido em dois dias de experimento, sendo que o primeiro experimento foi realizado para os grupos Controle, Tratamento 1, Tratamento 2 e Tratamento 3 devido ao fato destes experimentos terem sido mantidos em uma única incubadora refrigerada B.O.D (TE-371) com temperatura controlada de 26 °C. Já o segundo experimento foi dos grupos: Tratamento 4, Tratamento 5, Tratamento 6 e Tratamento 7, já que estes foram mantidos também em incubadora refrigerada B.O.D (TE-371), porém com a temperatura controlada de 28 °C. A redução de pH foi feita através de injeção de CO₂ na água do mar por meio do aparelho Miliwawkee versão MC110, em que foi obtida a média de 39±3 mg/L de pCO₂ nas amostras de pH reduzido e 5±2 mg/L para as amostras do Controle. A medida de pCO₂ foi realizada indiretamente pela medida de alcalinidade e pH (pHmetro HANNA instruments, versão HI 2223) (Frankignoulle e Borges, 2001). A alcalinidade total foi determinada por um titulador semiautomático, com 50 mL da amostra de água do mar (Rodrigues-Romero, 2014). Os cálculos de pCO₂ foram realizados pelo Carbon Dioxide Calculator desenvolvido por Aquaculture Solutions and Aquatic Eco-Systems Inc.

3.3.1 Bioensaio com Gametas e Embriões de *Echinometra lucunter*:

Para o teste de toxicidade crônica com gametas (teste de fertilização), após a obtenção dos gametas e a validação dos mesmos, 1 mL de líquido espermático foi diluído em 50 mL de água do mar para ativação e então, 20 µL dessa solução foi adicionada a tubos de ensaio de 20 mL, contendo 10 mL de água do mar em cada tubo de acordo com os tratamentos descritos no desenho experimental. Após 20 min, 400 µL da solução dos óvulos (calculado através da densidade) foram adicionadas a estes tubos de ensaio contendo os espermatozoides para promover a fertilização. Depois de 40 minutos, todos os tubos de ensaio foram fixados com 0,5 mL de formaldeído para observação da taxa de fertilização. A porcentagem de fertilização de cem ovos foi determinada com auxílio de um microscópio invertido (aumento 40x) e câmera de Sedgwick-Rafter. Para os testes de fertilização foram realizadas um total de quatro desovas e, para cada uma das desovas o teste foi feito em quintuplicatas. Para a aceitabilidade do resultado do ensaio foi necessário que a porcentagem de ovos fertilizados no controle fosse superior ou igual a 80 %.

Para o teste de toxicidade crônica com embriões (larvas pluteus), os gametas femininos peneirados foram adicionados em um béquer de 1 L contendo 600 mL de água do mar filtrada em filtro analítico (47 mm), logo após, 2 mL da solução já diluída e ativada do espermatozoide foi adicionada a esta solução contendo os óvulos (Figura 5). A solução foi agitada por 3 minutos para promover a fecundação e em seguida deixada em repouso por 2 horas para o início do desenvolvimento embrionário. Após 2 horas de fecundação, 100 µL da solução de ovos foram adicionados aos tubos de ensaio de 20 mL com o mesmo desenho experimental do teste de fecundação. Ambos os experimentos foram mantidos em fotoperíodo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro, por 36 horas, sendo este o tempo necessário para os embriões de *E. lucunter* se desenvolverem até o estágio de larvas pluteus. Depois de 36 horas, todos os tubos de ensaio foram fixados com 0,5 mL de formaldeído 0,5 M para avaliação dos embriões normais (corpo bem caracterizado em formato triangular e braços desenvolvidos) e também aqueles que apresentaram alguma anomalia morfológica ou retardamento no seu desenvolvimento (corpo desestruturado e não desenvolvido e qualquer estágio primário de desenvolvimento

embrionário) (Anexo 1). A avaliação dos embriões foi feita com auxílio de um microscópio invertido (aumento 40x) e câmera de Sedwick-Rafter. Para o teste de embriões foi realizado um total de duas desovas, e para cada desova o teste foi realizado em quintuplicata. Para a aceitabilidade do resultado do ensaio foi necessário que a porcentagem de larvas pluteus bem desenvolvidas no controle fosse superior ou igual a 80 %.



Figura 5. Líquido espermático de *Echinometra lucunter* diluído em água do mar, à esquerda. Óvulos de *E. lucunter* acondicionados em um béquer de 1 L, à direita.

Ambos os testes de toxicidade crônica com gametas e embriões foram realizados de acordo com a norma ABNT-NBR 15350 de métodos de ensaio com ouriços-do-mar (Echinodermata:Echinoidea)/2006).

3.4 Protocolo Experimental II:

3.4.1 Período de aclimação dos ouriços-do-mar adultos:

Após a coleta de 42 indivíduos, os ouriços-do-mar foram mantidos em aquários de plástico com capacidade de 20 L (três animais por aquário), num total de 14 aquários. Os aquários com os organismos adultos foram mantidos em condições de aeração constante e com troca diária total de água e salinidade de 35 UPS. Os organismos foram alimentados com macroalgas da espécie *Ulva lactuca* uma vez ao dia. O período de aclimação foi de 24 h.

3.4.2 Bioensaio com adultos de *Echinometra lucunter*:

Após período de aclimatação, os exemplares de *E. lucunter* foram submetidos a um bioensaio de quatro dias (96 h). Os organismos foram mantidos em 14 aquários de polietileno com capacidade de 20 L, com três indivíduos em cada aquário, totalizando 42 indivíduos (Figura 6). Os aquários eram dotados de aeração constante, e a temperatura média da água em ± 24 °C. Os ouriços-do-mar foram expostos a dois tratamentos: grupo controle (C - sem a presença do contaminante) e o grupo com pH reduzido, sendo 7 aquários para cada tratamento, ou seja, sete réplicas. Diariamente, foi realizada a troca total de água dos aquários. O pH foi diminuído por injeção direta de CO₂ na água e mantido em $\pm 7,5$ (com variação de $\pm 0,3$ unidades) pelo aparelho Miliwaukee MC110. Durante esse período, os animais foram alimentados uma vez ao dia, com macroalgas da espécie *Ulva lactuca* e também, foi mantido o controle de salinidade da água.

Para os testes de fecundação e de desenvolvimento embrionário foram utilizados 14 indivíduos (de cada tratamento), dois de cada aquário, e para a avaliação do estresse oxidativo foram utilizados os indivíduos restantes, também um de cada aquário (totalizando 7 indivíduos para cada tratamento). Essa divisão e procedimento foram realizados tanto para o grupo controle quanto para o grupo exposto para evitar que a extração de gametas influenciasse na atividade enzimática.



Figura 6. Aquários de polietileno com capacidade de 20 L em que os adultos de *Echinometra lucunter* foram mantidos, com três indivíduos em cada aquário, totalizando 42 indivíduos para o bioensaio.

3.4.3 Coleta de órgãos e análises bioquímicas

Ao final dos quatro dias de experimento, 7 ouriços-do-mar (sem distinção de sexo), separados para as análises bioquímicas após o período de bioensaio, foram sacrificados de acordo com o proposto por Ross et al. (2008) e suas gônadas foram extraídas de acordo com as normas para anestesia e sedativo de animais aquáticos (Figura 7). Após extração as gônadas foram acondicionadas em microtubos e congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para realização das análises enzimáticas. Para a execução das análises bioquímicas, as gônadas dos animais foram descongeladas e homogeneizadas com tampão fosfato (pH 7,0) em gelo fundente, logo após foram centrifugadas (13000 RPM) por 30 min, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante do centrifugado foi utilizado nas análises enzimáticas e de proteínas totais.



Figura 7. Espécime de *Echinometra lucunter* seccionado ao meio para extração das gônadas.

3.4.4.1 Catalase ((CAT) E.C. 1.11.1.6)

A catalase foi estimada por meio da avaliação contínua do decréscimo da concentração do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em 240 nm a uma temperatura de 25 °C (Aebi, 1984). Para isso, foi utilizado um tampão para o meio de reação com peróxido de hidrogênio a 10 mM e tampão TE (Tris HCL 1 M e EDTA 5 mM), as amostras foram diluídas 10x no tampão TE. Para leitura, 10 μ L do homogeneizado foram adicionados a uma cubeta de quartzo contendo 990 μ L de tampão de reação, lidas em espectrofotômetro de absorção atômica (Biospectro SP -220). A atividade da CAT foi expressa como a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1 mmol de produto por minuto por miligrama de proteína. A atividade foi expressa como U/mg de proteína.

3.4.4.2 Glutathione S-Transferase ((GST) E.C. 2.5.1.18)

A atividade enzimática da GST foi determinada utilizando o tampão fosfato (pH 7,0), 1 mM de GSH e 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A atividade cinética da GST foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 340 nm, em um leitor de placa (Molecular Device – Spectra MAX 190) a uma temperatura de 25 °C. A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção do CDNB (Habig et al., 1974; Habig e Jakoby, 1981). A atividade da GST foi expressa como a quantidade da enzima que catalisa a

formação de 1 mmol de produto por minuto por miligrama de proteína. A atividade foi expressa como U/mg de proteína.

3.4.4.3 *Proteína Total*

A concentração de proteínas totais na gônada foi determinada pelo método de Bradford (1976) e as amostras foram lidas em um leitor de placa (Molecular Device – Spectra Max 190) ao comprimento de onda de 595 nm. A análise de proteína total se faz necessário para o cálculo final das atividades enzimáticas.

3.4.5 *Obtenção de gametas e teste de fertilização:*

Após a exposição dos exemplares adultos de *E. lucunter* ao pH de $7,5 \pm 0,3$ (T1) por 96 h, foram executados os protocolos para a obtenção de gametas, os testes de fecundação e desenvolvimento embrionário, utilizando apenas os 14 indivíduos, de cada tratamento, separados após o término do período do bioensaio para essas análises. Os testes foram feitos de acordo com o que foi realizado no experimento I.

3.5 *Análise estatística:*

A apresentação dos dados foi feita na forma de média \pm desvio padrão. Os resultados obtidos foram testados quanto a sua normalidade através do teste Shapiro-Wilk. Os resultados apresentaram distribuição não normal. Em seguida os dados foram logaritimizados e foi realizado um teste Modelo Linear Generalizado para os testes com gametas e embriões e um teste de Modelo Linear para as atividades enzimáticas no software R. Foram realizadas duas análises separadamente para os testes com gametas e embriões devido ao fato de terem sido realizadas duas coletas, ou seja, os experimentos foram realizados em dois dias diferentes.

4. RESULTADOS

4.1 Exposição de gametas e embriões:

4.1.1 Teste de toxicidade crônica com gametas (Teste de Fertilização):

A viabilidade dos gametas de *E. lucunter* foi significativamente reduzida nos tratamentos T4 (temperatura elevada: 28 °C) ($p < 0,05$) e T6 (pH reduzido: 7,5 e temperatura elevada: 28 °C) ($p < 0,05$). Os valores estão detalhados de acordo com a Figura 8 e 9 e Apêndice 1. O pH se conservou em 7,6 nos tubos de ensaio após o período de testes.

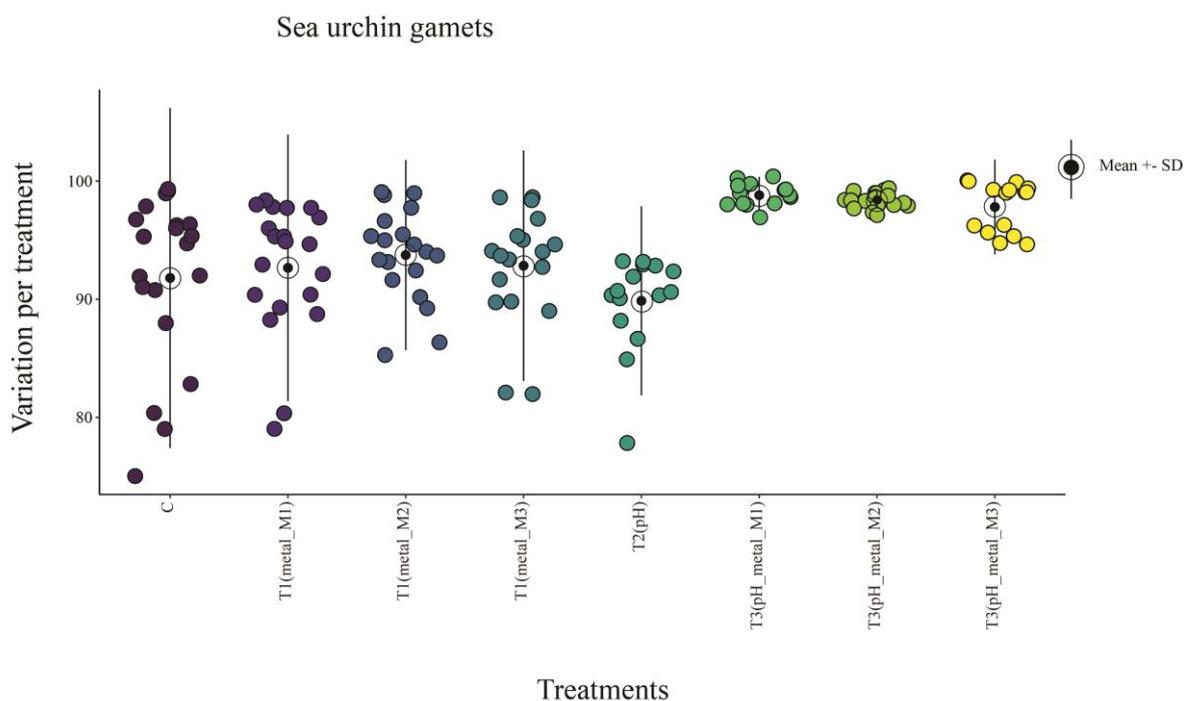


Figura 8. Taxa de Fecundação de Gametas de *Echinometra lucunter* expostos aos seguintes tratamentos: **Controle** (temperatura: 26 °C; pH: 8,2 e sem contaminação de chumbo), **T1** (temperatura: 26 °C; pH: 8,2 e contaminação de chumbo nas concentrações M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L), **T2** (temperatura: 26 °C e pH reduzido: 7,5), **T3** (temperatura: 26 °C; pH reduzido: 7,5 e contaminação de chumbo nas concentrações M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L), **T4** (temperatura elevada: 28 °C e pH: 8,2).

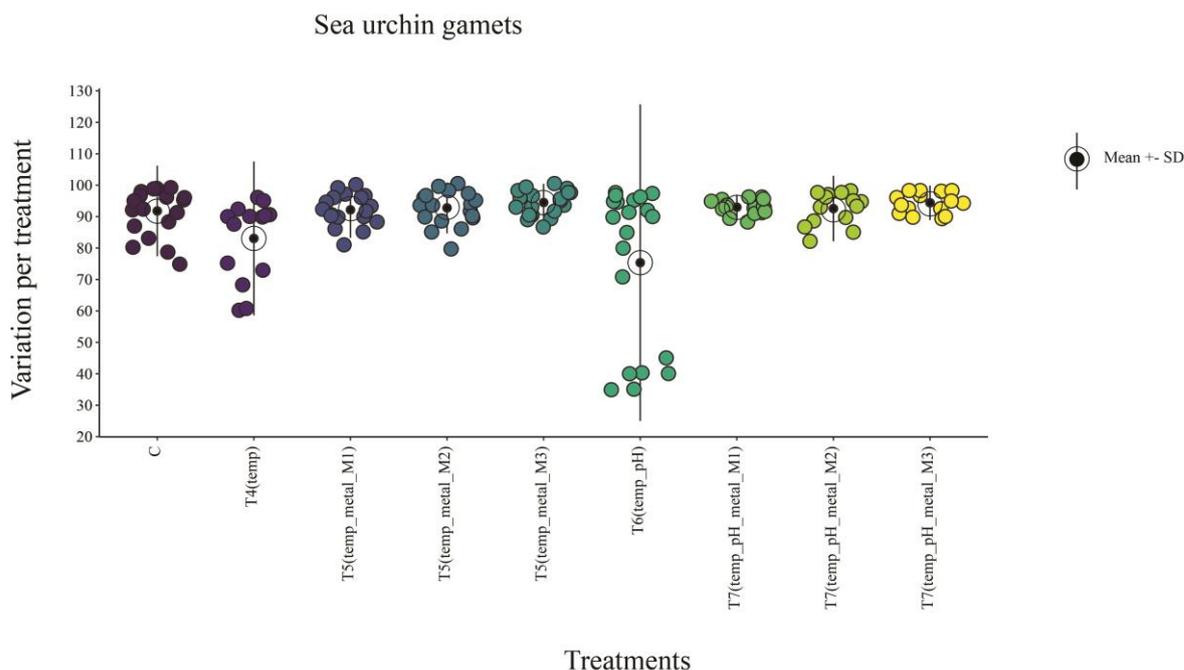


Figura 9. Taxa de Fecundação de Gametas de *Echinometra lucunter* expostos aos seguintes tratamentos: **Controle** (temperatura: 26 °C; pH: 8,2 e sem contaminação de chumbo), **T5** (temperatura elevada: 28 °C, pH: 8,2 e concentração de chumbo nas concentrações M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L) e **T6** (temperatura elevada: 28 °C e pH reduzido: 7,5) e **T7** (temperatura elevada: 28 °C; pH reduzido: 7,5 e contaminação de chumbo nas concentrações M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L). O valor de pCO₂ para o tratamento Controle é de 5±2 mg/L e para os tratamentos com pH reduzido é de 39±3 mg/L.

4.2 Teste de toxicidade crônica com embriões (*Larva pluteus*):

O desenvolvimento das larvas pluteus de *E. lucunter* foi significativamente afetado em quase todos os tratamentos em relação controle (C – o qual segue as normas da ABNT), exceto nos tratamentos: T1 nas concentrações M1 e M2 (125 e 250 µg/L de chumbo) ($p > 0,05$), T2 (pH reduzido: 7,5) ($p > 0,05$), T4 (temperatura elevada: 28 °C) ($p > 0,05$) e T5 na concentração M1 (125 µg/L de chumbo) ($p > 0,05$). Todos os outros tratamentos apresentaram viabilidade das larvas reduzida. Os detalhes estão descritos de acordo com Figura 10 e 11 e Apêndice 2. O pH se conservou em 7,6 nos tubos de ensaio após o período de testes.

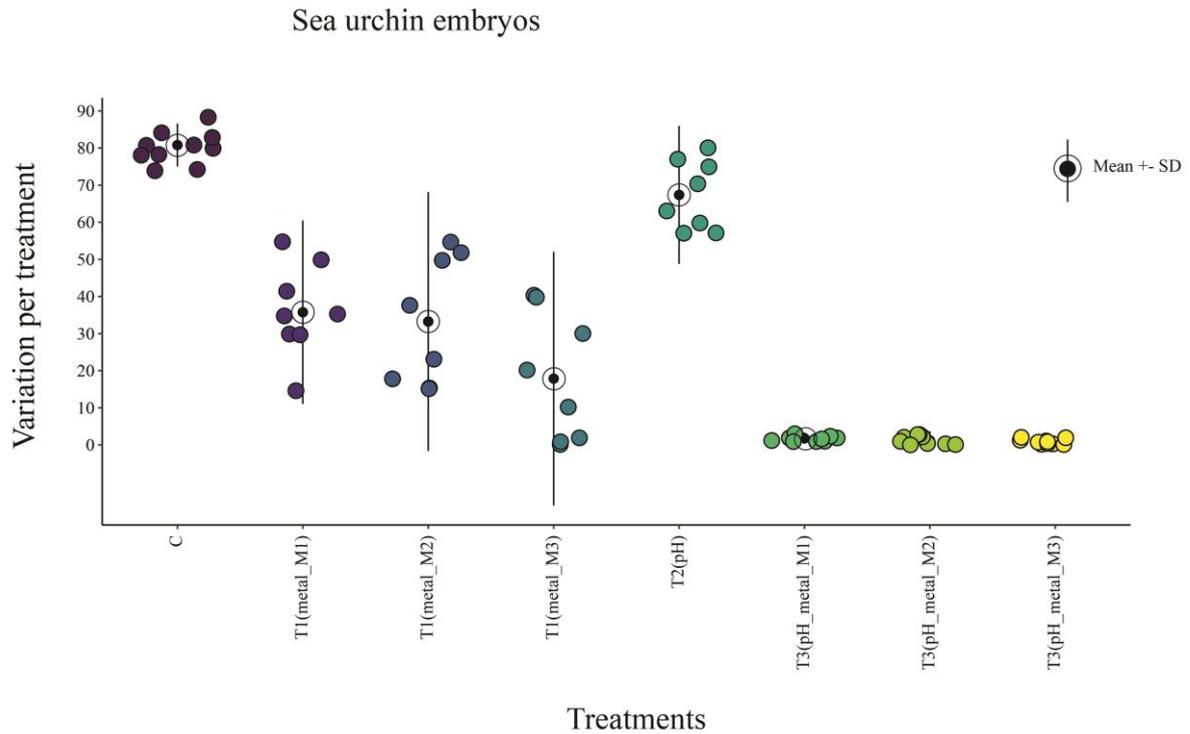


Figura 10. Taxa de Desenvolvimento de Embriões de *Echinometra lucunter* expostos aos seguintes tratamentos: **Controle** (temperatura: 26 °C; pH: 8,2 e sem contaminação de chumbo), **T1** (temperatura: 26 °C; pH: 8,2 e contaminação de chumbo nas concentrações M1: 125 µg/; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L), **T2** (temperatura: 26 °C e pH reduzido: 7,5), **T3** (temperatura: 26 °C; pH reduzido: 7,5 e contaminação de chumbo nas concentrações M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L).

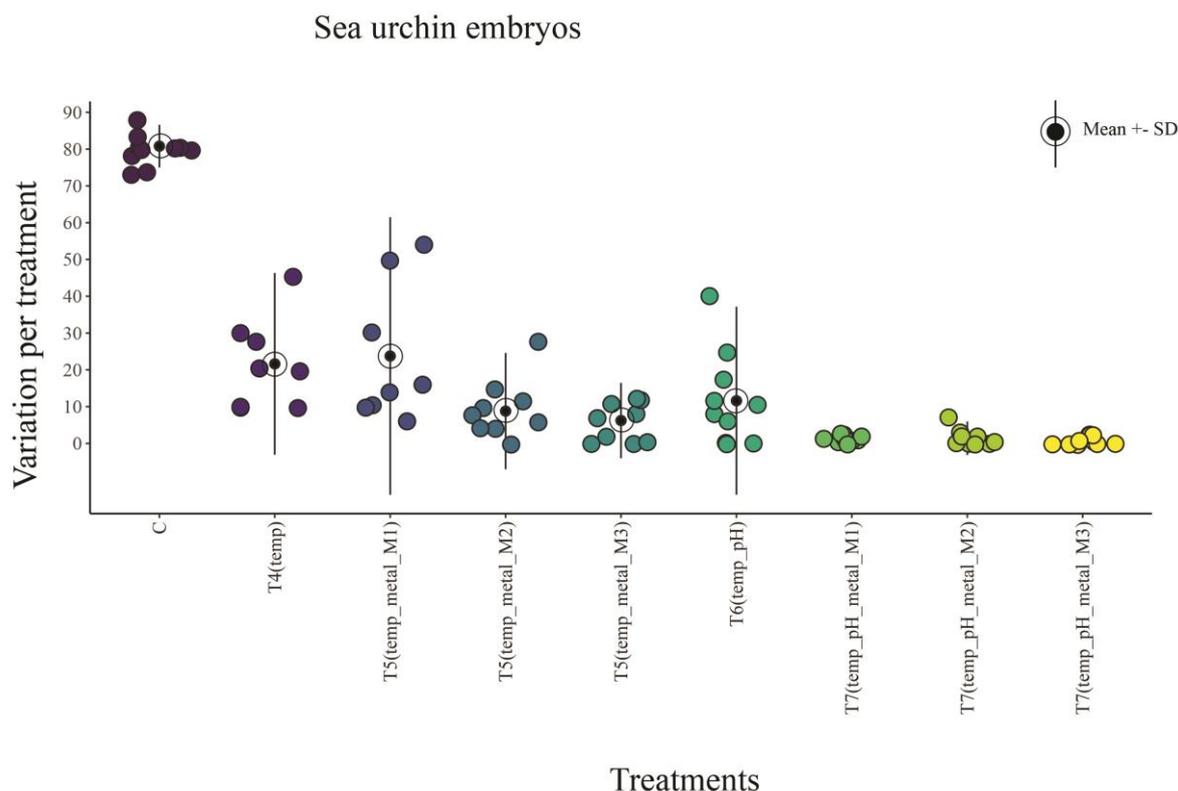


Figura 11. Taxa de Desenvolvimento de Embriões de *Echinometra lucunter* expostos aos seguintes tratamentos: **Controle** (temperatura: 26 °C; pH: 8,2 e sem contaminação de chumbo), **T4** (temperatura elevada: 28 °C e pH: 8,2), **T5** (temperatura elevada: 28 °C; pH: 8,2 e concentração de chumbo nas concentrações M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L) e **T6** (temperatura elevada: 28 °C e pH reduzido: 7,5) e **T7** (temperatura elevada: 28 °C; pH reduzido: 7,5 e contaminação de chumbo nas concentrações M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L). O valor de pCO₂ para o tratamento Controle é de 5±2 mg/L e para os tratamentos com pH reduzido é de 39±3 mg/L.

4.3 Exposição de adultos de *Echinometra lucunter* ao pH reduzido:

Durante as 96 horas do bioensaio com os indivíduos adultos de *E. lucunter* houve mortalidade de três dos exemplares, dois do tratamento controle e um do tratamento 1 (pH reduzido). Observou-se perda na função dos pés ambulacrais de todos os indivíduos expostos ao pH reduzido (7,5), o que fez com esses animais não conseguissem se fixar nos aquários como os indivíduos do grupo controle, indicando que estavam prejudicados em suas funções.

4.4 Taxa de fecundidade dos gametas e embrião dos indivíduos adultos de *Echinometra lucunter* expostos ao pH reduzido:

Com relação ao teste de fecundação dos gametas e desenvolvimento dos embriões não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Figura 12).

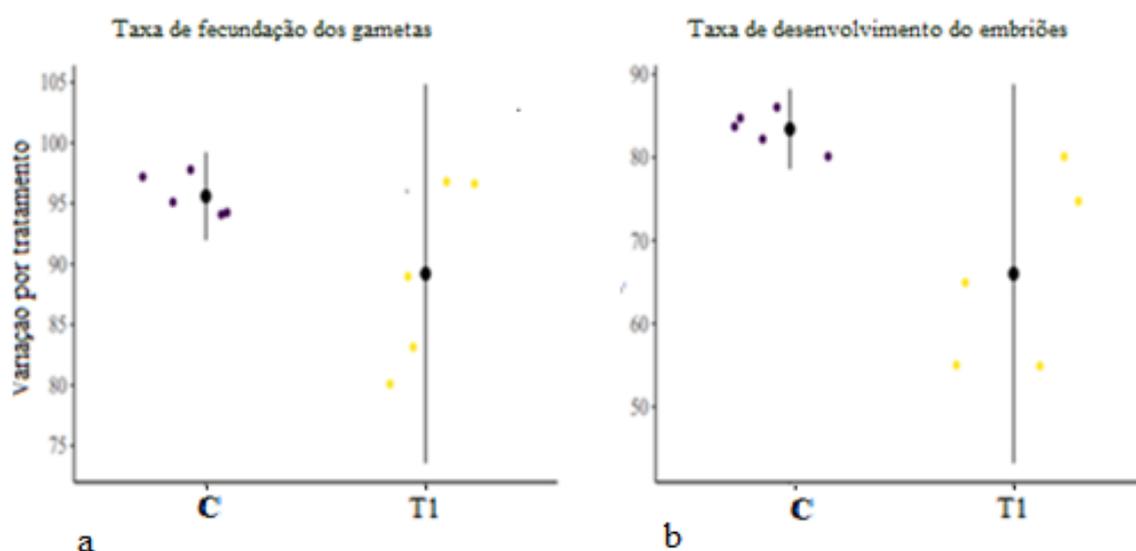


Figura 12. Taxa de fecundação de gametas (a) e Taxa de desenvolvimento de embriões (b) de adultos de *Echinometra lucunter* expostos à condição de pH reduzido: 7,5 (T1) e controle (C – pH: 8,2). Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). O valor de $p\text{CO}_2$ para o tratamento Controle é de 5 ± 2 mg/L e para os tratamentos com pH reduzido é de 39 ± 3 mg/L.

4.5 Avaliação do estresse oxidativo dos indivíduos adultos de *Echinometra lucunter* expostos ao pH reduzido:

4.5.1 Catalase (CAT) e Glutathione S- Transferase (GST)

A atividade enzima catalase (CAT) nas gônadas dos ouriços *E. lucunter* não apresentou diferença sua atividade para o tratamento com pH reduzido (T1 – pH: 7,5) em relação aos organismos do tratamento controle (pH: 8,2) ($p > 0,05$, R^2 : 0,1506) (Figura 13a). Os valores dos testes estatísticos estão detalhados de acordo com a Apêndice 3.

A atividade da enzima GST nas gônadas dos ouriços da espécie *E. lucunter* não apresentou diferença no tratamento com pH reduzido (T1) em relação aos organismos de tratamento controle (C) ($p > 0,05$, $R^2: 0,2363$), apesar de que em alguns adultos do tratamento 1 a atividade da enzima apresentou valores brutos aumentados em relação ao controle (Figura 13b). Os detalhes dos resultados do teste estatístico para atividade da GST estão expostos na Apêndice 4.

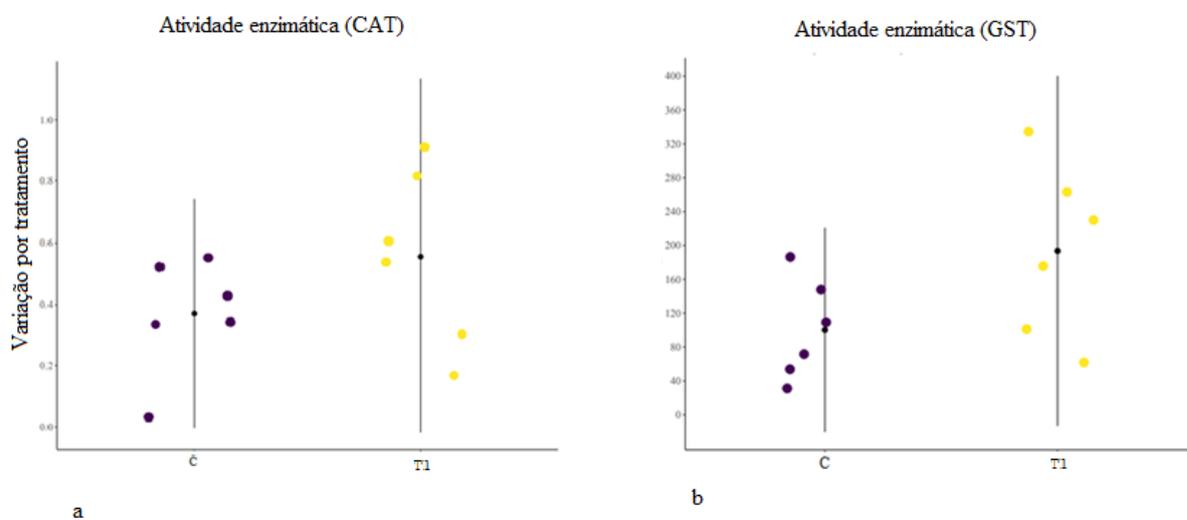


Figura 13. Atividade das enzimas catalase (CAT) (a) e glutiona S-transferase (GST) (b) em gônadas de *Echinometra lucunter* expostos ao pH reduzido (T1 – pH 7,5) e controle (C – pH: 8,2), não houve diferença significativa do grupo exposto em relação ao grupo C (controle) ($p > 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1 Teste de toxicidade crônica com gametas e embriões de *E. lucunter*:

O teste de desenvolvimento larval realizado no presente trabalho demonstrou ser mais sensível para esse organismo em relação ao teste de fecundidade dos gametas em *E. lucunter*. Nesse teste o desenvolvimento larval foi fortemente afetado pelas maiores concentrações de metal e pela temperatura quando encontradas isoladamente. E as taxas de desenvolvimento larval foram reduzidas nas combinações de pH reduzido (7,5) e metal, temperatura elevada (28 °C) e metal para todas as concentrações; para temperatura elevada e pH reduzido (7,5 e 28 °C); como também para a combinação de todos os fatores: pH reduzido, temperatura elevada e metal em todas as concentrações (7,5 e 28 °C e contaminação de metal: 125, 250 e 500 µg/L de Pb). Enquanto que no teste com gametas houve redução das taxas apenas para o tratamento com temperatura elevada (28 °C) e para o tratamento que combinou temperatura elevada e pH reduzido (7,5 e 28 °C). Ou seja, muito mais tratamentos foram afetados no teste com os embriões de *E. lucunter*. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos de contaminação com metais para outras espécies de ouriço-do-mar, tais como: *E. mathei* (Ringwood, 1992) e *Paracentrotus lividus* (Novelli et al., 2013), como também para o mexilhão *Mytilus trossulus* (Fitzpatrick, 2008). Na literatura existem diversos estudos que não utilizam o teste de fecundidade de gametas, utilizando apenas o teste de desenvolvimento embrionário para testar a toxicidade de metais em espécies de ouriços-do-mar (*E. mathei*, *Evechinus chloroticus*, *Paracentrotus lividus*) (Fernandez et al., 2000; Sadripour et al., 2013; Rouchon et al., 2016), assim como para testar a toxicidade de outros fatores como, por exemplo, o pH em ouriços-do-mar (*Lytechinus variegatus* e *Paracentrotus lividus*) (Passarelli et al., 2017) e em outros organismos marinhos (Parker et al., 2009). Os testes larvais são provavelmente mais sensíveis por conta do tempo de exposição a que são submetidos que é de 36 horas para espécie em contraposição aos 60 minutos do teste com gametas. Assim, é um teste que apresentou resultados mais consideráveis. Porém isso não desmerece este teste, já que, uma vez comprovado prejuízos na fecundação todo desenvolvimento será prejudicado. Por isso é importante a realização dos dois testes, para que haja uma compreensão mais completa dos impactos causados em todas as fases do

organismo. O uso de métodos integrados é importante para caracterização da qualidade ambiental (Baruarem et al., 2013). Uma análise integrativa permite uma maior compreensão das relações entre variáveis fornecendo um procedimento objetivo no sentido de melhorar decisões sobre a avaliação dos riscos ambientais (Cesar et al., 2014).

O tratamento contaminado com chumbo **T1** (temperatura: 26 °C; pH: 8,2 e contaminação do metal nas concentrações M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L) não apresentou resultados significativos de redução da fecundidade para o teste de gametas para nenhuma das concentrações de chumbo testadas, por outro lado a viabilidade dos embriões foi afetada significativamente no tratamento 1 na maior concentração de chumbo (T1 M3: 500 µg/L). Isso se deve, provavelmente, ao fato descrito acima de que o teste com gametas tem um menor tempo de exposição (apenas 60 minutos), se comparado ao teste com embriões que tem a duração de 36 horas para a espécie *E. lucunter*. Assim, o contaminante tem maior tempo de contato com as células podendo causar maiores prejuízos à medida que o tempo de exposição aumenta. Novelli e colaboradores (2013) relataram resultado semelhante em seu estudo para exposição ao Pb^{2+} , Cr^{3+} e Cd^{2+} , em que o aumento das concentrações desses metais causaram, principalmente, malformações larvais, prejudicando assim a taxa de desenvolvimento larval em *Paracentrotus lividus*. Nossas observações correspondem também às de Radenac e colaboradores (2001) que encontraram uma alta porcentagem de larvas pluteus malformadas na concentração de 250 µg/L de chumbo. Muitos pesquisadores relataram que anomalias podem ser induzidas por alguns metais (Kobayshi e Okamura, 2004). Assim, uma vez que o chumbo compete com a fixação do cálcio (Pagano et al. 1982; Pounds et al., 1982), esse metal pode exercer uma toxicidade específica na diferenciação da carapaça calcária da espécie de ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Warnau e Pagano 1994) o que provavelmente pode ter ocorrido para espécie em questão.

No tratamento com pH reduzido (T2 – pH: 7,5; pCO_2 : 39±3 mg/L), quando este foi um fator isolado, o resultado não foi significativo em nenhum dos testes. O pH é um fator que demanda uma análise cautelosa, uma vez que apresenta relatos de resultados antagônicos na literatura. Existem alguns estudos que demonstram a inibição da fertilização e do desenvolvimento embrionário de organismos com a

diminuição do pH (Havenhand et al., 2008; Pagano et al., 2017). Por outro lado, em outras pesquisas o pH quando utilizado isoladamente tem um impacto muito pequeno nas taxas de fertilização, sendo a concentração do esperma um fator muito mais importante no sucesso da mesma (Byrne, 2010a; Kapsberg et al., 2017). Byrne e colaboradores (2010a) estudaram a relação da temperatura, pH e densidade de esperma em ouriços-do-mar da espécie *H. erythrogramma* e descobriram que quando este fator (pH 7,6) se encontrava isolado não houve redução da fertilização até mesmo em baixas densidades do líquido espermático. Clark e colaboradores (2009), compararam os efeitos do pH reduzido em três espécies de ouriços-do-mar de regiões diferentes: região polar, temperada e tropical. Os autores relataram que não houve prejuízo à morfologia e com relação à sobrevivência, a diminuição do pH acarretou a sua diminuição apenas para valores de pH abaixo de 7. Da mesma forma, outros estudos sobre mudanças climáticas e aumento do pH na água do mar em que houve diminuição do pH através da manipulação de CO₂, demonstram que a fertilização de espécies de ouriços-do-mar é resistente a uma ampla faixa de pH com prejuízos apenas em níveis extremos (Kobayshi et al., 1973; Carr et al., 2006). Assim, aparentemente, os níveis de pH do oceano previstos para 2100 de acordo com as previsões do IPCC, que é de valores de pH de 7,1 a 7,4, não terão, de forma isolada, um efeito direto sobre a sobrevivência das larvas do mar nas espécies de ouriços examinadas para esses dois estudos acima.

Esses resultados contrastantes podem ser a consequência de diferentes condições experimentais (concentração de esperma, estabilidade do pH, e etc.). Entretanto, a maioria dos autores atualmente concorda que a fertilização em ouriços marinhos é resistente à acidificação dos oceanos futura (Dupont, 2010). Em seu estudo, Dupont e colaboradores (2010) confirmaram a resistência das larvas de equinodermos mesmo com o pH reduzido e afetando a velocidade de desenvolvimento dos embriões. Por isso, esses autores chamam a atenção para o fato de que essas mudanças não parecem ter um impacto direto na taxa de sobrevivência durante esses experimentos, no entanto, em condições naturais, uma mudança na velocidade de desenvolvimento poderá ter outras consequências indiretas sobre a sobrevivência dessa espécie. Obviamente, as faixas de tolerância ao pH apresentam grande variação a depender de cada espécie de ouriços-do-mar.

Assim, estudos posteriores com maior aprofundamento na faixa de pH resistente de *E. lucunter* são necessários para esclarecer essa lacuna.

O tratamento que combinou pH e metal (T3: pH: 7,5; pCO₂: 39±3 mg/L e contaminação de chumbo nas concentrações: M1:125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L) também apresentou prejuízos apenas para o desenvolvimento dos embriões para todas as concentrações testadas desse metal. É sabido que a resposta da biota aquática em relação aos metais é pH-dependente. Em situação de pH baixo o chumbo pode ser mais tóxico ou mais disponível para absorção dos organismos, devido às mudanças na especiação induzidas pela diminuição desse fator (Campbel e Strokes, 1985). Possivelmente, devido a essa mudança na disponibilidade de metal houve um prejuízo ainda maior do que quando o contaminante se encontrava isolado no tratamento 1. Estudos demonstram que organismos que vivem em águas acidificadas tendem a apresentar maiores níveis de metais em seus tecidos (Sphear et al., 1978; Spry et al., 1991), sendo essa combinação de fatores preocupante diante dos cenários futuros, devido às mudanças climáticas e à contaminação dos diversos corpos hídricos.

Apenas a taxa de fertilização dos gametas se apresentou afetada no tratamento com a temperatura elevada (T4 - 28° C). É bem consolidado na literatura de que a temperatura é um dos fatores mais importantes no controle da reprodução em organismos marinhos, já que afeta uma grande variedade de fenômenos biológicos, desde o metabolismo, reações bioquímicas e a distribuição geográfica dos organismos (Orton et al., 1920; Fushisawa et al., 1989; O'connor et al., 2007), por isso tem sido foco de muitos estudos no ecossistema marinho (Pepin et al., 1991; Byrne et al., 2009; 2010a; Hardy et al., 2014). Em geral, a desova dos equinodermos é espécie-específica e depende da termotolerância dos embriões, sendo que essa característica é herdada pela parte materna (Fujisawa et al., 1995). Desta maneira a temperatura atua controlando desde a taxa de fertilização e assim a reprodução como um todo. Portanto, o aquecimento dos oceanos será, possivelmente, um dos mais relevantes estressores ante ao cenário de mudanças climáticas (Byrne et al., 2009).

Em algumas espécies de ouriços-do-mar é reportado em estudos que altas temperaturas prejudicam o desenvolvimento nos estágios iniciais da embriogênese,

afetando tanto as taxas de fertilização, quanto de desenvolvimento larval (Roller e Stickle, 1993; Byrne et al., 2009). Para *E. lucunter*, Sewell e Young (1998) relataram que a fertilização e o desenvolvimento de estágios iniciais podem ocorrer na faixa de 12 a 37 °C e apresenta temperatura ótima de 27 a 34 °C. Esses trabalhos contrariam em partes os nossos resultados, já que a taxa de fertilização foi afetada pelo aumento da temperatura. Outros estudos (Amy, 1983; Cameron et al., 1986) também apresentaram taxas de desenvolvimento larval robustas a altas temperaturas, o que corrobora com os resultados do presente estudo em relação à taxa desenvolvimento larval de *E. lucunter*. As taxas de fertilização foram afetadas provavelmente por serem as fases mais sensíveis do desenvolvimento do indivíduo, estando mais vulnerável às mudanças ambientais, como no estudo de Pepin (1991), em que as taxas de desenvolvimento dos ovos foram mais sensíveis às variações de temperatura do que a taxa de desenvolvimento larval. Isso sugere que, provavelmente, a taxa de desenvolvimento de embriões é menos sensível ao aumento da temperatura em si. A termotolerância dos embriões é uma herança materna e as temperaturas ótimas diferem de acordo com a temperatura da água durante o período de desova de cada espécie (Fujisawa, 1995). Tal redução na taxa de fertilização do presente estudo é crítica, uma vez que os níveis estabelecidos nesse experimento (+2 °C) estão dentro do intervalo esperado de temperaturas médias globais no próximo século de acordo com o IPCC. Os resultados desse estudo sugerem que fatores abióticos do ambiente local podem modular a gametogênese e trazer consequências ao ciclo reprodutivo e podendo afetar toda a população de *E. lucunter*.

A combinação de temperatura e chumbo no T5 (28 °C e contaminação do metal nas concentrações: M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L) prejudicou o desenvolvimento larval para as duas maiores concentrações de metal. Os metais como fator isolado, já haviam sido reconhecidos pelo próprio teste e para outros estudos de serem danosos para estágios iniciais de desenvolvimento de ouriços-dormar (Dinnel et al., 1989; Fernandez e Beiras, 2000; Hardy et al., 2014). Assim, era esperado que a combinação de metal e outro fator também haveria prejuízos para viabilidade dos embriões, pelo menos para as maiores concentrações. A maioria dos estudos apresenta o estudo dos efeitos de metais e temperatura isoladamente ou combinado a outros fatores (Dinnel et al., 1989; Fujisawa, 1995; Larrain et al., 1999;

Kobayshi e Okamura, 2004; Hardy et al., 2014) o que dificulta a comparação dos nossos resultados. Os resultados desse trabalho sugerem que possivelmente os danos causados nesse tratamento foram principalmente devido à presença do metal e que a presença deste fragilizou as células e o prejuízo ao desenvolvimento foi ainda maior com a combinação dos dois fatores. Como também foi observado no tratamento T3 (pH: 7,5; pCO₂: 39±3 mg/L e contaminação de chumbo nas concentrações: M1: 125 µg/L; M2: 250 µg/L e M3: 500 µg/L) em que o pH como fator isolado não apresentou prejuízo, mas a combinação de mais um fator afetou negativamente o desenvolvimento dos embriões.

Como já dito acima a diminuição do pH na água do mar e o aumento da temperatura como fator isolado podem não apresentar maiores efeitos para biota (Byrne et al., 2010a; Kapsenberg et al., 2017). Porém, no ambiente natural existe uma série de elementos que atuam conjuntamente podendo causar efeitos significativos que não foram previstos quando estes foram estudados isoladamente. Por isso é cada vez mais importante a realização de estudos multifatoriais. Existem poucos estudos, principalmente com equinodermos, que relatam a ação conjunta do pH e temperatura. No entanto, existem evidências de que esses dois fatores quando combinados podem causar danos ao desenvolvimento dessas espécies, o que pode acarretar consequências em todo ecossistema. Parker (2009) estudou o efeito da temperatura combinado ao aumento de pCO₂ (indiretamente pH reduzido) em ostras em que a junção desses fatores provocou efeito negativo no desenvolvimento dos organismos, eles observaram que a medida que o pCO₂ aumentava (375 a 1000 ppm) os efeitos eram maiores, principalmente se combinados ao aumento da temperatura. Outro estudo semelhante avaliou o crescimento pós-larval de *S. Balanoides*, espécie de crustáceo sésil, e os autores encontraram que o conteúdo das conchas não foi afetado pela diminuição de pH (aumento de CO₂ na água) quando foi avaliado isoladamente, mas diminuiu significativamente quando isso ocorreu em conjunto com um aumento de temperatura (Findlay et al., 2010). No presente estudo já era esperado que no tratamento T6 (temperatura elevada: 28 °C e pH reduzido: 7,5) haveria diminuição significativa pelo menos da fertilização de gametas visto que já havia sido detectado um prejuízo com a temperatura como fator isolado no tratamento T4 (temperatura elevada: 28°C). Então, quando se observou que no tratamento T6 houve um dano tanto para a fertilização quanto para o

desenvolvimento larval, podemos inferir que este dano foi causado devido a combinação dos dois fatores, como citado nos estudos acima. Quando o pH atua sozinho, a célula consegue superar este fator estressante, porém, provavelmente, como já se encontrava fragilizada pelo estresse da temperatura essa célula não conseguiu superar esse fator e essa combinação se tornou danosa. Isso também foi observado no tratamento T3 (pH: 7,5 e contaminação por metal) e T5 (temperatura: 28°C e contaminação por metal) para o teste do desenvolvimento larval, já que a combinação de pH reduzido ou temperatura e metais foram ainda mais prejudiciais ao desenvolvimento dos embriões.

Dupont e colaboradores (2010) hipotetizaram que o principal efeito de CO₂ visível no nível de organismo larval seria a redução da velocidade de desenvolvimento, causado por restrições de energia. Stump e colaboradores (2011) avaliaram o crescimento larval sob condições de baixo pH e puderam confirmar essa hipótese. Nesse estudo o nível de 4 braços na larva pluteus foi alcançado em 100% das larvas após 2 dias no tratamento controle e apenas após 3 dias no tratamento com pH reduzido (alto pCO₂). Sabendo também que a temperatura é bem conhecida por causar variação no desenvolvimento e duração das larvas de diversas espécies devido aos motivos supracitados (Byrne et al., 2009) apesar de não ter prejudicado nesse trabalho, temos dois fatores que, conjuntamente apresentam potencial para gerar efeitos significativos quando combinados.

Da mesma forma, também era esperado um maior dano no tratamento com a combinação de todos os fatores (T7 - pH reduzido: 7,5; temperatura elevada: 28 °C e contaminação de metal) à medida que a concentração de chumbo aumentasse. Como dito acima, quando o pH, temperatura ou metal atuam sozinhos, a célula pode conseguir suportar estes fatores estressantes, porém quando esses fatores foram combinados houve os maiores danos de todos os tratamentos. Os metais já se demonstraram nocivos nos testes dos embriões, uma vez que competem por sítios ativos de outras substâncias necessárias ao seu desenvolvimento (Warnau e Pagano 1994). Assim, os três fatores combinados trouxeram prejuízos relacionados a todos os fatores citados acima.

O presente estudo foi pioneiro em relacionar fatos do presente (poluição por metais) com cenários futuros a cerca dos fatores estressantes que irão se

intensificar com o fenômeno de aquecimento global (pH/pCO₂ e temperatura). A poluição por metal é uma grande preocupação presente no Espírito Santo em consequência do episódio do rompimento da barragem da Samarco. Esse evento ocasionou um derramamento na faixa de milhões de m³ de lama com rejeitos de sua atividade mineradora contaminada por inúmeros metais, incluindo o chumbo, no ecossistema do Rio Doce. Esse acidente foi o maior desastre ambiental da história do Brasil que agravou ainda mais a situação de poluição em que a costa do Espírito Santo já está submetida, uma vez que antes do acidente o chumbo já era encontrado em grandes quantidades na baía de Vitória, capital do Espírito Santo (Medeiros et al., 2016). É importante ressaltar que o resultado desse estudo serve de alerta visto que a situação de maior dano foi o tratamento que combinou todos os fatores, podendo causar um enorme impacto na reprodução dessa espécie e com potencial para desencadear uma série de reações em todo ecossistema marinho futuro.

5.2 Taxa de fecundidade dos gametas e embrião dos indivíduos adultos de Echinometra lucunter expostos ao pH:

Os organismos adultos tendem a ser menos sensíveis que os estágios iniciais de desenvolvimento dos organismos (Magalhães et al., 2008). Por isso, provavelmente, os resultados desse teste foram semelhantes aos do teste com gametas e embriões, ou seja, não houve resultados significativos para os testes de fecundidade e de desenvolvimento embrio-larval com adultos expostos ao pH reduzido. Esses resultados foram similares aos obtidos na primeira série de experimentos, com exposição direta dos gametas e embriões a essa condição. Esse resultado pode ter ocorrido pelos mesmos fatores pelos quais não houve resultados para as fases mais sensíveis, pois uma vez que os gametas e embriões foram capazes de superar esse efeito estressor é provável que os adultos também fossem capazes.

Dupont e colaboradores (2010), encontraram resultado semelhante, em que os organismos adultos se demonstraram robustos aos efeitos da diminuição do pH. Essa concordância dos resultados obtidos quando há exposição direta (gametas e embriões) e com a indireta (adultos) de ouriço-do-mar a um determinado agente tóxico, também foi observado por Pereira (2017), a qual realizou um teste similar

submetendo adultos de *E. lucunter*, por 96 horas, à concentração 2,5 % da FSD (fração solúvel de óleo diesel). O resultado foi semelhante para ambos os testes havendo diminuição significativa nas taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário, sendo que para o teste com adultos a intensidade foi um pouco menor. No entanto, o FSD atua de uma forma diferente do pH, causando a degeneração das células germinativas, atrofia do tecido gonadal e reações inflamatórias em gônadas de invertebrados marinhos (Ortiz-Zarragoitia e Cajaraville, 2006). Apesar do foco desse estudo ser os estágios iniciais de desenvolvimento, o estudo dos adultos conjuntamente é importante, visto que nos dá informações mais confiáveis já que analisa o ciclo de vida de uma forma mais completa, e por isso foram analisadas também atividades enzimáticas para entendermos o metabolismo dos indivíduos adultos.

5.3 Avaliação do estresse oxidativo:

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica, como por exemplo, contato com substâncias tóxicas causando uma situação de estresse para aos organismos. Esses radicais livres são denominados EROs (espécies reativas de oxigênio) e apesar de produzidos naturalmente, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais. A detoxificação das espécies reativas de oxigênio tornou-se um pré-requisito para a vida aeróbica, o que proporcionou o desenvolvimento de muitas defesas orgânicas a partir da evolução a fim de prevenir, interceptar e reparar os danos no organismo (Storey, 1996).

Normalmente, o estresse oxidativo ocorre quando as defesas antioxidantes são sobrecarregadas por espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas nos tecidos dos organismos. A catalase (CAT) é uma enzima antioxidante, que tem importante atuação na prevenção do dano oxidativo mediado pelo ROS (Soldatov et al., 2007), sendo que sua mais importante função é eliminar de H_2O_2 nas células. Já a glutathione-S-transferase (GST), é uma enzima detoxificante de fase II que catalisa a conjugação da glutathione com lipofílicos compostos, mas também desempenha um

papel importante na proteção contra o estresse oxidativo (Manduzio et al., 2005). Uma ampla gama de estudos foi realizada em que a susceptibilidade de diferentes tecidos de organismos marinhos à peroxidação lipídica causada por poluentes é avaliada como uma indicação de qualidade ambiental. Em tais estudos, as maiores concentrações de produtos de peroxidação lipídica estão correlacionadas com a atividade de sistemas antioxidantes clássicos, como as enzimas CAT e GST (Almeida et al., 2004). No entanto as respostas são muito diversas uma vez que a atividade enzimática varia muito de acordo com a espécie e com o tecido analisado. Assim, podemos observar relatos na literatura de três possíveis resultados: em que as enzimas aumentam sua atividade frente a um estressor xenobiótico (Arslan et al., 2014; Priya et al., 2016), diminuem sua atividade sendo inibidas (Qu, 2013; Wang, 2016) ou não tem sua atividade alterada (Almeida et al., 2004; Wang et al., 2016).

O baixo pH é conhecido por afetar a atividade enzimática (Hochachka e Somero, 2002), porém não houve alteração da atividade enzimática da CAT e GST diante da diminuição do pH no presente trabalho sugerindo que *E. lucunter* consegue manter sua homeostase redox em níveis de pH reduzido. Pereira (2017) realizou teste semelhante com indivíduos adultos expondo-os por 96 horas a fração solúvel do óleo diesel, porém encontrou resultado opostos aos resultados do presente trabalho. As atividades das enzimas GST e CAT foram afetadas significativamente, sendo que estas foram inibidas quando expostas a esse contaminante. O teste com adultos oferece uma condição de menor vulnerabilidade para a ação da toxicidade dos fatores nos organismos, por isso é importante incluir esse teste, apesar de não ter havido resultado significativo, pois ele oferece uma maior compreensão já que engloba outra fase de vida do organismo oferecendo uma visão mais completa dos efeitos tóxicos para o ciclo de vida de uma espécie.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo sugere que as mudanças previstas na elevação da temperatura e a acidificação, juntamente com a poluição de metais do oceano ao longo do próximo século podem ter um impacto significativo nas taxas de fecundidade e de desenvolvimento embrio-larval de *E. lucunter*, bem como possíveis implicações para a reprodução e abundância dessa espécie e, possivelmente, de outros invertebrados marinhos. Podemos também observar que o teste de desenvolvimento embrionário se demonstrou mais sensível em relação ao teste de fecundação dos gametas.

Apesar de já termos evidências suficientes para concluir que no futuro próximo os equinodermos terão um impacto negativo com consequências claras em nível de ecossistema, precisamos de experimentos realistas, multifatoriais e a longo prazo de outros organismos e que abranja todos os aspectos do ciclo de vida e as complexas interações entre as espécies no sentido de chegar cada vez mais próximo do que realmente ocorre no ambiente. O que vai resultar, à medida que os estudos avançarem, em uma maior compreensão e posterior identificação de quais espécies são mais resistentes e quais estão mais vulneráveis para tomada de decisões de manejo e conservação.

REFERÊNCIAS

Adams, S. M.; Shepard, K. L.; Greeley Jr, M. S.; Jimenez, B. D.; Ryon, M. G.; Shugart, L. R.; Mccarthy, J. F., 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research*, 28, 459-464.

Adams, S. M.; Greeley, M. S., 2000. Ecotoxicological Indicators of Water Quality : Using Assess the Health of Aquatic Ecosystems. *Water, Air, and Soil Pollution*, 123, 103-115.

Aebi, H., 1974. Catalase. In: Bergmayer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, 671-684.

Aebi, H., 1984. Catalase in Vitro. *Methods Enzymology*, 105, 121-126.

Almeida, E. A.; Miyamoto, S.; Bainy, A. C. D.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P., 2004. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Marine Pollution Bulletin*, 49, 386-392.

Amy, R.L., 1983. Gamete sizes and developmental time tables of five tropical sea urchins. *Bulletin of Marine Science*, 33, 173-176.

Arslan, Ö. Ç.; Parlak, H.; Boyacioglu, M.; Karaslan, M. A.; Katalay, S., 2014. Changes in the glutathione-S-transferase activity of the mussel *Mytilus galloprovincialis* during exposure to bisphenol-a. *Fresenius Environmental Bulletin*, 23, 10, 2525-2530.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15.350: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-dormar (Echinodermata: Echinoidea), 2012. Rio de Janeiro: ABNT, p. 21.

Atchison, G. J.; Henry, M. G.; Sandheinrich, M. B., 1987. Effects of metals on fish behavior: a review. *Environmental Biology of Fishes*, 18, 10, 11-25.

Azevedo, F. A.; Chasin, A. A. M., 2003. O estudo da toxicologia. São Carlos: Inter Tox, 1-25.

Baruarem, L. M., Castro, I. B., Hortellani, M. A., Taniguchi, S., Fillman, G., Sasaki, S. T., Petti, M. A. V., Sarkis, J. E. S., Bicego, M. C., Maranhão, L. A., Davanzo, M. B., Nonato, E. F., Cesar, A., Lotufo, L. V. C., Abessa, D. M. S., 2013. Integrated quality assessment of sediments from harbor areas in Santos-São Vicente Estuarine, System. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 130, 179-189.

Bianchini, A. 2016. Ministério Do Meio Ambiente. Instituto Chico Mendes De Conservação Da Biodiversidade – ICMBio. Avaliação do impacto da lama / pluma Samarco sobre os ambientes costeiros e marinhos (ES e BA) com ênfase nas Unidades de Conservação 1. Brasília.

Borgmann, U.; Norwood, W. P., 1995. Kinetics of excess background copper and zinc in *Hyalella azteca* and their relationship to chronic toxicity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52, 864-874.

Brendler-Schwaab, S.; Hartmann, A.; Pfuhler, S.; Speit, G., 2005. The in vivo comet assay: Use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 20,4, 245-254.

Brewer, P. G.; Barry, J., 2008. The other CO₂ problem. *Scientific American Earth*, 18, 22-23.

Brothers, C. J.; Harianto, J.; McClintock, J. B.; Byrne, M., 2016. Sea urchins in a high-CO₂ world: the influence of acclimation on the immune response to ocean warming and acidification. *Proceedings of the Royal Society B*, 283, 1-10.

Byrne, M.; Ho, M.; Selvakumaraswamy, P.; Nguyen, H. D.; Dworjanyn, S. A.; Davis, A. R., 2009 Temperature, but not pH, compromises sea urchin fertilization and early development under near-future climate change scenarios. *Proceedings of Royal Society B*, 276, 1883-1888.

Byrne, M., Soars, N., Selvakumaraswamy, P.; Dworjanin, S. A.; Davis, D., A., 2010a. Sea urchin fertilization in a warm, acidified and high pCO₂ ocean across a range of sperm densities. *Marine Environmental Research*, 69, 234-239.

Byrne, M.; Soars, N. A.; Ho, M. A.; Wong, E.; McElroy, D.; Selvakumaraswamy, P.; Dworjanyn, S. A.; Davis, A. R., 2010b. Fertilization in a

suite of coastal marine invertebrates from SE Australia is robust to near-future ocean warming and acidification. *Marine Biology* 157, 2061-2069.

Byrne, M., 2011. Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages: Vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 49, 1-42.

Caldeira, K.; Wickett, M. E., 2003. Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425, 25, 365.

Cameron, R. A., 1986. Reproduction, larval occurrence and recruitment in Caribbean sea urchins. *Bulletin of Marine Science*, 39, 332-346.

Campbell, P. G. C.; Stokes, P. M., 1985. Acidification and Toxicity of Metals to Aquatic Biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42, 12, 2034-2049.

Canadell, J. G.; Le Quéré, C.; Raupacha, M. R.; Fielde, C. B.; Buitenhuis, E. T.; Ciais, P.; Conway, T. J.; Gillett, N. P.; Houghton, R. A.; Marland, G., 2007. Contributions to accelerating atmospheric CO₂ growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 47, 18866-18870.

Capitani, E. M.; Paoliello, M. M. B.; Almeida, G. R. C., 2009. Fontes de exposição humana exposição ao chumbo no Brasil. *Simpósio Medicina (Ribeirão Preto)*, 42, 16, 311–318.

Carr, R. S.; Biedenbach, J. M.; Nipper, M., 2006. Influence of potentially confounding factors on sea urchin porewater toxicity tests. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51, 573-579.

Cesar, A.; Lia, L. R. B.; Pereira, C. D. S.; Santos, A. R.; Cortez, F. S.; Choueri, R. B.; De Orte, M. R.; Rachid, B. R. F., 2014. Environmental assessment of dredged sediment in the major Latin American seaport (Santos, São Paulo, Brazil): an integrated approach. *Science of the Total Environment*, 497-687.

- Clark, D.; Lamare, M.; Barker, M., 2009. Response of sea urchin pluteus larvae (Echinodermata: Echinoidea) to reduced seawater pH: a comparison among a tropical, temperate, and a polar species, *Marine Biology*, 156, 1125-1137.
- Cline, W. R., 1991. Scientific basis for the greenhouse effect. *The Economic Journal*, 101, 904-919.
- Connolly, J. P., 1985. Predicting single-species toxicity in natural water systems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 4, 4, 573-582.
- Dinnel, P. A.; Link, J. M.; Stober, Q. J.; Letouneau, M. W.; Roberts, W. E., 1989. Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 755, 748-755.
- Doney, S. C.; Fabry, V. J.; Feely, R. A. ; Kleypas, J. A., 2009. Ocean Acidification: The Other CO₂ Problem. *Annual Review of Marine Science*, 1, 169–192.
- Dupont, O. S.; Thorndyke, M. O. M., 2010. Impact of near-future ocean acidification on echinoderms. *Ecotoxicology*, 19, 449-462.
- Etiégni, L.; Campbell, A. G., 1991. Physical and chemical characteristics of wood ash. *Bioresource Technology*, 37, 2, 173-178.
- Farombi, E. O.; Adelowo, O. A.; Ajimoko, Y. R., 2007. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African catfish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *International Journal of Public Health*, 4, 158-165.
- Fernandez, N.; Beiras, R., 2001. 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.
- Findlay, H. S.; Kendall, M. A.; Spicer, J. I.; Widdicombe, S., 2010. Post-larval development of two intertidal barnacles at elevated CO₂ and temperature, *Marine Biology*, 157, 725-735.

Fitzpatrick, J. L.; Nadella, S.; Bucking, C.; Balshine, S.; Wood, C. M., 2008. The relative sensitivity of sperm, eggs and embryos to copper in the blue mussel (*Mytilus trossulus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 47, 441-449.

Frankignoulle, M.; Borges, A. V., 2001. Direct and indirect pCO₂ measurements in a wide range of pCO₂ and salinity values (the scheldt estuary). *Aquatic Geochemistry*, 7, 267-273.

Fujisawa, H., 1989. Differences in temperature dependence of early development of sea urchins with different growing seasons. *Biological Bulletin*, 176, 2, 96-102.

Fujisawa, H., 1995. Variation in embryonic temperature sensitivity among groups of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*, which differ in their habitats. *Zoological Science*, 12, 583-589.

Georgopoulos, P. G.; Roy, A.; Opiekun, R. E.; Yonone-Lioyand, M. J.; Lioy, P. J. 2002. Introduction: copper and man. *Environmental Dynamics and Human Exposure to Copper*. In: Georgopoulos PG, Roy A, Opiekun RE, Yonone-Lioyand MJ, Lioy PJ (Eds.). International Copper Association Ltd, New York, 15–26.

GILBERT, S. F. 1995. *Biologia do Desenvolvimento*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 578.

Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B., 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249, 22, 7130-7139.

Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferase. *Methods of Enzymology*, 77, 398-405.

Hardy, N. A.; Lamare, M.; Uthicke, S.; Wolfe, K.; Doo, S.; Dworjanyn, S.; Byrne, M., 2014. Thermal tolerance of early development in tropical and temperate sea urchins: inferences for the tropicalization of eastern Australia. *Marine biology*, 161, 395-409.

Havenhand, J. N.; Buttler, F. R.; Michael C. Thorndyke, M. C.; Williamson, J. E., 2008. Near-future levels of ocean acidification reduce fertilization success in a sea urchin. *Current Biology*, 18, 15, 651-652.

He, Z. L.; Yang, X. E.; Stoffella, P. J., 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19, 125-140.

Hochachka, P. W.; Somero, G. N., 2002. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford University Press, Oxford, 446.

Hollows, C.F.; Johnston, E.L.; Marshall, D.J., 2007. Copper reduces fertilization success and exacerbates Allee effects in the field. *Marine Pollution Bulletin*, 333, 51-60.

Hook, S. E.; Gallagher, E. P.; Batley, G. E., 2016. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health sharon. *Integrated Environment Assessment and Management*, 116, 8, 1477-1490.

Hughes, L., 2000. Biological consequences of global warming: is the signal already. *Tree*, 15, 2, 56-61.

IPCC, 2013a: Annex II: Climate System Scenario Tables [Prather, M., G. Flato, P. Friedlingstein, C. Jones, J.-F. Lamarque, H. Liao and P. Rasch (eds.)]. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

IPCC, 2013b: Rhein, M.; Rintoul, S. R.; Aoki, S.; Campos, E.; Chambers, D.; Feely, R. A.; Gulev, S.; Johnson, G. C.; Josey, S. A.; Kostianoy, A.; Mauritzen, C.; Roemmich, D.; Talley, L. D.; Wang, F.: Observations: Ocean. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Javed, M. Ahmadb, I.; Usmania, N.; Ahmad, M., 2016. Bioaccumulation, oxidative stress and genotoxicity in fish (*Channa punctatus*) exposed to a thermal power plant effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 127, 163-169.

Johnson, R. K; Wiederholm, T.; Rosenberg, D. M., 1993. Freshwater Biomonitoring Using Individual Organisms, Populations, and Species Assemblages of Benthic Macroinvertebrates. *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. Rosenberg, D.M.& Resh, V.H. eds., p. 40-182, New York: Chapman & Hall.

Kaya, H.; Mart, O.; Hisar, O.; Mart, O.; Yilmaz, S.; Mart, O.; Mart, O., 2016. The effects of elevated carbon dioxide and temperature levels on tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Respiratory enzymes, blood pH and hematological parameters. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 44, 114–119.

Kapsenberg, L.; Okamoto, D. K.; Dutton, J. M.; Hofmann, G. E., 2017. Sensitivity of sea urchin fertilization to pH varies across a natural pH mosaic. *Ecology and Evolution*, 1-14.

Keeler, A. G.; Mclemore, D., 1996. The value of incorporating bioindicators in economic approaches to water pollution control. *Ecological Economics*, 19, 3, 237-245.

Kobayashi, N., 1971. Fertilized sea urchin eggs as an indicatory material for marine pollution bioassay, preliminary experiments. *Publications of the setor Marine Biological Laboratory*, 18, 6, 379-406.

Kobayashi, N., 1973. Studies on the effects of some agents on fertilized sea urchin eggs, as a part of the bases for marine pollution bioassay I. *Publications of the setor marine biological laboratory*, 21, 2, 109-114.

Kobayashi, N., 1977. Preliminary experiments with sea urchin pluteus and metamorphosis in marine pollution bioassay. *Publication of the Setor Marine Biology Laboratory*, 9-21.

Kobayashi, N.; Okamura, H., 2004. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development . *Tracing the cause by the effects*, 55, 1403-1412.

Landrigan, P. J.; Todd, A. C., 1994. Lead Poisoning, *The Western Journal of Medicine*, 161, 2, 153-159.

Landrigan, P. J., 1989. Toxicity of lead at low dose. *British Journal of Industrial Medicine*, 46, 593-596.

Larrain, A.; Riveros, A. ; Silva, J.; Bay-Schmith, E., 2009. Toxicity of metals and pesticides using the sperm cell bioassay with the sea urchin *Arbacia spatuligera*. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 62, 749-757.

Lawrance, J. M., 1975. On the relationship between marine plants and sea urchins. *Oceanography and Marine Biology*, 13, 213-286.

Lima, E. J. B.; Gomes, P. B.; Souza, J. R. B., 2009. Reproductive biology of *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) in a northeast Brazilian sandstone reef. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81, 1, 51-59.

Lüthi, D., 2008. High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000-800,000 years before present. *Nature*, 453, 7193, 379-382.

Magalhães D. P.; Ferrão Filho, A. S. A., 2008. ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos, *Oecologia Brasiliensis*, 12, 3, 355-381.

Malik, N.; Biswas, A.K.; Qureshi, T.A.; Borana, K.; Virha, R., 2010. Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bhopal. *Environmental Monitoring and Assessment*, 160, 267-276.

Manduzio, H.; Rocher, B.; Durand, F.; Galap, C.; Leboulenger, F., 2005. The point about oxidative stress in mollusks, *Invertebrate Survival Journal*, 2, 91-104.

Mariante, F. L. F.; Lemos, G. B.; Eutrópio, F. J.; Gomes, L. C., 2009. Biologia reprodutiva de *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) na Praia da Costa, Vila Velha, Espírito Santo, *Zoologia*, 26, 4, 641-646.

Mccarty, L. S.; Munkittrick, K. R. 1996. Environmental biomarkers in aquatic toxicology: Fiction, fantasy or functional? *Human and Ecological Risk Assessment*, 2, 2, 269-274.

McPherson, B. F., 1965. Studies on the biology of the tropical sea urchins, *Echinometra lucunter* and *Echinometra viridis*, Bulletin of Marine Science, 19, 1, 195-213 .

Nascimento, C. R. B.; Martinez, C. B. R., 2016. Daily intake of lead in Wistar rats at different ages: Biochemical, genotoxic and physiological effects. Environmental Toxicology and Pharmacology, 41, 132–141.

Novelli, A. A.; Losso, C.; Ghetti, P. F.; Ghirardini, A. M., 2003. Toxicity of heavy metals using sperm cell and embryo toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea): comparisons with exposure concentrations in the lagoon of Venice, Italy. Environmental Toxicology Chemistry, 22, 1295 -1301.

Nriagu, J. O., 1996. A History of Global Metal Pollution. Science, 272 (5259), 223.

O'Connor, M. I.; Bruno, J. F.; Gaines, S. D.; Halpern, B. S.; Lester, S. E.; Kinlan, B. P.; Weiss, J. M., 2007. Temperature control of larval dispersal and the implications for marine ecology, evolution and conservation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104, 4, 1266-1271.

Oliveira, B. L.; Fernandes, L. F. L.; Bianchini, A.; Chippari-Gomes, A. R.; Silva, B. F.; Brandão, G. P.; Gomes, L. C., 2014. Acute copper toxicity in juvenile fat snook *Centropomus parallelus* (Teleostei: Centropomidae) in sea water. Neotropical Ichthyology, 12, 4, 845-852.

Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M., 2006. Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 50, 361-369.

Orton, J. H., 1920. Sea-temperature, breeding and distribution in marine animals. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 12, 339-366.

Pagano, G.; Guida, M.; Trifuoggi, M.; Thomas, P., 2017. Sea Urchin bioassays in toxicity testing: I. Inorganics, organics, complex mixtures and natural products. Expert Opinion on Environmental Biology, 6, 1-10.

- Parker, L. M.; Ross, P. M.; O'Connor, W. A., 2009. The effect of ocean acidification and temperature on the fertilization and embryonic development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850). *Global Change Biology*, 15, 2123-2136.
- Passarelli, M. C.; Cesar, A.; Riba, I.; Delvalls, T., 2017. A Comparative evaluation of sea-urchin larval stage sensitivity to ocean acidification. *Chemosphere*, 184, 224-234.
- Pepin, P., 1991. Effect of temperature and size on development, mortality and survival rates of the pelagic early life history stages of marine fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 48, 583-518.
- Pereira, M. T., 2017. Efeitos da fração solúvel do óleo diesel (FSD) na reprodução de ouriço-do-mar (*Echinomentra lucunter*). Dissertação de Mestrado, Universidade de Vila Velha, Vila Velha, Fev. 2017.
- Pounds, J. G.; Wright, R.; Morrison, D.; Casciano, D. A., 1982. Effect of lead on calcium homeostasis in the isolated rat hepatocyte, *Toxicology Application in Pharmacology*, 63, 389-401.
- Priya, R. J.; Muthusamy, A.; Maruthupandy, M.; Beevi, A. H., 2016. Biomarker response of ocean acidification induced hypercapnia on marine bivalve *Donax cuneatus*, Linnaeus 1758, *Journal of Aquaculture and Marine Biology*, 4, 2, 1-8.
- Primost, M.; Sabatini, S. E.; Salvatore, P.; Rios De Molinam, C.; Bigatti, G., 2017. Oxidative stress indicators in populations of the gastropod *Buccinanops globulosus* affected by imposex. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 97, 1, 35-42.
- Qu, R.; Feng, M.; Wang, X.; Qin, L.; Wang, C.; Wang, Z.; Wang, L., 2014. Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values. *Aquatic Toxicology*, 150, 9-16.

Radenac, G.; Fichet, D.; Miramand, P., 2001. Bioaccumulation and toxicity of four dissolved metals in *Paracentrotus lividus* sea-urchin embryo. *Marine Environmental Research*, 51, 151-166.

Resgalla Jr., C; Laitano, K. S., 2002. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Notas Técnicas Facimar*, 6, 153-163.

Ringwood, A. H., 1992. Comparative sensitivity of gametes and early developmental stages of a sea urchin species (*Echinometra mathaei*) and a bivalve species (*Isognomon californicum*) during metal exposures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 22, 288-295.

Rodríguez-Romero, A.; Basallote, M. D.; De Orte M. R; Delvalls, B T. A.; Blasco, I. R. J., 2014. Simulation of CO₂ leakages during injection and storage in sub-seabed geological formations: Metal mobilization and biota effects. *Environment International*, 68, 105-117.

Roller, R. A.; Stickle, W. B., 1993. Effects of temperature and salinity acclimation of adults on larval survival, physiology, and early development of *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Marine Biology* 116, 583-591.

Rouchon, A. M. Phillips, N. E., Rouchon, A. M., Phillips, N. E., 2016 Acute toxicity of copper, lead, zinc and their mixtures on the sea urchin *Evechinus chloroticus*, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 1-23.

Sadripour, E.; Mortazavi, M. S.; Mahdavi Shahri, N., 2013. Effects of mercury on embryonic development and larval growth of the sea urchin *Echinometra mathaei* from the Persian Gulf. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12, 4, 898-907.

Sewell, M. A.; Young, C. M., 1999. Temperature limits to fertilization and early development in the tropical sea urchin *Echinometra lucunter*, 236, 291-305.

Singh, N.; McCoy, M.; Tice, R.; Schneider, E. L., 1988. A simple technique for quantitation damage in individual of low levels of DNA cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.

- Singh, N. P., 2016. The comet assay: Reflections on its development and evolution. *Reviews in Mutation Research*, 767, 23-30.
- Soares, J. B.; Resgalla Jr. C., 2016. Echinodermata in ecotoxicological tests: maintenance and sensitivity. *Brazilian Journal of Oceanography*, 64, 1, 29-36.
- Socolow, R.; Andrews, C.; Berkhout, F.; Thomas, V., 1994. *Industrial Ecology and Global Change*. Cambridge University Press.
- Soldatov, A. A.; Gostyukhina, O. L.; Golovina, I., 2007. Antioxidant enzyme complex of tissues of the bivalve *Mytilus galloprovincialis* Lam. under normal and oxidative-stress conditions: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43, 556-562.
- Song, Y. P.; Suquet, M.; Quéau, I.; Lebrun, L., 2009. Setting of a procedure for experimental fertilization of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes, *Aquaculture*, 287, 311-314.
- Sprague, J. B., 1969. Measurement of pollutant toxicity to fish: bioassay methods for acute toxicity. *Fisheries Research*, 3, 793-821.
- Spehar, R. L.; Anderson, R. L.; Fiandt, J. T., 1978; Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in aquatic invertebrates, *Environmental Pollution*, 15, 196-208.
- Spry, D. J.; Wiener, J. G., 1991. Metal bioavailability and toxicity to fish in low-alkaline lakes: a critical review, *Environmental Pollution*, 71, 243–304.
- Storey, K. B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29, 1715-1733.
- Stumpp, M.; Wren, J.; Melzner, F.; Thorndyke, M. C.; Dupont, S. T., 2011. CO₂ induced seawater acidification impacts sea urchin larval development I: Elevated metabolic rates decrease scope for growth and induce developmental delay, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 160, 331-340.
- Sugni, M., Mozzi, D., Barbaglio, A., Bonasoro, F., Carnevali, M.D.C., 2007. Endocrine disrupting compounds and echinoderms: new ecotoxicological sentinels for the marine ecosystem. *Ecotoxicology* 16, 95-108.

Torres, M. C. L.; Soares, N. D. F.; Maia, J. F., 2004. Parâmetros cinéticos da glutationa S-transferase e sua ativação por extratos de vegetais. *Ciência, Tecnologia e Alimentação*, 24, 2, 243-248.

Wang, Z.; Wang, Y.; Yan, C., 2016a. Simulating ocean acidification and CO₂ leakages from carbon capture and storage to assess the effects of pH reduction on cladoceran *Moina mongolica* Daday and its progeny, *Chemosphere*, 155, 621–629.

Wang, Q.; Cao, R.; Ning, X.; You, L.; Mu, C.; Wang, C.; Wei, L.; Cong, M.; Wu, H.; Zhao, J. 2016b. effects of ocean acidification on immune responses of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology*, 49, 24-33.

Warnau, M.; Pagano, G., 1994. Developmental Toxicity of PbCl₂ in the Echinoid *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). *Bullettin of Environmental Contamination and Toxicology*, 53, 434-141.

APÊNDICE

Apêndice 1. Resumo das análises estatísticas (Resíduos e Coeficientes) e realizadas no teste de fecundação dos gametas de *Echinometra lucunter*.

Fórmula: `glm(formula = datalog ~ treat, family = "quasipoisson", data = datalog)`

Desvio Residual:

Min	1Q	Media	3Q	Max
-0.34108	-0.00720	0.00281	0.01640	0.15612

Coeficientes:

	Estimativa	Erro Padrão	Valor de t	Pr(> t)
(Intercept)	1.510150	0.006196	243.712	< 2e-16 ***
treatT1(metal_M1)	0.002281	0.008758	0.260	0.7947
treatT1(metal_M2)	0.005028	0.008866	0.567	0.5712
treatT1(metal_M3)	0.002820	0.008997	0.313	0.7542
treatT2(pH)	-0.004200	0.009477	-0.443	0.6580
treatT3(pH_metal_M1)	0.016589	0.009421	1.761	0.0795
treatT3(pH_metal_M2)	0.015719	0.009423	1.668	0.0965
treatT3(pH_metal_M3)	0.014362	0.009427	1.524	0.1288
treatT4(temp)	-0.023863	0.009530	-2.504	0.0129 *
treatT5(temp_metal_M1)	0.001297	0.009000	0.144	0.8856
treatT5(temp_metal_M2)	0.002778	0.008997	0.309	0.7578
treatT5(temp_metal_M3)	0.006879	0.008748	0.786	0.4324
treatT6(temp_pH)	-0.058879	0.008895	-6.619	2.1e-10 ***
treatT7(temp_pH_metal_M1)	0.003456	0.009456	0.365	0.7151
treatT7(temp_pH_metal_M2)	0.002171	0.009650	0.225	0.8222
treatT7(temp_pH_metal_M3)	0.006665	0.009447	0.706	0.4811

Códigos significativos: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Parâmetro de dispersão da família quasipoisson considerado como sendo 0.003476684

Desvio nulo: 1.31348 em 27 graus de liberdade

Desvio residual: 0.91106 em 25 graus de liberdade

AIC: NA

Número de interações Fisher Scoring: 3

Apêndice 2. Resumo das análises estatísticas realizadas no teste de desenvolvimento do embrião de *Echinometra lucunter*.

Fórmula: glm(formula = data ~ treat, family = "quasipoisson", data = datalog)

Desvio Desvidual:

Min	1Q	Media	3Q	Max
-2.12693	-0.35517	0.03197	0.35624	1.54380

Coeficientes:

	Estimativa	Erro Padrão	Valor de p	Pr(> p)
(Intercept)	1.48245	0.15069	9.838	< 2e-16 ***
treatT1(metal_M1)	-0.21636	0.24073	-0.899	0.368769
treatT1(metal_M2)	-0.25652	0.24371	1.053	0.292536
treatT1(metal_M3)	-0.66624	0.27923	2.386	0.017034 *
treatT2(pH)	-0.04335	0.22880	0.189	0.849723
treatT3(pH_metal_M1)	-1.48851	0.35116	4.239	2.25e 05 ***
treatT3(pH_metal_M2)	-1.93562	0.42431	-4.562	5.07e-06 ***
treatT3(pH_metal_M3)	-2.18166	0.47320	-4.610	4.02e-06 ***
treatT4(temp)	-0.38749	0.25402	-1.525	0.127158
treatT5(temp_metal_M1)	-0.39827	0.25491	-1.562	0.118197
treatT5(temp_metal_M2)	-0.79518	0.28034	-2.836	0.004561 **
treatT5(temp_metal_M3)	-1.05230	0.30818	-3.415	0.000639 ***
treatT6(temp_pH)	-0.85113	0.27549	-3.089	0.002005 **
treatT7(temp_pH_metal_M1)	-1.93562	0.42431	-4.562	5.07e-06 *
treatT7(temp_pH_metal_M2)	-2.05109	0.44641	-4.595	4.34e-06 *
treatT7(temp_pH_metal_M3)	-2.40150	0.52287	-4.593	4.37e-06 ***

Códigos significativos: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Parâmetro de dispersão da família quasipoisson considerado como sendo 1

Desvio Nulo: 219.019 em 145 graus de liberdade

Desvio residual: 77.34 em 130 graus de liberdade

AIC: Inf

Número de interações Fisher Scoring: 5

Apêndice 3. Valores dos testes estatísticos da atividade enzimática da Catalase (CAT) em gônadas de *Echinometra lucunter* expostos ao pH reduzido (T - 7,5) em relação ao grupo controle (pH: 8,2).

Fórmula: $\text{lm}(\text{formula} = \text{var} \sim \text{treat}, \text{data} = \text{data})$

Resíduos:

Min	1Q	Media	3Q	Max
-0.39031	-0.08840	0.01292	0.16005	0.7971

Coeficientes:

	Estimativa	Erro Padrão	Valor de p	Pr(> p)
(Intercept)	0.3697	0.0990	3.734	0.00389 **
Tratamento T	0.1865	0.1400	1.332	0.21251

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Erro residual padrão: 0.2425 em 10 graus de liberdade

Múltiplo R^2 : 0.1506, R^2 ajustado: 0.06569

F-estatístico: 1.773 em 1 e 10 DF, valor de p: 0.2125

Apêndice 4. Valores dos testes estatísticos da atividade enzimática da Glutaciona S-transferase (GST) em gônadas de *Echinometra lucunter* expostos ao pH reduzido (T - 7,5) em relação ao grupo controle (pH: 8,2).

Fórmula: $\text{lm}(\text{formula} = \text{datalog} \sim \text{treat}, \text{data} = \text{datalog})$

Resíduos:

Min	1Q	Media	3Q	Max
-1.0328	-0.4696	0.1563	0.4794	0.7971

Coeficientes:

	Estimativa	Error Padrão	Valor de p	Pr(> p)
(Intercept)	4.4426	0.2717	16.350	1.52e-08 ***
Tratamento T	0.6759	0.3843	1.759	0.109

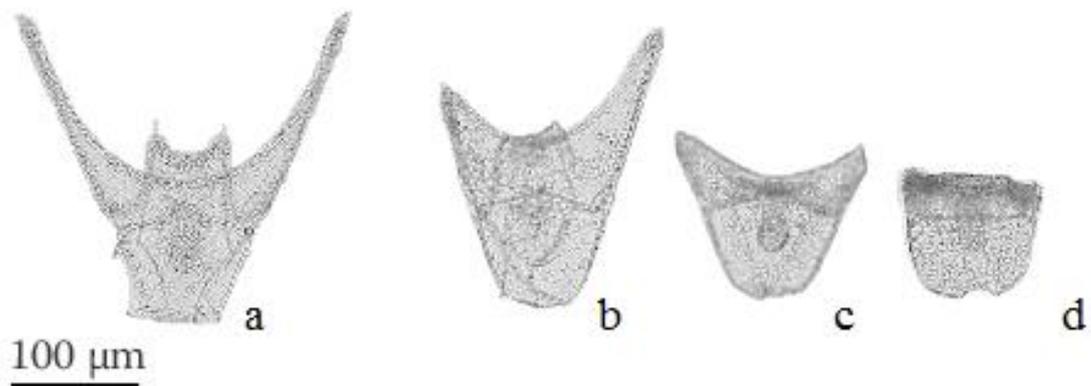
Códigos significativos: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Erro padrão residual: 0.6656 em 10 graus de liberdade

Múltiplo R^2 : 0.2363, R^2 ajustado: 0.1599

F-estatístico: 3.093 em 1 e 10 DF, valor de p: 0.1091

ANEXOS



Anexo 1. Larva plúteos de ouriço-do-mar com corpo bem caracterizado em formato triangular e braços desenvolvidos (a). Larva plúteos em desenvolvimento incompleto (b, c e d) (Fonte: Byrne 2011).

