

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS LAMAS DE CAL SOBRE O OURIÇO-DO-MAR
PARACENTROTUS LIVIDUS (LAMARCK, 1816). PERSPETIVAS PARA NOVAS
APLICAÇÕES DESTES RESÍDUOS INDUSTRIAIS**

Nuno Gaspar², João Gago^{1,2}, Tiago Repolho² & Orlando Luís²

¹Instituto Politécnico de Santarém, Escola Superior Agrária¹, Departamento de Tecnologia Alimentar, Biotecnologia e Nutrição

² Centro de Oceanografia, Laboratório Marítimo da Guia

RESUMO

Através da utilização do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* como bioindicador, neste estudo avaliou-se a potencialidade de utilização de um resíduo das indústrias do papel, as lamas de cal, em duas vertentes. A primeira consistia em aproveitar a característica alcalina das lamas de cal como reductiva da crescente acidificação dos oceanos. Nos bioensaios realizados obteve-se um aumento significativo na percentagem de malformações das larvas pluteus de *P. lividus* que foram cultivadas em águas com concentrações superiores a 0,1 mg/L de lamas de cal, o que coloca em causa esta primeira potencialidade. A segunda baseava-se no elevado teor em cálcio presente nas lamas de cal que desta forma poderiam servir como matéria-prima deste macronutriente em rações para adultos *P. lividus*. Após 6 meses de cultivo em que os ouriços-do-mar foram alimentados com 4 rações diferentes que diferiam na concentração de lamas de cal utilizadas, os resultados obtidos para as variáveis biométricas analisadas, para o índice gonadossomático, para a concentração de Ca, Hg, Pb e Cd nas gónadas e parede do corpo, e para os ensaios ecotoxicológicos, parecem viabilizar esta segunda potencialidade.

Palavras-chave: Lamas de cal, ouriços-do-mar, *Paracentrotus lividus*, cálcio, metais pesados, ecotoxicologia.

ABSTRACT

Through the use of the sea urchin *Paracentrotus lividus* as bioindicator, this study evaluated the potential to use the waste of paper mills, lime sludge, on two perspectives. The first was to take advantage of the lime sludge alkaline character as a deterrent of increasing ocean acidification. In bioassay testing, a significant increase in the percentage of plutei larvae malformations was obtained when they were cultured at lime sludge concentrations above 0.1 mg/L. This result undermines this first perspective. The second relied on the lime sludge high calcium concentration which could thereby serve as raw material for *P. lividus* feeds. After 6 months of captive period in which adult sea urchins were fed 4 diets that differed in lime sludge addition, the results obtained for the biometric variables analyzed, for the GSI, for the concentration of Ca, Hg, Pb and Cd in the gonads and in the body wall, and for larvae ecotoxicological testing, appear to support this second potential.

Keywords: Lime sludge, sea urchins, *Paracentrotus lividus*, calcium, heavy metals, ecotoxicology

INTRODUÇÃO

As lamas de cal são um resíduo que se obtém do processo de fabricação de pasta para papel. É um resíduo sólido de cor cinzenta, homogêneo e sem um odor específico. As lamas obtidas das fábricas de celulose, são produzidas como um subproduto no ato de fabricação de pasta e o seu destino final pode ser uma problemática ambiental (1, 2, 3). Neste momento as lamas de cal têm tido uma aplicação prática na estabilização de solos, sendo estes resíduos industriais utilizados, um pouco por todo o globo, como fertilizante e corretivo do pH dos solos (4). Estes resíduos também podem ser utilizados na regulação do pH de lamas provenientes do tratamento de águas residuais, onde a cal também desempenha um papel fundamental na correção da imobilização de metais pesados, tornando-se num composto apropriado para a sua deposição em solos agrícolas (5). Igualmente há referência (6) à utilização destes resíduos na regulação da acidez de tanques de cultura piscícola. Em termos nacionais o destino amíúde utilizado é a sua incorporação como-matéria-prima no processo de

fabricação de cimento. Contudo o decréscimo recente da atividade de construção civil tem limitado esta opção.

Neste trabalho, e dado que as lamas de cal têm um pH elevado e são fonte de cálcio, pensou-se avaliar a sua potencialidade de utilização em duas vertentes:

Primeiro, dado que a contínua queima de combustíveis fósseis tem levado à acumulação de dióxido de carbono na atmosfera e nas águas do mar, provocando entre outros fenómenos, a acidificação das águas do mar (7, 8), que constitui um fator de stresse adicional aos seres vivos (9, 10, 11), concretamente na obtenção de carbonato de cálcio para a constituição dos seus exosqueletos (12, 13), pensou-se adicionar lamas de cal à água do mar para tentar contrariar este efeito da acidificação, e paralelamente funcionar como fonte adicional de cálcio nas águas.

Segundo, sendo o cálcio um macronutriente necessário aos seres vivos e normalmente adicionado a alimentos compostos para animais, avaliou-se a possibilidade de adicionar lamas de cal a rações secas como fonte de cálcio.

Para avaliar estas potencialidades tem que se analisar previamente possíveis riscos biológicos inerentes a estas utilizações. Foi escolhido o ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Echinoidea) como bioindicador, pretendendo-se neste trabalho avaliar os efeitos destas possíveis aplicações, através da análise de alguns parâmetros biológicos nesta espécie, como o índice gonadossomático, variáveis biométricas e a acumulação de metais nos tecidos dos ouriços-do-mar adultos, e também ao nível da ecotoxicologia das suas larvas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção e caracterização das lamas de cal

As lamas de cal utilizadas neste trabalho são provenientes da empresa “Celulose Beira Industrial (CELBI) S.A.”, Leirosa, Figueira da Foz. Estas lamas de cal são um resíduo obtido da reação de caustificação dos chamados licores verdes, durante o processo de recuperação de químicos usados no cozimento da madeira. Apesar do nome comumente utilizado, lamas de cal, este resíduo apresenta-se seco e sob a forma de pó fino sendo normalmente armazenado em silo. Nas análises químicas efetuadas a estas lamas de cal secas que nos foram fornecidas pela CELBI, não foi detetada quer a presença de poluentes inorgânicos (metais pesados) quer de orgânicos

(hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, hidrocarbonetos BTEX e bifenis policlorados). A substância química mais abundante, após 30% a 43% de perda ao rubro (gravimetria térmica a 1000° C), é o óxido de cálcio (CaO), com 45% a 65% do peso. O pH das lamas de cal determinado nestas análises foi de 10,0.

Toxicidade direta das lamas de cal através do cultivo larvar

Em julho de 2012, altura do ano em que os ouriços-do-mar se encontram maduros e fazem posturas (13), foram capturados no Cabo Raso (Figura 1) dez ouriços para se proceder a um ensaio toxicológico de acordo com a metodologia proposta por Beiras & Álvarez (15) e por Bellas (16). O Cabo Raso é uma zona livre de poluição e com uma população abundante de ouriços-do-mar, dois critérios para a escolha deste local. Após recolha, os ouriços foram transportados dentro de baldes com água do mar para o Laboratório Marítimo da Guia, que dista cerca de 4 Km do Cabo Raso, onde se procedeu à sua disseção para obtenção dos seus gâmetas. Avaliou-se de imediato ao microscópio (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Gottingen, Germany) a qualidade dos gâmetas (ovócitos redondos e sem núcleo central e espermatozóides móveis). De forma a minimizar variabilidade genética escolheram-se as melhores posturas de apenas um macho e uma fêmea. Os óvulos foram colocados em proveta de vidro de 100 ml com água do mar filtrada (0,35 µm) e esterilizada por ultravioletas (U.V.). A este volume adicionaram-se 5 µl de esperma não diluído, agitando suavemente com uma vareta durante 2 min para garantir a fertilização. De seguida passou-se à determinação da percentagem de fertilização e da densidade dos ovos através da contagem à lupa (Stemi 2000-C, Carl Zeiss, Gottingen, Germany), com ampliação de 50x, de cinco amostras de 50 µl. 30 minutos após fertilização, adicionou-se o volume correspondente a 350 ovos fertilizados em tubos de ensaio de 250 ml com tampas de rosca de teflon, onde previamente se adicionaram 100 ml das soluções teste. Foram analisadas 6 concentrações diferentes de lamas de cal: solução de controlo (0 mg/L) e concentrações de 0,1 mg/L; 0,25 mg/L; 0,50 mg/L; 0,75 mg/L; 1 mg/L, cada uma com 5 replicados. Para obtenção destas soluções as lamas de cal foram primeiramente dissolvidas em volumes de 5L com agitação auxiliada por misturador vertical (varinha mágica). Foi medido o pH destas soluções através de sonda. Os tubos de vidro foram colocados em banho termostatizado (banho maria) a 20°C com ausência de luz para

evitar a fotodegradação das larvas de *P. lividus*. Após 48h de cultivo larvar, foram adicionadas a cada tubo, duas gotas de formol (40%) tamponizado, e foi determinada por observação directa à lupa binocular a percentagem de pluteus malformados (n=100) e o comprimento total (n=30).

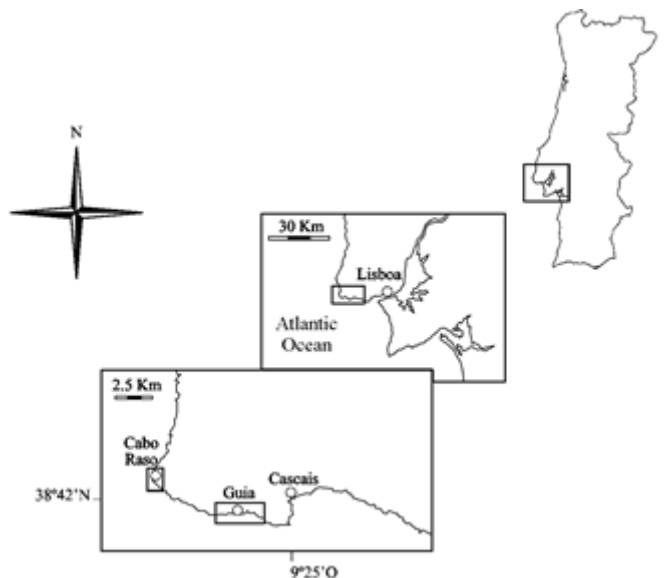


Figura 1: Local de obtenção dos ouriços-do-mar adultos (Cabo Raso) e localização do Laboratório Marítimo da Guia onde se realizaram os ensaios

As larvas pluteus de *P. lividus* de quatro braços foram consideradas malformadas quando pelo menos uma das seguintes características era observada (17): desenvolvimento assíncrono, falta de um ou mais braços, presença de um ou mais braços defeituosos ou morfologia assimétrica ao longo do eixo longitudinal. As larvas sem nenhum dos defeitos acima mencionados foram consideradas normais. O comprimento total foi medido entre a base do braço lateral posterior até ao extremo apical (Figura 2).

Todo o material de vidro utilizado foi previamente lavado com ácido nítrico (HNO_3 , 10% v/v) e enxaguado com acetona e água desionizada, secando em estufa durante 4h a 100 °C. A água do mar natural utilizada nos tubos de cultivo larvar foi devidamente filtrada (0,35 μm) e esterilizada com recurso a U.V.

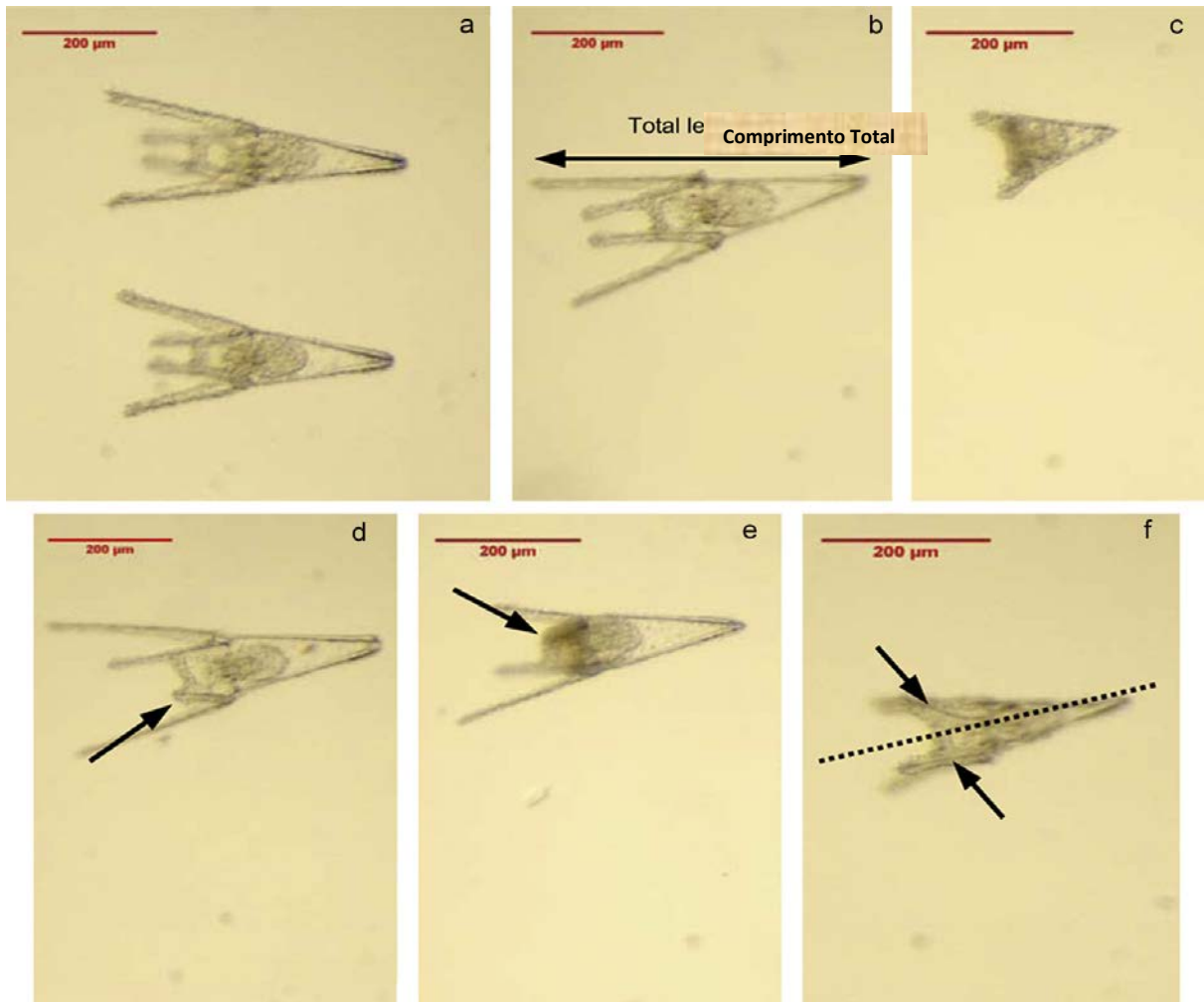


Figura 2: (a,b) Larva pluteus bem formada; (c-f) Desenvolvimento anormal; (c-e) Falta de braços ou presença de braços mal formados; (f) Assimetria morfológica (15).

Toxicidade indirecta das lamas de cal através da ração dos progenitores

Recolha de ouriços-do-mar e sua manutenção em cativeiro

Cerca de 500 ouriços-do-mar foram capturados no Cabo Raso em Setembro de 2012 e transportados de imediato para o Laboratório Marítimo da Guia. Para uma amostra significativa destes ouriços selvagens (número variável de acordo com o parâmetro analisado) foram medidas as seguintes variáveis biométricas: diâmetro máximo da concha, peso, altura e largura máxima de 3 espinhos retirados da zona do ambitus e, após abertura da concha, o peso das 5 gónadas para se poder determinar o índice gonadassomático ($IGS = \frac{\text{peso das 5 gónadas}}{\text{peso total do ouriço}} \times 100$). Também para esta amostra inicial de *P. lividus*, foram recolhidas amostras de gónada e parede do corpo (concha com epiderme e espinhos) para avaliar a concentração destes tecidos em mercúrio (Hg), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e cálcio (Ca).

No Laboratório Marítimo da Guia os ouriços-do-mar foram colocados em tanques de fibra de vidro associados a um sistema de recirculação de água do mar como referido por Luís *et al.* (14). Basicamente, este sistema é constituído por 8 tanques de 0,4 m³ cada, e possui filtro biológico e espumador de proteínas. Os ouriços-do-mar foram acondicionados à temperatura de 18±1°C, ao fotoperíodo de 14h de luz e 10h de escuridão, à salinidade de 35 ± 2 PSU e a uma densidade de 50 por tanque (aproximadamente 100/m²).

Alimentação dos ouriços-do-mar em cativeiro

Passados 10 dias sem qualquer alimentação, a fim de homogeneizar o estado biológico dos ouriços-do-mar, estes passaram a ser alimentados uma vez por semana. Em cada dois tanques escolhidos aleatoriamente os ouriços-do-mar foram alimentados com uma das quatro rações processadas para este trabalho (Tabela 1).

Tabela 1: Ingredientes utilizados no processamento das quatro rações

	Controlo	1%	2%	4%
Ingredientes (massa seca)	g/Kg			
Farinha de milho	405	405	405	405
Farinha de trigo	405	405	405	405
Óleo de milho	100	100	100	100
Suplemento vitamínico	10	10	10	10
Alginato de sódio	20	20	20	20
Hexametáfosfato de sódio	20	20	20	20
Lamas de cal	0	10	20	40
Celulose	40	30	20	0
pH	5,18	5,58	6,03	6,08

Como se pode verificar pelos ingredientes utilizados, obtiveram-se rações isocalóricas onde apenas variavam as percentagens de lamas de cal e celulose. Semanalmente, os tanques foram sifonados para limpeza dos mesmos, processo no qual a água do sistema de recirculação era em parte renovada, e posteriormente eram fornecidas

cerca de 40g da ração respetiva por cada tanque. Ao fim de seis meses de cultivo, em março de 2013, deu-se por terminado este ensaio experimental.

Determinação de índices biológicos

No final do ensaio e por cada tanque determinou-se o peso das gónadas de 15 exemplares, o peso total e diâmetro da concha de 30, e a altura e a largura máxima de 3 espinhos retirados da zona do ambitus para 10 ouriços-do-mar. Foi comparado o IGS, a relação peso/diâmetro e a relação altura/largura dos espinhos entre os exemplares de cativeiro, e com os resultados obtidos para estes mesmos parâmetros nos ouriços-do-mar selvagens medidos no início deste ensaio (setembro 2012).

Teste ecotoxicológico

Após 6 meses de cativeiro, procedeu-se a um ensaio ecotoxicológico com os gâmetas obtidos de 3 machos e 3 fêmeas de cada tanque, de acordo com a metodologia usada no ponto 2.1, com a exceção que neste ensaio não foram adicionadas lamas de cal à água do mar utilizada no cultivo larvar.

Análises de metais

Foram recolhidas amostras de gónada e parede do corpo de 6 ouriços, 3 machos e 3 fêmeas (determinação do sexo através da análise macroscópica das gónadas), no conjunto dos dois tanques de cada dieta, com o objectivo de analisar a possibilidade de bioacumulação nestes tecidos ao nível de metais pesados não essenciais (Hg, Pb, Cd) e também do macronutriente Ca, ao longo do tempo de cativeiro. A determinação destes elementos foi efectuada num laboratório acreditado e certificado, Labiagro, Laboratório Químico, Agroalimentar e Microbiológico, Lda (NP EN ISO/IEC 17025:2005), da seguinte forma: Depois de realizada uma pesagem da amostra, em balança devidamente controlada, procedeu-se à destruição da matéria orgânica. Esta etapa foi realizada recorrendo à digestão ácida com ácido nítrico ultra puro associada à tecnologia de microondas (MultiwavePro, Anton-Paar). Para as amostras em questão, foi estudado o binário tempo versus potência de microondas, que permitiu atingir temperaturas e pressões adequadas para garantir a completa decomposição da matriz e a completa solução dos elementos. Uma vez completa a digestão, as amostras

seguiram para a análise instrumental, através do método de espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo (ICP-MS, Agilent, modelo 7500a G3160A) e espectrometria de emissão óptica em plasma (ICP Thermo Unicam, modelo 6300). Durante todo o processo de ensaio, o laboratório realizou controlo de qualidade da digestão e análise através da realização de brancos, duplicados, padrões de recuperação de amostras, padrões de controlo e controlo de desempenho instrumental.

Todos os animais sobreviventes que não foram incluídos no ensaio, após a sua conclusão, foram devolvidos ao meio natural.

Análise estatística

Como programa de análises estatísticas foi utilizado o software "STATISTICA 11". Para testar os efeitos dos fatores analisados (tanque e/ou dieta) de todas as variáveis estudadas, foi primeiramente aplicado o teste de Levene para testar a homogeneidade das variâncias de todos os dados. Dados com variâncias homogêneas foram analisados através da análise de variância, ANOVA 1 fator, seguida do teste de Tukey. Dados com variâncias heterogêneas foram analisados com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas. O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$. Também, e para normalizar os dados, os valores de IGS, percentagem de fertilização e percentagem de malformações, foram primeiramente transformados nos valores de arco seno da raiz quadrada da proporção.

RESULTADOS

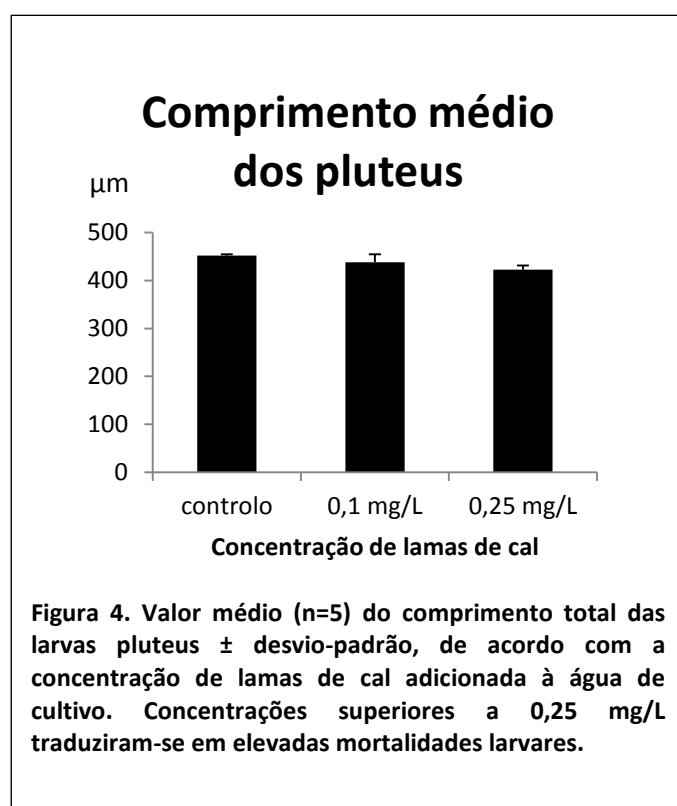
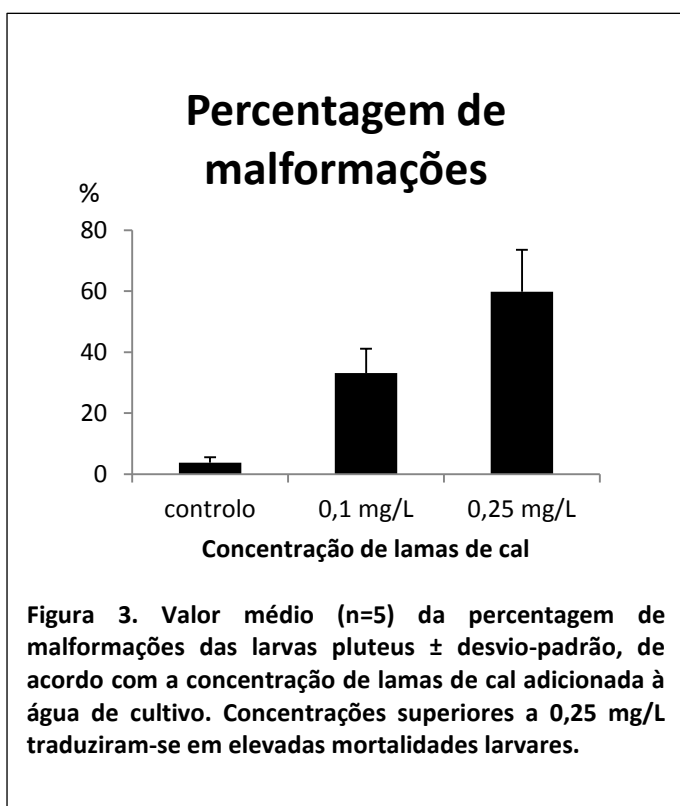
Toxicidade direta das lamas de cal através da água de cultivo larvar

Os valores de pH obtidos nas soluções com a concentração de lamas de cal de 0 mg/L (controlo), 0,1 mg/L; 0,25 mg/L; 0,50 mg/L; 0,75 mg/L; 1 mg/L, foram respectivamente de 7,95, 8,03, 8,15, 8,27, 8,38 e 8,44.

A percentagem de fertilização obtida após a adição do esperma de 1 ouriço-do-mar selvagem ao volume de óvulos de uma fêmea selvagem foi de 99%. Os efeitos da adição das lamas de cal à água de cultivo larvar sobre a percentagem de malformações e sobre o comprimento médio das larvas pluteus estão representados na figura 3 e 4, respetivamente.

Ao nível da percentagem de malformações de pluteus, registaram-se diferenças significativas entre todos os tratamentos (controlo, concentração de 0,1 mg/L e concentração de 0,25 mg/L) (teste de Tukey, $p < 0,001$), cujos valores médios foram respetivamente de 3,80%, 33,2% e 59,8%. Ao nível do comprimento total dos pluteus, apenas os pluteus do tratamento controlo com 452 μm apresentaram comprimentos significativamente maiores (teste de Tukey, $p < 0,01$) do que os pluteus do tratamento com a adição de 0,25mg/L de lamas de cal (422 μm).

Para os tratamentos com adições superiores de lamas de cal às águas do cultivo larvar (0,5 mg/L, 0,75 mg/L e 1 mg/L), não se conseguiu determinar os valores das variáveis percentagem de malformações e comprimento total médio dos pluteus, visto que ocorreu uma elevada mortalidade dos embriões e larvas nestes tratamentos, não se tendo conseguido analisar uma amostra mínima de 30 embriões/larvas. O número de embriões/larvas que se conseguiu analisar para todos os replicados destes tratamentos variou entre 1 e 22 e estes números correspondiam sempre a malformações larvares.

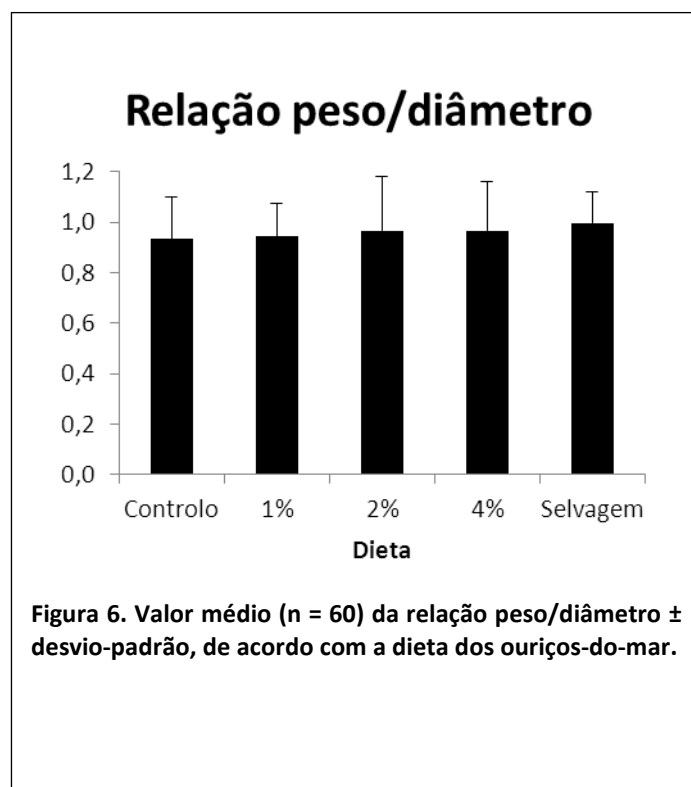
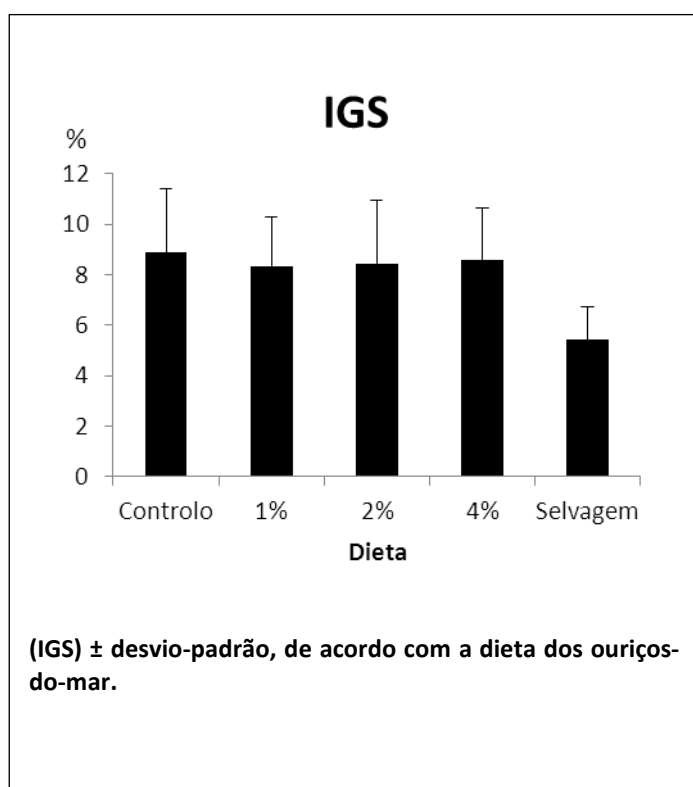


Toxicidade indirecta das lamas de cal através da ração dos progenitores

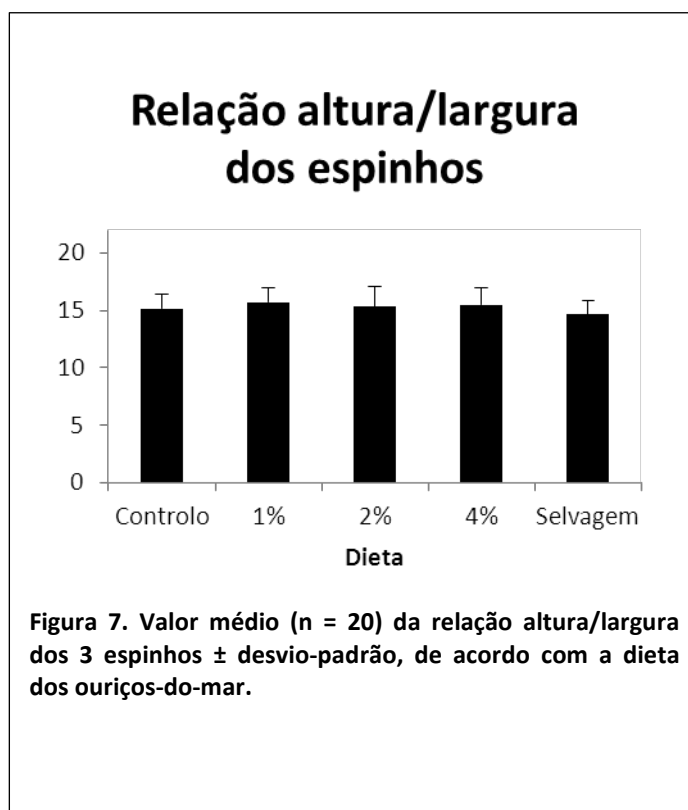
Índice gonadossomático (IGS) e relações biométricas

Quando comparamos o IGS entre os ouriços-do-mar selvagens ($5,43 \pm 1,31$, média \pm desvio padrão) capturados em setembro de 2012 e os exemplares de cativeiro, aquando do final do ensaio experimental (figura 5), verificamos que ocorreu um acréscimo significativo (teste de Tukey, $p < 0,001$) do IGS para os ouriços-do-mar alimentados com qualquer uma das dietas de cativeiro. Entre as dietas de cativeiro não se obtiveram diferenças significativas (teste de Tukey, $p > 0,05$) no IGS dos ouriços-do-mar analisados (valores médios superiores a 8%). Para esta variável não se detetaram diferenças entre os duplicados do fator tanque (ANOVA, 1 fator, $p > 0,05$), pelo que os dados apresentados correspondem à junção dos valores de IGS para os ouriços-do-mar que estiveram a ser alimentados com a mesma dieta nos 2 tanques.

No que diz respeito às duas relações biométricas analisadas também não se encontraram diferenças significativas entre os dois tanques para cada uma das dietas de cativeiro (ANOVA, 1 fator, $p > 0,05$). Desta forma, os dados são igualmente apresentados de acordo com cada uma das dietas analisadas. Para estas duas relações, as diferenças demonstraram não ser significativas quer para a relação peso diâmetro (figura 6) (teste de Kruskal-Wallis $p > 0,05$), quer para a relação altura/largura dos espinhos (figura 7) (ANOVA 1 fator, $p > 0,05$).



Os valores médios da relação peso/diâmetro dos ouriços-do-mar variaram entre 0,93 para a dieta controlo e 1,00 para os exemplares selvagens. Quanto à relação altura/largura dos espinhos a amplitude de variação ficou entre 14,7 para os ouriços selvagens, e 15,7 para os ouriços de cativeiro alimentados com a dieta de 1% de incorporação de lamas de cal.



Testes ecotoxicológicos

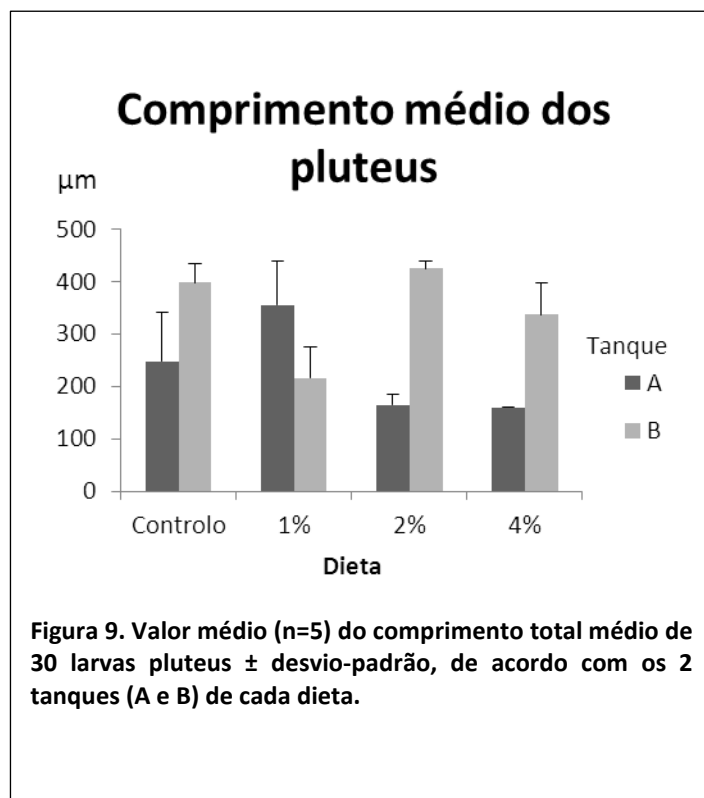
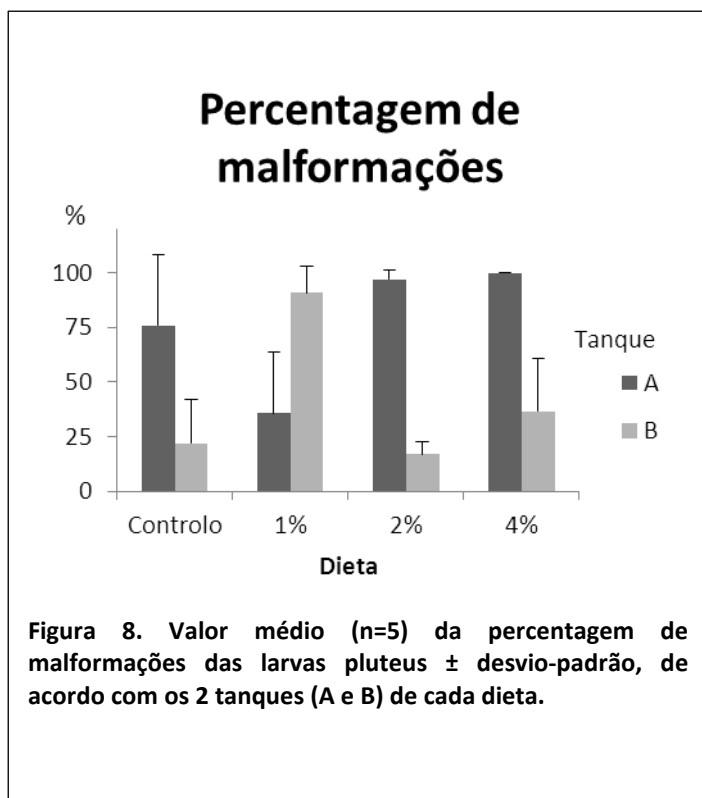
Na tabela 2 estão representadas as percentagens de fertilização obtidas para os gâmetas recolhidos dos progenitores dos 8 tanques utilizados (2 tanques por cada dieta analisada). Apenas com a excepção do tanque B da dieta com a incorporação de 2% de lamas de cal, os valores obtidos foram sempre inferiores a 70%.

Tabela 2: Percentagens de fertilização dos gâmetas obtidos dos ouriços-do-mar progenitores por dieta e tanque utilizados.

Dieta	Controlo		1%		2%		4%	
Tanque	1	4	3	6	2	5	7	8
Fertilização%	65,3%	67,8%	56,1%	54,9%	43,7%	72,3%	40,3%	55,0%

Efetuada a análise estatística ao fator dieta, não se obtiveram diferenças ao nível da percentagem de fertilização (Teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

Relativamente às variáveis percentagem de malformações e comprimento dos pluteus, detetaram-se os chamados efeitos de tanque para todas as dietas analisadas, visto que se obtiveram diferenças significativas entre os pluteus provenientes de ouriços-do-mar progenitores obtidos dos dois tanques usados para cada dieta (ANOVA, 1 fator, $p < 0,05$). Desta forma, os dados apresentados nas figuras 8 e 9 estão discriminados por tanque. Corroborando a análise estatística, verifica-se rapidamente para estas 2 figuras a grande variação existente entre os valores das variáveis obtidas ao nível dos 2 tanques de cada dieta. Adicionalmente, e para a maioria das situações, também se verifica um valor elevado do desvio padrão, o que denota de uma forma geral, a ocorrência de uma grande variação entre os pluteus dos 5 replicados (tubos de ensaio) que se usaram para o desenvolvimento embrionário e larvar. De qualquer das formas, quando se juntam os dados de todos os dois tanques e se analisa o efeito da dieta, não se obtêm diferenças significativas entre os pluteus, quer para a percentagem de malformações (ANOVA, 1 factor, $p > 0,05$), quer para o comprimento do pluteus (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).



Concentração de metais na gónada e parede do corpo de *P. lividus*

Relativamente à concentração de metais pesados não essenciais, Hg, Pb e Cd, nas gónadas de *P. lividus* verificou-se que, à exceção de 2 dos 30 exemplares, todas as gónadas apresentaram valores abaixo do limite de quantificação do método analítico (0,063, 0,38 e 0,08 mg/kg para o Hg, Pb e Cd, respetivamente). Estes 2 casos singulares são relativos aos tecidos reprodutores de um macho selvagem (0,065 mg/kg de Hg), e de uma fêmea de cativeiro alimentada com a ração de 2% de incorporação de lamas de cal (0,089 mg/kg de Cd). No que diz respeito à parede do corpo e à concentração de Hg, 75% das amostras tinham valores abaixo do limite de quantificação e 25% das amostras tinham concentrações inferiores a 0,1 mg/kg. Para o Cd, concentrações abaixo do limite de quantificação foram obtidas em cerca de 90% das amostras, enquanto que nos restantes 10% a parede do corpo apresentava concentrações sempre inferiores a 0,09 mg/kg. Contudo para o Pb a situação foi a inversa, pois apenas em cerca de 20% das amostras os teores encontrados estavam abaixo do limite de quantificação. Para os restantes 80% das amostras, as concentrações obtidas foram sempre inferiores a 0,73 mg/kg. Na análise estatística efectuada a este conjunto de amostras (80%, n= 26), não se obtiveram diferenças na concentração de Pb da parede do corpo entre ouriços-do-mar machos e fêmeas, e entre os ouriços-do-mar de cativeiro alimentados com várias dietas e os ouriços-do-mar selvagens (ANOVA, 1 fator, $p > 0,05$).

Relativamente ao macronutriente Ca, apresenta-se na figura 10, os valores de concentração obtidos quer para a gónada (valores em mg/kg) quer para a parede do corpo (valores em mg/kg x 10³).

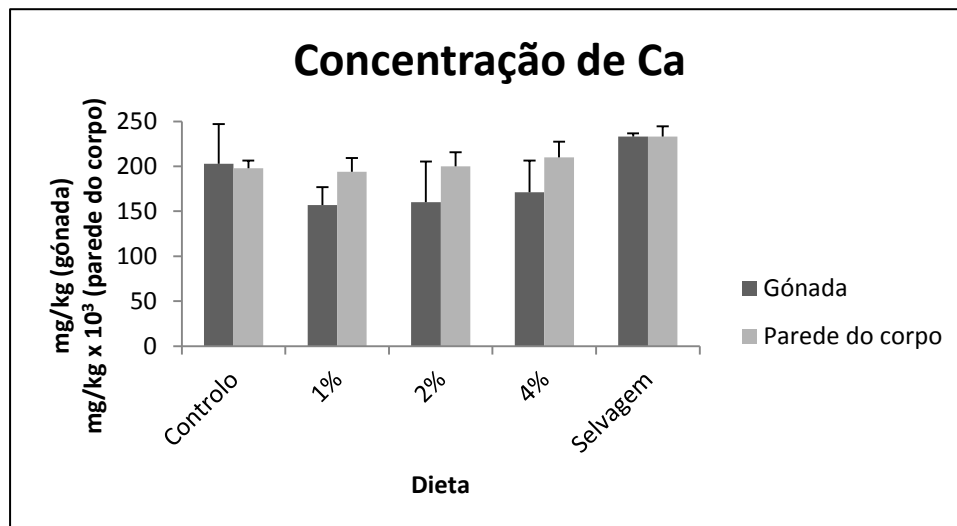


Figura 10. Concentração de Ca (média \pm desvio padrão) obtida em amostras de gónada (n=6) e parede do corpo (n=6) em ouriços-do-mar de cativeiro alimentados com diferentes rações e em ouriços-do-mar selvagens. Para os valores da parede do corpo as unidades do eixo deverão ser multiplicadas por 10^3 .

Para estes dois tecidos não se obtiveram diferenças entre ouriços-do-mar machos e fêmeas (ANOVA, 1 fator, $p > 0,05$) pelo que os dados apresentados correspondem ao conjunto das amostras dos dois sexos.

A amplitude dos valores médios dos teores de Ca encontrados na gónada situou-se entre um mínimo de 157 mg/kg, em ouriços-do-mar alimentados com ração com incorporação de 1% de lamas de cal, e um máximo de 233 mg/kg em ouriços-do-mar selvagens. Apenas entre ouriços-do-mar destas duas dietas se obtiveram diferenças significativas na concentração de Ca na gónada (teste de Tukey, $p < 0,05$). Para a parede do corpo verificou-se que o teor máximo encontrado em ouriços-do-mar selvagens (média de 233×10^3 mg/kg) foi superior ao teor de Ca encontrado em ouriços-do-mar de todas as dietas de cativeiro (teste de Tukey, $p < 0,05$), excepto a dieta com incorporação de 4% de lamas de cal.

DISCUSSÃO

Hoje em dia existem dados concretos que a acidificação oceânica, cujas previsões são de que continuará a aumentar, pode ser prejudicial para as larvas de animais marinhos, fenómeno já devidamente documentado para larvas do ouriço-do-mar *Lytechinus pictus* (18). Com os testes realizados procurávamos analisar uma possível

solução que pudesse auxiliar na mitigação deste problema, visto que a substância em estudo, as lamas de cal, são de natureza alcalina e possuem um elevado teor de cálcio, nutriente necessário para o desenvolvimento dos exosqueletos dos animais marinhos. Contudo nos ensaios de toxicidade direta, verificou-se o efeito tóxico das lamas de cal sobre os pluteus, principalmente ao nível das percentagens de malformações, mesmo a concentrações de 0,1mg/L. Parece-nos que este efeito tóxico se deverá ao contato directo entre as larvas e as partículas da lama de cal que se juntavam no fundo dos tubos de ensaio. De facto, a elevada densidade das partículas das lamas de cal levam a que estas rapidamente precipitem e, se bem que a taxas mais lentas, os ovos de *P. lividus* também tendem a assentar no fundo do tubo de ensaio. Desta forma, a solução não fica homogeneamente diluída, e as lamas de cal concentram-se no fundo onde interagem com o desenvolvimento larvar dos ouriços-do-mar. Aquando da análise à lupa do estado dos pluteus, verificava-se inclusivamente que a parede externa dos pluteus estava impregnada por uma série de partículas, e que este fenómeno era mais evidente para os tratamentos com concentrações mais elevadas de lamas de cal. Apesar de considerarmos que provavelmente deverá ter sido este efeito físico-químico, no qual os embriões ou pluteus por adsorção ficaram com as paredes externas revestidas de partículas, a principal causa de ocorrência de malformações, não possuímos dados suficientes que suportem esta conclusão. Outras hipóteses prováveis como a toxicidade de qualquer substância presente nas lamas de cal, ou o acréscimo do pH da água de cultivo larvar não nos parecem tão plausíveis face aos dados disponíveis (análises de concentração de diversos poluentes existentes nas lamas de cal que nos foram facultadas pela empresa CELBI, e os valores de pH medidos para as soluções testadas). Pensamos que para trabalho futuro seria interessante avaliar a toxicidade das lamas de cal utilizando concentrações inferiores a 0,1mg/L.

De uma forma geral podemos afirmar que o aumento da concentração de lamas de cal adicionadas às rações dos progenitores dos ouriços-do-mar não teve efeito no desempenho reprodutor destes animais para as 3 variáveis analisadas (percentagem de fertilização, percentagem de malformações e comprimento médio do pluteus). Contudo, devemos ter algumas cautelas nestas asserções pois os valores de fertilização obtidos (inferiores a 70%) não respeitam os valores mínimos estabelecidos pela USEPA (19) para o desenvolvimento de ensaios ecotoxicológicos com ovos de ouriços-do-mar.

Para estes testes ecotoxicológicos utilizámos gâmetas de três machos e de três fêmeas de cada tanque visto que nos pareceu que as gónadas destes ouriços, apesar de apresentarem a cor característica das gónadas maduras (amarelo-alaranjado para os machos e laranja-avermelhado para as fêmeas) ainda não se encontravam nos estados finais da gametogénese, pois após dissecação dos ouriços-do-mar, as gónadas não libertavam o fluido com gâmetas que normalmente libertam quando estão maduras. Desta forma, tivemos que fazer alguns cortes nas gónadas de 3 ouriços-do-mar para obter o volume de gâmetas necessário. A análise microscópica dos gâmetas também evidenciou um conjunto considerável de óvulos imaturos (presença de núcleo central) e espermatozóides pouco móveis. Pensamos que este facto, terá sido a principal razão para a obtenção de taxas de fertilização reduzidas. Esta situação não ocorreu com os ouriços-do-mar selvagens aquando do teste ecotoxicológico para avaliação da toxicidade directa em que a percentagem de fertilização média foi de 99%. De qualquer das formas, quando comparamos o IGS dos ouriços com 6 meses de cativeiro com os ouriços-do-mar selvagens iniciais, houve um acréscimo significativo do peso da gónada, o que demonstra que os parâmetros bióticos e abióticos de cativeiro foram indicados para o desenvolvimento dos tecidos reprodutores. Aliás, outro estudo efectuado no mesmo sistema (20) e com rações equivalentes, mas sem adição de lamas de cal, dão-nos igualmente essa indicação. De qualquer das formas, pensamos que devido aos constrangimentos temporais que levaram à decisão de alimentar os ouriços apenas 1 vez por semana, poderá ter sido a causa para que os ouriços-do-mar não dispusessem de energia suficiente para completar o desenvolvimento gametogénico, ao contrário do que aconteceu no estudo referido anteriormente onde os ouriços foram alimentados duas vezes por semana.

No que diz respeito às variáveis biométricas analisadas, elas foram escolhidas no sentido de testar a hipótese do aumento do peso e/ou do diâmetro dos ouriços, e do aumento do comprimento e/ou largura dos espinhos com o crescente fornecimento de Ca que era fornecido nas rações com maior percentagem de incorporação de lamas de cal. De acordo com os resultados obtidos, parece-nos que esta hipótese deve ser rejeitada pois não se obtiveram diferenças entre os ouriços alimentados com dietas diferentes, ao nível das duas relações biométricas analisadas.

No que diz respeito aos teores de metais nos ouriços-do-mar, na análise efetuada em indivíduos selvagens os valores de metais pesados detetados foram baixos, o que confirma a ideia de que o Cabo Raso é uma zona natural não poluída.

No caso dos ouriços-do-mar de cativeiro, estes apresentaram também concentrações reduzidas de metais pesados, o que significa que quer as rações quer o meio de cultivo não foram fontes de acumulação destes poluentes. As análises que nos foram facultadas sobre a composição das lamas de cal vão ao encontro desta conclusão da não contaminação via alimentar, visto que nestas análises não encontraram valores destes metais pesados não essenciais, entre outros poluentes, acima dos limites de quantificação dos métodos analíticos utilizados.

Apenas para o Pb na parede de corpo, aparecem de forma mais consistente valores de concentração baixos, mas que na gónada estão abaixo dos limites de quantificação. Isto vai contra as conclusões de trabalhos anteriores onde se encontraram concentrações superiores de metais nos tecidos internos relativamente à parede do corpo (21, 22, 23).

Quanto ao Ca verifica-se que são os ouriços selvagens que têm maiores teores quer na gónada quer na parede do corpo. Tal situação poderá ser devida ao alimento natural ser mais variado e possivelmente mais rico em Ca do que as rações testadas. Contudo, é interessante notar que para a parede do corpo (tecido essencialmente constituído por carbonato de Ca), os ouriços-do-mar alimentados com ração com incorporação de 4% de lamas de cal, foram os únicos ouriços-do-mar de cativeiro cuja concentração de Ca se assemelhou aos selvagens, o que poderá indicar a maior incorporação deste composto por via alimentar através de rações com maior concentração de lamas de cal, logo com maior concentração de Ca.

CONCLUSÃO

A avaliação da potencialidade de utilização das lamas de cal nas duas vertentes analisadas, usando o ouriço-do-mar *P. lividus* como bioindicador, parece indicar que a sua utilização direta na água do mar, como ação inibidora da acidificação dos oceanos, deverá ser desconsiderada face aos efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento embrionário e larvar. Todavia, o seu uso em rações para animais como fonte de Ca, poderá ser uma opção a considerar.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à CELBI, Celulose Beira Industrial, pela disponibilidade de participação neste ensaio através do fornecimento das lamas de cal utilizadas, do financiamento das análises de metais realizadas, e pelos esclarecimentos prestados no processo industrial de obtenção de lamas de cal. Agradecemos também à Labiagro, Laboratório Químico, Agroalimentar e Microbiológico, Lda.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Battaglia A, Calace N, Nardi E, Petronio BM, Pietroletti M (2007). Reduction of Pb and Zn bioavailable forms in metal polluted soils due to paper mill sludge addition Effects on Pb and Zn transferability to barley. *Biores. Technol.*, 98: 2993 – 2999.
2. Calacea N, Campisib T, Iacondinib A, Leonia M, Petronioa BM, Pietroletti M (2005). Metal-contaminated soil remediation by means of paper mill sludges addition: chemical and ecotoxicological evaluation. *Environ. Poll.*, 136: 485 – 492.
3. Mahmood T, Elliot A (2006). A review of secondary sludge reduction technology for the pulp and paper industry. *Water Res.*, 40(11): 2093 – 2112.
4. Lourenço, Rivail S. (1997). Curvas de neutralização de solo com lama de cal, comparada com CaCO_3 p. a. e calcário. *Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo*, 35: 49 – 57.
5. Wong, J. W. C., Selvam, A., (2006). Speciation of heavy metals during co-composting of sewage sludge with lime. *Chemosphere* 63: 980 – 986.
6. Deka, S., Yasmin, S., (2005). Utilization of lime sludge waste from paper mills for fish culture. *Current Science, Vol. 90, 8*: 1126 – 1130.
7. Caldeira, K., Wickett, M., (2005) Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *J Geophys Res* 110:C09S04
8. Gattuso JP, Buddemeier RW (2000) Ocean biogeochemistry. Calcification and CO_2 . *Nature* 407(6802):311–313, 313.
9. Siikavuopio, S.I., Mortensen, A., Dale, T., Foss, A., (2007). Effects of carbon dioxide exposure on feed intake and gonad growth in green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture* 266: 97–101.

10. Kurihara, H., Shirayama, Y., (2004). Effects of increased atmospheric CO₂ on sea urchin early development. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 274: 161–169.
11. Dupont, S., Thorndyke, M.C., (2008). Ocean acidification and its impact on the early life-history stages of marine animals. In: Briand, F. (Ed.), *Impacts of Acidification on Biological Chemical and Physical Systems in the Mediterranean and Black Seas*. CIESM, Monaco, pp. 89–97.
12. Morgan, S.G., (1995). Life and death in the plankton: larval mortality and adaptation. In: McEdward, L. (Ed.), *Ecology of Marine Invertebrate Larvae*. CRC Press, Boca Raton. vol. 1.
13. Elkin, C.M., Marshall, D.J., (2007). Desperate larvae: the influence of deferred costs and habitat requirements on habitat selection. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 335: 143–153.
14. Luís, O., Delgado, F., and Gago, J., (2005). Year-round captive spawning performance of the sea urchin *Paracentrotus lividus*: Relevance for the use of its larvae as live feed. *Aquatic Living Resources*, 18: 45-54.
15. Beiras, R., Alvarez, L., (2006). Toxicity of seawater and sand affected by the *Prestige* fuel–oil spill using bivalve and sea urchin embryogenesis bioassays. *Wat. Air Soil Pollut.* 177, 457–466.
16. Juan Bellas, (2008). Prediction and assessment of mixture toxicity of compounds in antifouling paints using the sea-urchin embryo-larval bioassay. *Aquatic Toxicology* 88 308–315
17. Repolho, T., Costa, M., Luís, O., Gago, J., (2011). Broodstock diet effect on sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) endotrophic larvae development: Potential for their year-round use in environmental toxicology assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 584 – 592.
18. O'Donnell, M., Todgham, A., Sewell, M., Hammond, L., Ruggiero, R., Fangué, N., 6, Zippay, M., Hofmann, G., (2010). Ocean acidification alters skeletogenesis and gene expression in larval sea urchins. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 398: 157–171.
19. USEPA, (2002). *Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms Third Edn.* U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati.

20. Gago, J., Repolho, T., Luís, O.J. (2009) Fatty acid nutritional quality of sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816) eggs and endotrophic larvae: relevance for feeding of marine larval fish. *Aquac. Nutr.*15: 379-389.
21. Hernández, O., Gutiérrez, A., González-Weller, D., Lozano, G., Melón, E., Rubio, C., Hardisson, A., (2010). Accumulation of toxic metals (Pb and Cd) in the sea urchin *Diadema aff. antillarum* Philippi, 1845, in an oceanic island (Tenerife, Canary Islands). *Environ Toxicol.* 25(3):227 – 233.
22. Warnau, M., Teyssié, J., Fowler, S., (1996). Biokinetics of selected heavy metals and radionuclides in common Mediterranean echinoid *Paracentrotus lividus*: sea water and food exposures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 141: 83 – 94.
23. Warnau, M., Ledent, G., Temara, A., Jangoux, M., Dubois, P., (1995). Experimental cadmium contamination of the echinoid *Paracentrotus lividus*: influence of exposure mode and distribution of the metal in the organism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 116: 117 – 124.