

ÁREA TEMÁTICA: Zoologia aplicada
SUBÁREA TEMÁTICA:

EFEITO DO HERBICIDA DIURON NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E LARVAL DO EQUINODERMO *Mellita quinquiesperforata* (LESKE, 1778)

Samuel Freire da Cunha¹, Luis Fernando Marques-Santos^{1,2}

¹ Laboratório de Biologia Celular e do Desenvolvimento (LABID) - Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, João Pessoa, PB, Brasil. E-mail: sfirecunha@gmail.com

² Departamento de Biologia Molecular (DBM) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) - Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, João Pessoa, PB, Brasil. E-mail: marques@dbm.ufpb.br

INTRODUÇÃO

Desde o ano de 2008 o Brasil tem liderado o ranking mundial de consumo de pesticida, com um aumento contínuo no uso desses produtos até o presente momento (de Campos et al. 2021; da Silva e dos Santos, 2023). Os herbicidas - como o diuron - são a classe de pesticidas mais consumida no país, seguido dos fungicidas e inseticidas (Pinto et al., 2021). Compostos desta classe são extensamente utilizados na agroindústria e representam um potencial risco ao atingir ecossistemas circunvizinhos, em especial ecossistemas aquáticos (Castillo et al., 1997). Devido ao risco de alterações ambientais, diversos estudos têm sido desenvolvidos no intuito de entender o comportamento desses compostos no ambiente e sua interação com a biota. Dentre os organismos utilizados nesses estudos destacam-se o grupo dos equinodermos, animais com fertilização externa e cujo desenvolvimento embrionário e larval estão susceptíveis a efeitos deletérios de contaminantes (Corsi e Marques-Santos, 2018; Manzo e Schiavo, 2022). Contudo, espécies tropicais como a *Mellita quinquiesperforata* pouco têm sido utilizadas em estudos desse tipo. Estes animais estão amplamente distribuídos na costa brasileira em águas rasas e costeiras, estando sujeitos a um cenário de exposição crônica aos pesticidas. Tais condições somadas à sensibilidade do táxon justificam o uso de *M. quinquiesperforata* na avaliação de possíveis efeitos tóxicos do diuron sobre a biota marinha (Tavares e Borzone, 2006; Laitano et al., 2008; Wellner, 2012; Soares e Resgalla Junior, 2016; Mello, da Fonseca e de Souza, 2020). Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo investigar o efeito tóxico do herbicida diuron no desenvolvimento embrionário e larval do equinodermo *M. quinquiesperforata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Indivíduos adultos de *M. quinquiesperforata* foram coletados na praia de Ponta de Campina (lat.: -7.032371, long.: -34.831041; ICMBio, protocolo: 71157-3) e transportados até o Laboratório de Biologia Celular e do Desenvolvimento (LABID/DBM/UFPB). Os gametas foram coletados a partir da injeção intraperistomial de cloreto de potássio (0,5 M). Após a fertilização, zigotos e larvas de *M. quinquiesperforata* foram expostos às concentrações de 0, 1, 5, 10, 25 e 50 mg/L de diuron. Para a avaliação do efeito do diuron sobre o desenvolvimento embrionário, zigotos foram expostos ao composto 10 minutos após a fertilização (mpf), em placas multipoços (24 poços; 60 zigotos/poço), e o desenvolvimento embrionário foi monitorado nos tempos de 90 mpf (estágio de 2-4 células) e 13 horas após a fertilização (hpf; estágio de gástrula). Para investigar o efeito do herbicida sobre o desenvolvimento larval, as larvas foram expostas 24 hpf, em placas multipoços (6 poços; 30 larvas/poço) e a morfologia larval observada 48 hpf. Embrões e larvas foram cultivados em água do mar natural filtrada (NSW, do inglês: *natural seawater*; salinidade: 35 - 37; pH 8) e mantidos em incubadora à 25°C sob fotoperíodo escuro/claro (12:12 h). Para análise do efeito do composto sobre o desenvolvimento embrionário e larval, os embrões e larvas foram classificados em dois grupos: i) embrões e larvas normais ii) embrões e larvas malformados, com desenvolvimento atrasado, bloqueado e/ou morte celular. Os tratamentos foram realizados em triplicata e os experimentos repetidos, de maneira independente, 3 vezes. Para a análise estatística, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's e os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diuron apresentou efeito tóxico para os embriões de *M. quinquesperforata* em 90 mpf (figura 1A) e 13 hpf (figura 1B) apenas na maior concentração testada (50 mg/L). Nessas concentrações, $5,11\% \pm 2,02\%$ e $2,20\% \pm 1,12\%$ dos embriões encontravam-se com desenvolvimento normal, comparados à $91,86\% \pm 0,99\%$ e $91,21\% \pm 1,64\%$ de embriões normais no grupo controle ($p < 0,0006$; $p < 0,0001$), para 90 mpf e 13 hpf, respectivamente. Para o estágio larval, o herbicida mostrou efeito nas duas maiores concentrações testadas (25 e 50 mg/L; figura 1C), nas quais 100% das larvas encontravam-se com o desenvolvimento afetado ($94\% \pm 1,36\%$ larvas normais no grupo controle; $p < 0,0001$). As concentrações de diuron que apresentaram efeito tóxico sobre o desenvolvimento larval de *M. quinquesperforata* são mais altas do que aquelas que apresentaram efeito para o mesmo *endpoint* em estudo com outros equinodermos. Manzo, Bueno e Cremisini (2006) encontraram o valor da menor concentração com efeito observável (LOEC, do inglês “*lowest observed effect concentration*”) no desenvolvimento larval do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* de 0,5 mg/L, enquanto Perina e colaboradores (2011) encontraram um valor de LOEC de 2 mg/L para a toxicidade do diuron sobre as larvas de *Lytechinus variegatus*. Esses valores encontram-se, respectivamente, cerca de 50x e 12x menores do que a concentração mínima que apresentou efeito para o estágio larval da espécie de bolacha-da-praia estudada no presente trabalho. Esta diferença pode estar correlacionada a uma maior expressão de transportadores ABC em larvas de *M. quinquesperforata*, conferindo um fenótipo de resistência a múltiplos xenobióticos (MXR) e consequentemente uma maior resistência frente aos efeitos tóxicos do diuron. Trabalhos recentes mostram capacidade de inibição do fenótipo MXR pelo diuron em anelídeos e rotíferos (Lackman et al., 2018; Shim et al., 2022). No entanto, trabalhos adicionais precisam ser realizados para verificar se a maior resistência ao diuron está correlacionada ao fenótipo MXR em *M. quinquesperforata*. Além disso, segundo revisão bibliográfica de Assunção e colaboradores (2022), a menor concentração que apresentou efeito no desenvolvimento de *M. quinquesperforata* (25 mg/L) é quase 180.000 vezes maior do que a concentração máxima reportada em águas superficiais brasileiras (0,14 mg/L) entre os anos de 2000 e 2020.

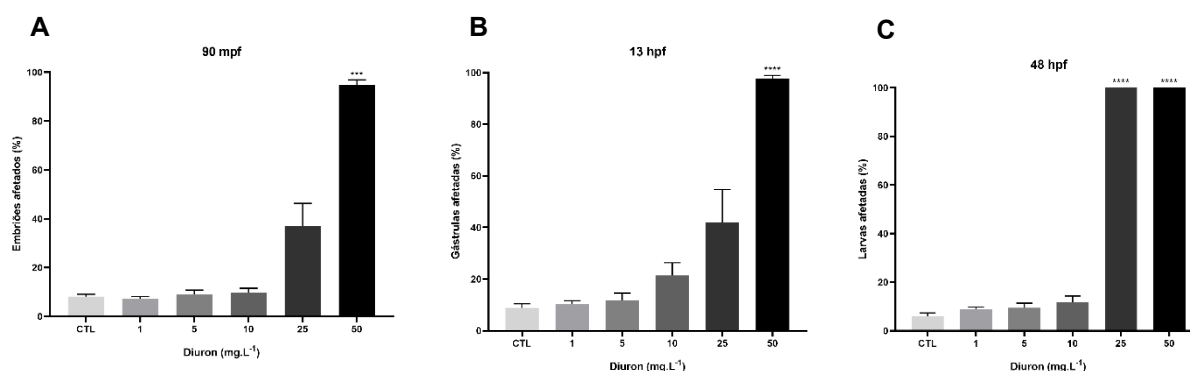


Figura 1 - Efeito do diuron no desenvolvimento embrionário e larval da bolacha-da-praia *M. quinquesperforata*. Primeiras clivagens (A), gastrulação (B) e larva plúteos (C). Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's.

CONCLUSÕES

Desse modo, foi observado que o diuron foi capaz de causar danos ao desenvolvimento embrionário e larval do equinodermo *M. quinquesperforata*. Apesar das altas concentrações que mostram-se tóxicas, estudos deste tipo são importantes para nortear a elaboração e/ou manutenção de políticas públicas ambientais. Ademais, estudos complementares que avaliem efeitos letais e subletais, em cenários de exposição aguda, crônica e em mistura com outros contaminantes em diferentes espécies não-alvo são importantes para elucidação dos efeitos desse composto à biota marinha.

REFERÊNCIAS

- Castillo, L. E., de la Cruz, E., & Ruepert, C. 1997. Ecotoxicology and pesticides in tropical aquatic ecosystems of Central America. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 16(1), 41-51.
- Corsi, I., & Marques-Santos, L. F. 2018. Ecotoxicology in marine environments: the protective role of ABC transporters in sea urchin embryos and larvae. In *Evolutionary Ecology of Marine Invertebrate Larvae* (Vol. 1, pp. 273-287). Oxford University Press.
- da Silva Pinto, T. J., Moreira, R. A., da Silva, L. C. M., Yoshii, M. P. C., Goulart, B. V., Fraga, P. D., ... & Espindola, E. L. G. 2021. Toxicity of fipronil and 2, 4-D formulations (alone and in a mixture) to the tropical amphipod *Hyalella meinerti*. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 38308-38321.
- da Silva, A. O., & dos Santos, F. 2023. A modernização da agricultura e seus impactos no campo: uma análise sobre a disseminação dos agrotóxicos em alagoas (2012-2021). *UÁQUIRI-Revista do Programa de Pós Graduação em Geografia da Universidade Federal do Acre*, 5(1).
- de Assunção, T. D. O. G., Thoni, L. S., Gomes, F. B. R., Castro, S. R., Brandt, E. M. F., & de Oliveira Pereira, R. 2022. Diuram e tebuconazol no Brasil: Comercialização e ocorrência em águas. *Principia: Caminhos da Iniciação Científica*, 22.
- de Campos, A. L., Ignacio, A. R. A., Junior, E. S. O., & Lázaro, W. L. 2021. O avanço do agrotóxico no Brasil e seus impactos na saúde e no ambiente. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, 14(1), 1-15.
- Lackmann, C., Velki, M., Seiler, T. B., & Hollert, H. 2018. Herbicides diuron and fluazifop-p-butyl affect avoidance response and multixenobiotic resistance activity in earthworm *Eisenia andrei*. *Chemosphere*, 210, 110-119.
- Laitano, K. S., Gonçalves, C., & Resgalla Jr, C. 2008. Viabilidade do uso da bolacha-do-mar *Mellita quinquesperforata* como organismo teste. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol*, 3, 9-14.
- Manzo, S., & Schiavo, S. 2022. Physical and chemical threats posed by micro (nano) plastic to sea urchins. *Science of The Total Environment*, 808, 152105.
- Manzo, S., Buono, S., & Cremisini, C. 2006. Toxic effects of irgarol and diuron on sea urchin *Paracentrotus lividus* early development, fertilization, and offspring quality. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51, 61-68.
- Mello, L. C., da Fonseca, T. G., & de Souza, A. D. M. 2020. Ecotoxicological assessment of chemotherapeutic agents using toxicity tests with embryos of *Mellita quinquesperforata*. *Marine Pollution Bulletin*, 159, 111493.
- Perina, F. C., de Souza Abessa, D. M., Pinho, G. L. L., & Fillmann, G. 2011. Comparative toxicity of antifouling compounds on the development of sea urchin. *Ecotoxicology*, 20, 1870-1880.
- Shim, K. Y., Sukumaran, V., Yeo, I. C., Shin, H., & Jeong, C. B. 2022. Effects of atrazine and diuron on life parameters, antioxidant response, and multixenobiotic resistance in non-targeted marine zooplankton. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 258, 109378.
- Soares, J. B., & Resgalla Junior, C. 2016. Echinodermata in ecotoxicological tests: maintenance and sensitivity. *Brazilian Journal of Oceanography*, 64, 29-36.
- Tavares, Y. A., & Borzone, C. A. 2006. Reproductive cycle of *Mellita quinquesperforata* (Leske)(Echinodermata, Echinoidea) in two contrasting beach environments. *Revista Brasileira de Zoologia*, 23, 573-580.
- Wellner, K. 2012. Inducing Fertilization and Development in Sand Dollars. *Embryo Project Encyclopedia*.