



UNIVERSIDADE VILA VELHA

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PROTOCOLO PARA CLASSIFICAÇÃO DE DANOS EM
EMBRIÕES DE OURIÇO-DO-MAR DA ESPÉCIE *Echinometra*
lucunter EXPOSTOS AO SULFATO DE ZINCO ($ZnSO_4$)**

BÁRBARA MARTINS LOPES

Vila Velha

Novembro de 2022

UNIVERSIDADE VILA VELHA

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PROTOCOLO PARA CLASSIFICAÇÃO DE DANOS EM
EMBRIÕES DE OURIÇO-DO-MAR DA ESPÉCIE *Echinometra*
lucunter EXPOSTOS AO SULFATO DE ZINCO ($ZnSO_4$)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Vila Velha, como pré-requisito
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

BÁRBARA MARTINS LOPES

Vila Velha

Novembro de 2022


BÁRBARA MARTINS LOPES

**PROTOCOLO PARA CLASSIFICAÇÃO DE DANOS EM
EMBRIÕES DE OURIÇO-DO-MAR DA ESPÉCIE *Echinometra*
lucunter EXPOSTOS AO SULFATO DE ZINCO (ZnSO₄)**

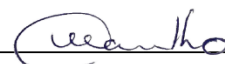
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Vila Velha, como requisito parcial de avaliação para a obtenção do Grau Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em 28 de novembro de 2022.

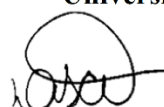
COMISSÃO EXAMINADORA:



Dra. Ana Carolina Srbe de Araujo
Universidade Vila Velha
Orientadora



Dra. Maria Araci Grapiuna de Carvalho
Universidade Vila Velha



Ma. Dandara Silva Cabral
Universidade Federal do Espírito Santo

Dedico aos meus pais, Simonete Martins de Oliveira e Admilson Lopes, que mesmo com tantas dificuldades sempre me incentivaram ao longo dos meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às políticas públicas de acesso à universidade que permitiram, por meio do ProUni (Programa Universidade Para Todos), o ingresso na Universidade Vila Velha, me tornando a primeira da minha família materna a concluir o ensino superior. Obrigada por me ajudarem a romper essa barreira.

À Dra. Ana Carolina Srbek de Araujo, minha orientadora, por ter acolhido a mim e ao meu projeto quando tudo estava muito incerto, me ensinado bastante ao longo deste ano, mesmo não sendo o seu campo direto de atuação. Gratidão também aos demais professores do curso de Ciências Biológicas que sempre estiveram disponíveis e empenhados a me ajudar.

Agradeço aos meus pais, Simonete Martins de Oliveira e Admilson Lopes, e às minhas irmãs, Rhanna Dalila Martins Lopes e Anna Kássia Martins Lopes, por todo o incentivo ao longo de minha jornada estudantil, por me suportarem nos momentos mais difíceis e ansiosos e também por celebrarem cada mínima vitória até aqui. Obrigada por tanta confiança e credibilidade.

Às minhas amigas, Pilsen Ca'líia da Costa Peterle e Silvia Gabriela Nascimento Agostinho, por termos formado o melhor trio do mundo. Valeu por todo o companheirismo, força, amor e amizade ao longo desses anos que perpassam os campos da universidade. Pilsen Ca'líia, agradeço demais a você pelas manhãs em campo fazendo coletas de ouriços-do-mar e por sempre deixar esse momento leve, mesmo com risco de se ralar todinha no costão rochoso.

Ao meu amigo e companheiro, Gabriel Moreira Mota, que nunca mediu esforços para me ajudar, sempre me escutando e me apoiando. Obrigada pela parceria.

À Fabíola Menezes, artista plástica, Mestre em Arte e Doutoranda em Ciências, por ter aceitado fazer as lâminas de ilustração científica sob a técnica da aquarela sobre papel. Isso fez total diferença e elevou a qualidade do meu trabalho.

À equipe do Laboratório de Ictiologia Aplicada (LAB-PEIXE) e principalmente à Dra. e amiga, Tatiana Miura Pereira, por todo o suporte que me foi dado e pela cooperação para que esse trabalho fosse concretizado. Os momentos vividos nesse espaço serão inesquecíveis.

Não menos importante, agradeço às membras da banca que aceitaram o convite para colaborar com o meu trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de desenvolvimento de larvas pluteus de *Echinometra lucunter* quando expostas a cinco concentrações de sulfato de zinco (ZnSO₄).9

Tabela 2. Classificação de danos das larvas pluteus de *Echinometra lucunter* quando expostas a cinco concentrações de sulfato de zinco (ZnSO₄).10

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Desenvolvimento larval da espécie *Echinometra lucunter*: óvulo (A), ovo fecundado (B), início da primeira clivagem (C); embrião com 2 células (D); embrião com 4 células (E, F); embrião com 8 células (G); Mórula (H); Blástula (I); Gástrula (J) e Larva pluteus (L) (Fonte: CEBimar Notícias - USP, 2008).6
- Figura 2.** *Grupo controle* - Presença de larvas pluteus saudáveis e bem desenvolvidas: (1) braços; (2) espículas calcárias; (3) boca; e (4) ânus. Taxa de desenvolvimento médio = $85,2 \pm 5,7$ embriões.11
- Figura 3.** *Grau 1* - À concentração 0,06 (ZnSO₄) mg/L, presença de larvas pluteus com redução parcial ou total dos braços: (1) braços; (2) espículas calcárias; (3) ânus; e (4) boca. Taxa de desenvolvimento médio = $61,0 \pm 6,9$ embriões.11
- Figura 4.** *Grau 2* - À concentração 0,13 (ZnSO₄) mg/L, presença de larvas estabilizadas na fase de prisma (pré-pluteus). A primeira ilustração à direita evidencia o organismo estabilizado em estágio de prisma avançado (início da formação de braços). As demais ilustrações demonstram organismos em fase inicial de prisma (ainda sem apresentar braços). Taxa de desenvolvimento médio = $39,3 \pm 21,6$ embriões.11
- Figura 5.** *Grau 3* - À concentração 0,19 (ZnSO₄) mg/L, presença de larvas com rompimento do ectoblasto e ocasionando liberação do conteúdo celomático: (5) ectoblasto; e (6) conteúdo celomático vazado. Taxa de desenvolvimento médio = $18,3 \pm 2,5$ embriões.12
- Figura 6.** *Grau 4* - À concentração 0,25 (ZnSO₄) mg/L, presença de formas larvais anômalas ao estágio de desenvolvimento embrionário da espécie *E. lucunter*, apresentando espículas calcárias e bolsa entero-celomática dispostas de forma inexata: (2) espículas calcárias; e (7) bolsa entero-celomática. Taxa de desenvolvimento médio = $9,8 \pm 4,2$ embriões.12
- Figura 7.** *Grau 5* - À concentração 0,50 (ZnSO₄) mg/L, presença de larvas sem conteúdo celomático e ocasionalmente com espículas calcárias dispostas aleatoriamente: (2) espículas calcárias; e (8) ausência de conteúdo celomático. Taxa de desenvolvimento médio = $1,5 \pm 1,1$ embrião.12

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT – NBR = Associação Brasileira de Normas Técnicas

KCL = Cloreto de Potássio

ZnSO₄ = Sulfato de Zinco

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1 Espécie em estudo	5
2.2 Coleta e acondicionamento dos organismos	6
2.3 Obtenção de Gametas	6
2.4 Bioensaio com gametas e embriões de <i>Echinometra lucunter</i>	7
2.5 Preparo de Solução Contaminante de Sulfato de Zinco (ZnSO ₄)	8
2.6 Análise de Dados	8
3. RESULTADOS	9
4. DISCUSSÃO	13
5. CONCLUSÃO	16
6. REFERÊNCIAS	17
APÊNDICE	20

RESUMO

LOPES, BÁRBARA MARTINS. Universidade Vila Velha - ES, novembro, 2022. **PROTOCOLO PARA CLASSIFICAÇÃO DE DANOS EM EMBRIÕES DE OURIÇO-DO-MAR DA ESPÉCIE *Echinometra lucunter* EXPOSTOS AO SULFATO DE ZINCO (ZnSO₄)**. Orientadora: Ana Carolina Srbek-Araujo.

No Brasil, a norma ABNT 15350/2006 estabelece parâmetros para avaliação dos efeitos tóxicos que determinado contaminante pode causar nos gametas e embriões de ouriço-do-mar da espécie *Echinometra lucunter*. Ela apresenta uma carta-controle com cinco concentrações de Sulfato de Zinco (ZnSO₄) que devem ser testadas junto com o contaminante em estudo, sendo aplicável a amostras de água marinha, estuarina e intersticial. O procedimento foi normatizado utilizando-se *E. lucunter* por ser um modelo biológico robusto e sensível para avaliar efeitos tóxicos de contaminantes ambientais. Contudo, a norma e a carta-controle oferecem apenas a classificação dos danos, sem detalhar as alterações observadas. O presente estudo objetivou determinar e descrever os danos causados ao desenvolvimento embrionário do ouriço-do-mar quando exposto a diferentes concentrações de ZnSO₄. Para isso, indivíduos de *E. lucunter* foram coletados em formação rochosa para extração de gametas e posterior fecundação. Os embriões foram expostos a seis tratamentos (concentração do contaminante: 0,00, 0,06, 0,13, 0,19, 0,25 e 0,50 mg/L) e o teste foi realizado em quintuplicatas para as concentrações testadas. Conforme esperado, o contaminante apresentou alto potencial tóxico no desenvolvimento embrio-larval, com redução do desenvolvimento das larvas pluteus à medida que a concentração de ZnSO₄ aumentou. Diferentemente dos trabalhos anteriores, foi obtido detalhamento das alterações observadas a cada concentração, sinalizando um avanço na descrição das classes e intensidade de danos causados ao desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*. À vista disso, o presente estudo fornece elementos para melhor suporte à avaliação dos efeitos do ZnSO₄ e outros contaminantes tóxicos sobre os organismos.

Palavras-chave: bioensaio, carta-controle, Echinoidea, Ecotoxicologia, embriologia.

ABSTRACT

LOPES, BÁRBARA MARTINS. Universidade Vila Velha - ES, November, 2022. **PROTOCOL FOR DAMAGE CLASSIFICATION ON EMBRYOS OF ROCK BORING URCHIN *Echinometra lucunter* EXPOSED TO ZINC SULFATE (ZnSO₄)**. Advisor: Ana Carolina Srbek-Araujo.

In Brazil, the standard ABNT 15350/2006 establishes parameters for evaluating the toxic effects that certain contaminant may cause to gametes and embryos of the sea-urchin species *Echinometra lucunter*. It presents a control chart containing five Zinc Sulfate (ZnSO₄) concentrations that must be tested along with the contaminant in analysis, that being applicable to sea, estuaries and interstitial water samples. This procedure has been standardized resorting *E. lucunter* in view of the fact that it is a sturdy and sensible model organism to evaluate toxic effect of environmental contaminants. However, both the standard and the control chart proffer merely the ordination of damages, not detailing the observed changes. The current study aimed to define and describe the damages on the sea-urchin's embryonic development when it's exposed to various ZnSO₄ concentrations. Therefore, 20 specimens of *E. lucunter* have been collected in rock formations in view of extracting gametes for further fertilisation. The embryos have been exposed to six treatments (contaminant concentration: 0.00, 0.06, 0.13, 0.19, 0.25 and 0.50 mg/L) and the test has been carried out in quintuplicate to the tested concentrations. As expected, the contaminant presented high toxic potential on the embryo-larval development, with decrease of the plutei larvae's development as the ZnSO₄ concentration increased. Unlike the earlier materials, it has been obtained details of the observed changes at each concentration, indicating an advance on the description of classes and intensity of the damages on the embryonic development of *E. lucunter*. Thus, the current study provides elements for the better basis to the evaluating of ZnSO₄ and other contaminants effects on organisms.

Keywords: bioassay, control chart, Echinoidea, Ecotoxicology, embryology.

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado em formato de artigo científico conforme normas da revista *Marine Environmental Research*.

Protocolo para classificação de danos em embriões de ouriço-do-mar da espécie *Echinometra lucunter* expostos ao sulfato de zinco (ZnSO₄)

Bárbara Martins Lopes^{a,b,*}, Tatiana Miura Pereira^b, Gustavo da Costa Peterle^a & Ana Carolina Srbek-Araujo^{a,c}

^a *Laboratório de Ecologia e Conservação de Biodiversidade (LECBio), Universidade Vila Velha, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, 29102-920, Vila Velha, ES, Brasil*

^b *Laboratório de Ictiologia Aplicada (LAB-PEIXE), Universidade Vila Velha (UVV), Vila Velha, ES, Brasil*

^c *Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Vila Velha, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, 29102-920, Vila Velha, ES, Brasil*

* Autora Correspondente. *Endereço de e-mail:* martinsbarbara22@gmail.com (B.M. Lopes)

1. Introdução

Manguezais, costões rochosos, recifes, lagoas costeiras e a própria plataforma continental acomodam ecossistemas singulares e ricos em vida marinha (Scavazzini, 2012; Dal Maso, 2012). Os ecossistemas marinhos saudáveis, além de abrigarem uma grande diversidade biológica, efetuam papel essencial na regulação da temperatura da Terra, na ciclagem de nutrientes e no provisionamento de alimentos para a população humana (Eklof, 2020). Não obstante, acumulam grandes quantidades de substâncias tóxicas oriundas das atividades humanas que estão comprometendo a saúde desses ambientes e de sua biodiversidade. A partir da década de 1970, a poluição do ambiente marinho passou a receber especial atenção em decorrência de incidentes marítimos de elevada magnitude, compreendendo especialmente petroleiros, que assolaram regiões costeiras dos Estados Unidos e de países da Europa. Desde então, inúmeras conferências foram realizadas para estabelecer normas e regras que buscam expandir a segurança da navegação e reduzir a poluição do ambiente marinho (Aslan, 2017).

Atualmente, somente 2,7% dos oceanos estão efetivamente protegidos (Sala, 2021). Este valor ainda é consideravelmente baixo, uma vez que a meta global estabelecida na Décima Conferência das Partes da Convenção das Nações Unidas sobre Diversidade

Biológica (COP10) era proteger 17% da área terrestre e 10% dos ambientes marinhos até 2020. Estudos realizados na Europa, por meio de banco de dados de macro lixo flutuante ribeirinho, evidenciaram que entre 307 e 925 milhões de itens de lixo são despejados anualmente no oceano. A fração plástica liderou com 82% do lixo observado, especialmente fragmentos e itens de uso único (por exemplo, embalagens, sacos e garrafas) (Gonzalez-Fernandez, 2021). Com isso, torna-se notório que, apesar de décadas de esforços para prevenir e reduzir a poluição marinha, o problema ainda é constante e continua a crescer, ressaltando assim a necessidade de estudos ecotoxicológicos para se conhecer os efeitos dos poluentes e fornecer informações para estabelecimento de medidas mitigatórias e de prevenção, além do desenvolvimento de materiais para uso em ações de educação ambiental (Abessa, 2018).

Os ouriços-do-mar possuem muitos aspectos relevantes que os tornam bons bioindicadores para estudos ecotoxicológicos. O primeiro aspecto relevante é o fato desses organismos serem, de forma geral, componentes-chave do ecossistema marinho, contribuindo com 90% da biomassa bentônica (Brusca & Brusca, 1990), além de executarem importantes papéis ecológicos por possuírem uma parte significativa de sua dieta baseada em vegetais (i.e., controlam a comunidade de macroalgas bentônicas associadas) (Lawrence, 1975). O segundo aspecto está associado ao fato dos ouriços serem predadores de segundo ou terceiro grau e, sendo assim, estão susceptíveis a processos de biomagnificação. O terceiro aspecto decorre do fato desses organismos apresentarem em sua constituição corporal um epitélio externo expandido pelo qual conseguem captar substâncias dissolvidas no ambiente, tornando-os mais sujeitos a captar poluentes disponíveis na água marinha (Candia Carnevali, 2005). Por fim, como quarto aspecto, cita-se que a biologia do desenvolvimento embrionário é bem caracterizada, sendo seus gametas e embriões já bem estudados e de fácil manipulação (Cameron, 2002).

De fato, os ouriços-do-mar, sobretudo a espécie *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758), são muito utilizados em estudos que avaliam o efeito de contaminantes. A título de exemplo, temos os estudos realizados por Pereira et al. (2018), com fração solúvel de óleo diesel (FSD); Campelo et al. (2017), com cloreto de cádmio (CdCl_2); Simões et al. (2017), com óleo essencial de *Lippia alba*; e Gaspar et al. (2013), com lama de cal, no qual também foi utilizado *Paracentrotus lividus* (uma outra espécie de ouriço-do-mar). No entanto, as respostas alcançadas nesses trabalhos, quanto ao nível de danos, relatam apenas aspectos gerais, como “desenvolvido ou não desenvolvido”, não havendo uma descrição do grau de desenvolvimento ou de danos observados no desenvolvimento embrio-larval.

No Brasil, estudos ecotoxicológicos com a espécie *E. lucunter* foram normatizados

pela ABNT NBR 15350/2006 (ABNT, 2006) pelo fato deste táxon ser comum ao longo da costa do país e representar um modelo biológico robusto e sensível para avaliar os efeitos biológicos de contaminantes ambientais. Este documento fundamenta-se em normas internacionais já existentes e tem como um de seus objetivos estabelecer parâmetros para avaliação dos efeitos tóxicos que um determinado contaminante pode causar nos gametas e embriões de *E. lucunter*. Para isso, a ABNT 15350/2006 determina as condições básicas e abióticas ideais para a extração de gametas e realização dos testes ecotoxicológicos, apresentando uma carta-controle com cinco concentrações de Sulfato de Zinco ($ZnSO_4$) que devem ser testadas junto com o contaminante a ser estudado, sendo aplicável a amostras de água marinha, estuarina e intersticial (ABNT, 2006). Assim, a partir dos resultados da carta-controle, pode-se testar a existência ou não de efeito do contaminante estudado nos embriões (i.e., viabilidade do gameta e embrião – larva pluteus). Contudo, a norma e a carta-controle oferecem apenas a classificação geral de danos (i.e. desenvolvidos ou não), sem o detalhamento das alterações ocorridas nos embriões. Desta forma, ainda não se tem descrita a classificação dos diferentes níveis de danos possíveis que podem ser ocasionados aos embriões de *E. lucunter* quando expostos a substâncias tóxicas, sendo esta uma informação importante e necessária para melhor avaliação do efeito dos contaminantes sobre os organismos.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo determinar e descrever os danos causados ao desenvolvimento embrionário do ouriço-do-mar *E. lucunter* quando exposto a diferentes concentrações de $ZnSO_4$.

2. Material e Métodos

2.1 Espécie em estudo

O desenvolvimento larval do *E. lucunter* possui cerca de 10 estágios (Figura 1). A partir do Óvulo (1), temos: Ovo fecundado (2); Início da primeira clivagem (3); Estágio embrionário com 2 células (4); Estágio embrionário com 4 células (5); Estágio embrionário com 8 células (6); Mórula (7); Blástula (8); Gástrula (9); e Larva pluteus (10) (Figura 1; CEBIMar, 2008). Estes serão os estágios utilizados como referência para avaliação do desenvolvimento de *E. lucunter* sem anomalias.

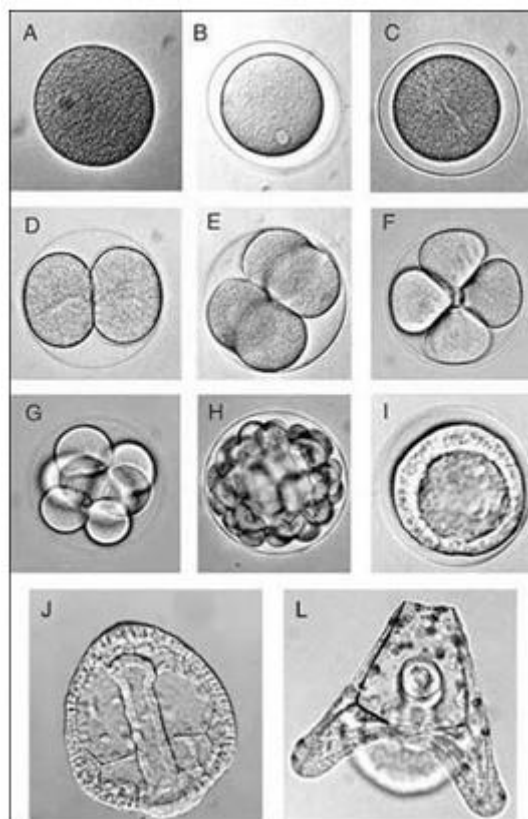


Figura. 1. Desenvolvimento larval da espécie *Echinometra lucunter*: óvulo (A), ovo fecundado (B), início da primeira clivagem (C); embrião com 2 células (D); embrião com 4 células (E, F); embrião com 8 células (G); Mórula (H); Blástula (I); Gástrula (J) e Larva pluteus (L) (Fonte: CEBimar Notícias - USP, 2008).

2.2 Coleta e acondicionamento dos organismos

Ouriços-do-mar da espécie *E. lucunter* foram coletados mensalmente em um costão rochoso localizado na Pedra da Sereia, no bairro Praia da Costa (20°20'02" S e 40°16'24" W), em Vila Velha (Espírito Santo), durante um período de seis meses (maio a outubro de 2021). Os indivíduos foram coletados durante a maré baixa e em seu período reprodutivo (ao final da lua crescente e início da lua cheia) (Mariante et al., 2009). A cada mês foram coletados 20 indivíduos para que pudesse ser obtido o mínimo de três fêmeas e três machos (ausência de dimorfismo sexual), número necessário para garantir a viabilidade gamética e consequente sucesso da fertilização. Após a coleta, os indivíduos eram imediatamente transferidos para o Laboratório de Ictiologia Aplicada (LAB-PEIXE - UVV) até o início do experimento.

2.3 Obtenção de gametas

A liberação de gametas foi realizada por meio da injeção de 2,5 mL de solução a 0,5

M de cloreto de potássio (KCl) em cada lado da boca dos indivíduos, na lanterna de Aristóteles, a fim de espalhar o KCl pela cavidade celomática e conseguir a liberação de gametas (ABNT, 2006). Logo após serem eliminados, os óvulos eram armazenados em béqueres (50 mL) contendo água do mar filtrada (um béquer para cada fêmea) e os espermatozoides eram armazenados em béqueres (20 mL) sem contato com água do mar e mantidos em gelo até o momento da sua ativação e início do bioensaio.

2.4 Bioensaio com embriões de Echinometra lucunter

Após a obtenção dos gametas, era observada a qualidade dos óvulos com o auxílio de um microscópio invertido (A:40x), sendo considerados óvulos perfeitos aqueles que possuíssem estrutura perfeitamente arredondada, de acordo com as normas da ABNT NBR 15350/2006 (ABNT, 2006). As amostras de óvulos eram então peneiradas (malha de 45 µm) para retenção de detritos e acondicionadas em um béquer com capacidade de 600 mL. Em seguida, o béquer era completado com água do mar a fim de se obter uma solução de óvulos. Logo após, eram adicionados 2,5 mL de água do mar ao líquido espermático previamente coletado para ativação dos espermatozoides. Em seguida, 1,5 mL do líquido espermático ativado era adicionado ao béquer contendo a solução de óvulos para que pudesse ocorrer a fecundação.

Após a fecundação (2 h após adição do líquido espermático ativado), 100 µL da nova solução eram adicionados a tubos de ensaio (20 mL) contendo as seguintes concentrações do contaminante: 0,00, 0,06, 0,13, 0,19, 0,25 e 0,50 mg/L (ABNT, 2006), sendo a ausência de contaminante o teste controle. As análises foram realizadas, para cada uma das concentrações testadas (controle e tratamentos), em quintuplicatas, considerando um total de seis desovas (uma desova unificada para cada mês de coleta), totalizando 180 amostras. Após a adição dos ovos aos tubos de ensaio, estes eram acondicionados em incubadora (B.O.D TE-391) com temperatura constante de 26°C (ABNT, 2006) e fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro por 36 h (tempo necessário para que ocorresse o desenvolvimento embrionário).

Depois de 36 h, o conteúdo de todos os tubos de ensaios era fixado com formaldeído a 0,5 mg/L (40%) para paralisação do desenvolvimento dos embriões. Os embriões eram então analisados para avaliar a taxa de desenvolvimento e a ocorrência de danos, bem como determinar as alterações representativas da exposição ao ZnSO₄ considerando cada concentração testada. A avaliação dos embriões foi feita com auxílio de microscópio invertido (A:40x) e câmara de Sedwick-Rafter. A taxa de desenvolvimento foi calculada considerando a média de embriões contabilizados (\pm desvio padrão) em cada réplica e mês de amostragem

para uma mesma concentração de contaminante. Os danos foram quantificados considerando a frequência de embriões com e sem danos em cada tratamento. Para que o bioensaio fosse considerado válido, a porcentagem de larvas pluteus bem desenvolvidas no grupo controle deve apresentar média ≥ 80 indivíduos, seguindo as normas da ABNT NBR 15350/2006 (ABNT, 2006).

Para estabelecimento da classificação das alterações, foi necessário um alto critério de observação avaliativa dos dados causados aos embriões, tendo sido realizado o uso de fotografias para documentação das observações, o que se mostrou essencial por se tratar de uma ferramenta comprovativa, além de contribuir para a comparação dos organismos em relação aos 10 estágios embrionários de *E. lucunter* (desenvolvimento normal). Desta forma, visando complementar a proposta apresentada na ABNT NBR 15350/2006 (ABNT, 2006), foi realizada a documentação fotográfica dos danos observados nas larvas pluteus expostas às diferentes concentrações de $ZnSO_4$ e as imagens representativas de cada classe de dano foram selecionadas para representação por meio de ilustração científica (aquarela sobre papel - Fabíola Veloso Menezes). As ilustrações foram empregadas na montagem de pranchas visando à melhor visualização das estruturas e da classificação proposta. As fotografias originais, a título de comparação com as ilustrações, são apresentadas ao final do trabalho (Apêndice).

2.5 Preparo de Solução Contaminante de Sulfato de Zinco ($ZnSO_4$)

Para preparo da solução padrão de $ZnSO_4$, 0,43 g do contaminante eram adicionados a balão volumétrico de 1 L. Realizada a adição, a solução era completada com água milli-q até atingir o menisco. Efetuados esses procedimentos, a solução era agitada por cerca de 3 minutos. A solução era armazenada por até 30 dias na geladeira, sendo retirada com antecedência para atingir a temperatura ambiente antes do bioensaio para não causar danos (choque térmico) aos embriões em início de desenvolvimento. Para obter as diferentes concentrações de $ZnSO_4$, foram utilizados cinco balões volumétricos com capacidade de 100 mL, que armazenaram os seguintes volumes do contaminante: 0, 60, 130, 190, 250 e 500 μ L, respectivamente. Esses volumes foram retirados da solução padrão, adicionados em seus respectivos balões e posteriormente completados com adição de água do mar, até que fosse atingido o volume de 100 mL.

2.6 Análise de Dados

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat 3.0. A diferença

entre as concentrações do contaminante em relação ao grupo controle (larvas pluteus sem danos) foi testada quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e em seguida foi realizada Regressão Linear. Nos dois casos, foi utilizado nível de significância de $p < 0,005$ (Pereira, 2018). Ao final das análises, foi gerada uma tabela com a taxa de desenvolvimento observada nas diferentes concentrações de $ZnSO_4$ (média e desvio padrão) e a identificação dos tipos de danos registrados em cada caso (descrição e grau de dano).

3. Resultados

Houve relação entre exposição ao $ZnSO_4$ e ocorrência de danos nos embriões de *E. lucunter*, sendo que quanto maior a concentração do contaminante, maior a ocorrência de alterações no desenvolvimento embrionário ($F = 13,6284$; $R^2 = 0,7164$; $P = 0,0219$). A taxa de desenvolvimento das larvas pluteus registrada durante o teste de desenvolvimento com exposição a $ZnSO_4/L$, de acordo com a concentração do contaminante, é apresentada a seguir (Tabela 1).

Tabela 1

Taxa de desenvolvimento de larvas pluteus de *Echinometra lucunter* quando expostas a cinco concentrações de Sulfato de Zinco ($ZnSO_4$).

[$ZnSO_4$] mg/L	Larvas pluteus desenvolvidas (média \pm DP)
0,00	85,2 \pm 5,7
0,06	61,0 \pm 6,9
0,13	39,3 \pm 21,6
0,19	18,3 \pm 2,5
0,25	9,8 \pm 4,2
0,50	1,5 \pm 1,1

Com base nos resultados obtidos, é apresentada a determinação dos danos causados por $ZnSO_4$ aos embriões de *E. lucunter* nas cinco classes de danos, as quais variaram de ausência

parcial ou total de braços, até embrião com danos totais (Tabela 2). As ilustrações representativas dos danos, considerando o grupo controle (ausência de dano) e as cinco concentrações de exposição ao ZnSO₄, também são apresentadas (Figs. 2 a 7).

Tabela 2

Classificação de danos causados às larvas pluteus de *Echinometra lucunter* quando expostas a cinco concentrações de Sulfato de Zinco (ZnSO₄).

[ZnSO ₄] mg/L	Classes de danos
0,00	Embrião normal - corpo integralmente desenvolvido (braços, espículas calcárias, boca e ânus) - ausência de dano.
0,06	Corpo parcialmente desenvolvido (espículas calcárias, boca e ânus), exceto pela ausência parcial ou total dos braços – dano médio-baixo: grau 1.
0,13	Desenvolvimento estabilizado na fase de prisma (pré-pluteus), podendo ser em estágio inicial (ausência de braços) ou em estágio de prisma avançado (início da formação de braços) - dano médio-intermediário: grau 2.
0,19	Rompimento do ectoblasto e consequente liberação do conteúdo celomático - dano médio alto: grau 3.
0,25	Bolsa entero-celomática dispersa no celoma e espículas calcárias dispostas aleatoriamente - dano alto: grau 4.
0,50	Embrião com dano total - ausência de conteúdo celomático e casualmente com espículas calcárias dispostas aleatoriamente: grau 5.

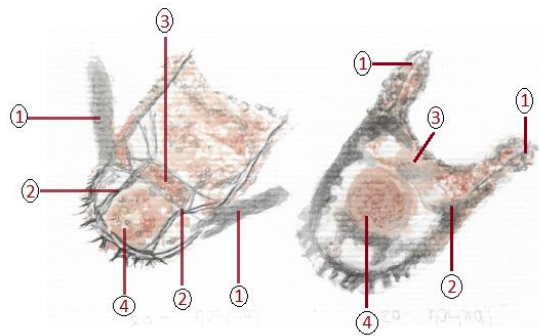


Figura 2. *Grupo controle* - Presença de larvas pluteus saudáveis e bem desenvolvidas: (1) braços; (2) espículas calcárias; (3) boca; e (4) ânus. Taxa de desenvolvimento médio = $85,2 \pm 5,7$ embriões.

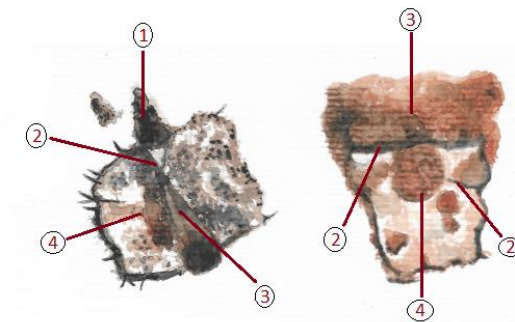


Figura 3. *Grau 1* - À concentração 0,06 ($ZnSO_4$) mg/L, presença de larvas pluteus com redução parcial ou total dos braços: (1) braços; (2) espículas calcárias; (3) boca; e (4) ânus. Taxa de desenvolvimento médio = $61,0 \pm 6,9$ embriões.

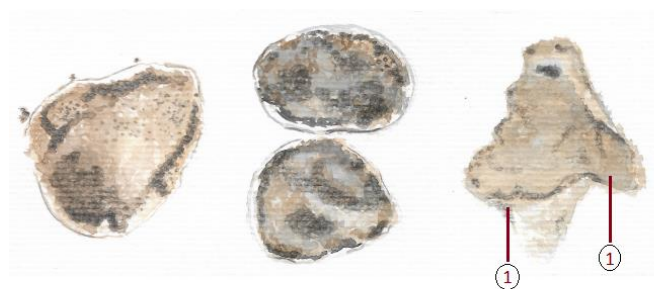


Figura 4. *Grau 2* - À concentração 0,13 ($ZnSO_4$) mg/L, presença de larvas estabilizadas na fase de prisma (pré-pluteus). A primeira ilustração à direita evidencia o organismo estabilizado em estágio de prisma avançado (início da formação de braços - 1). As demais ilustrações demonstram organismos em fase inicial de prisma (ainda sem apresentar braços). Taxa de desenvolvimento médio = $39,3 \pm 21,6$ embriões.

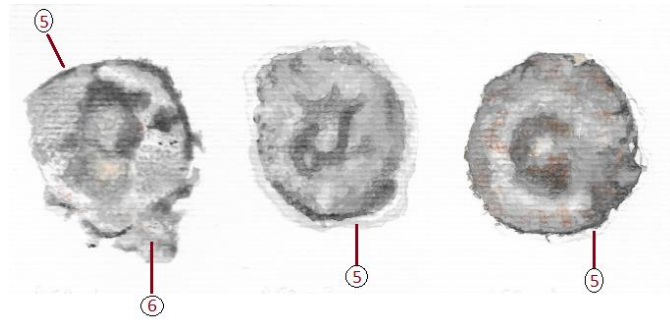


Figura 5. *Grau 3* - À concentração 0,19 (ZnSO₄) mg/L, presença de larvas com rompimento do ectoblasto e consequente liberação do conteúdo celomático: (5) ectoblasto; e (6) conteúdo celomático vazado. Taxa de desenvolvimento médio = $18,3 \pm 2,5$ embriões.

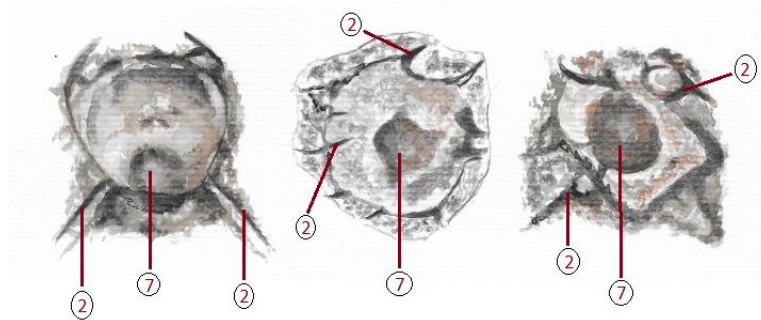


Figura 6. *Grau 4* - À concentração 0,25 (ZnSO₄) mg/L, presença de formas larvais anômalas ao estágio de desenvolvimento embrionário da espécie *E. lucunter*, apresentando espículas calcárias e bolsa entero-celomática dispostas de forma anormal: (2) espículas calcárias; e (7) bolsa entero-celomática. Taxa de desenvolvimento médio = $9,8 \pm 4,2$ embriões.

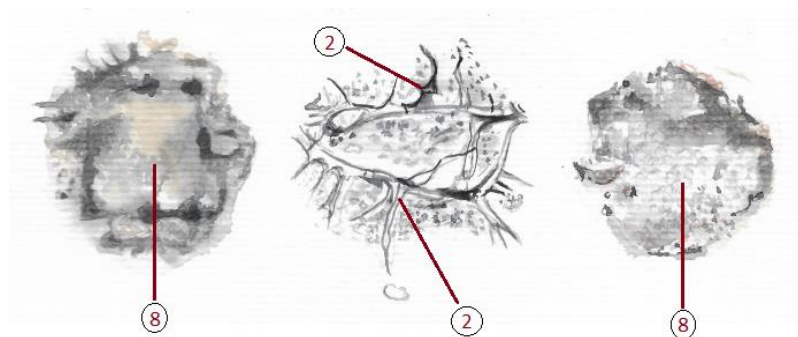


Figura 7. *Grau 5* - À concentração 0,50 (ZnSO₄) mg/L, presença de larvas sem conteúdo celomático e ocasionalmente com espículas calcárias dispostas aleatoriamente: (2) espículas calcárias; e (8) ausência de conteúdo celomático. Taxa de desenvolvimento médio = $1,5 \pm 1,1$ embrião.

4. Discussão

O desenvolvimento de ensaios ecotoxicológicos tornou-se um mecanismo muito importante na determinação da ocorrência de efeitos nocivos causados por contaminantes presentes no ambiente, principalmente os aquáticos. Com esse diagnóstico, viabiliza-se a projeção de decisões para o controle de despejo de efluentes em virtude do elevado risco ecológico que esses contaminantes podem ocasionar a partir de determinadas concentrações (Costa, 2008). O $ZnSO_4$ é um exemplo de metal não biodegradável, que pode ser transformado em vários compostos, às vezes com nível de toxicidade consideravelmente elevado em relação ao seu componente original, e que é incorporado ao ecossistema sem dificuldade, afetando diferentes parâmetros fisiológicos (Carvalho, 2017). Os resultados do presente estudo reiteram os impactos causados pelo $ZnSO_4$ sobre o desenvolvimento das larvas pluteus de *E. lucunter*. Embora exista uma quantidade significativa de trabalhos com diversos contaminantes envolvendo essa e outras espécies de ouriço-do-mar, os resultados relatados nos estudos anteriores consideram apenas aspectos gerais do dano, não havendo uma descrição do grau de alteração em cada fase do desenvolvimento embrio-larval, conforme apontado anteriormente. Neste sentido, a classificação proposta no presente estudo é inédita para o tipo de teste realizado, não se limitando ao relato da existência ou não de desenvolvimento do embrião, mas apresentando as particularidades que envolvem a alteração do desenvolvimento mediante exposição a diferentes concentrações do contaminante. Vale ressaltar que, devido a semelhanças embriológicas, é possível que a classificação de danos definida para *E. lucunter* possa se estender a estágios de vida iniciais de outras espécies de ouriços, bem como de outros organismos, como larvas de mexilhão da espécie *Perna perna* (Linnaeus, 1758).

Os resultados obtidos demonstraram que as larvas pluteus de *E. lucunter* sofreram diferentes intensidade de dano conforme os níveis de contaminantes aos quais foram expostos. O grupo controle, conforme o esperado, resultou em larvas pluteus sadias, estando aptas para completar o desenvolvimento embrionário e vir a se tornar um adulto (Gilbert, 2019), indicando a confiabilidade do experimento. Ressalta-se que este grupo teve uma média de desenvolvimento igual a 85,2 embriões, reforçando a qualidade do experimento, uma vez que a ABNT (2006) determina o limite de ≥ 80 indivíduos para que o teste seja validado. A partir da primeira concentração de contaminante utilizada durante o estudo (0,06 mg/L), as larvas mostraram o primeiro conjunto perceptível de alterações, às quais estiveram associadas ao desenvolvimento dos braços. Isto posto, sugere-se que os folhetos embrionários ectoblasto

(revestimento externo) e endoblasto (revestimento do arquêntero) não tenham sido diretamente afetados. Contudo, pode ter havido alteração no terceiro folheto embrionário, conhecido como mesoblasto (mesênquima), que fica interposto entre os dois folhetos anteriores. Neste sentido, sugere-se que o contaminante tenha causado danos às células mesodérmicas responsáveis por secretar carbonato de cálcio e garantir a constituição das espículas calcárias do endoesqueleto da larva, possibilitando a posterior formação dos braços do embrião (Vanderley, 2012). Esse nível de exposição resultou na redução de aproximadamente 28,4% na taxa de desenvolvimento dos embriões, em comparação com o grupo controle, não tendo sido letal para a maior parte dos embriões, embora tenha interferido no desenvolvimento dos braços de todas as larvas desenvolvidas.

Por outro lado, as larvas expostas a concentrações maiores apresentaram alterações gradativamente mais severas em seu desenvolvimento embrionário, evidenciando que, quanto maior o nível de contaminante, maior será o dano. Além disso, a proporção de embriões afetados também aumentou com o aumento da concentração do contaminante, reforçando seu efeito nocivo sobre as larvas. Apoiado nisso, citam-se as larvas expostas a 0,13 mg/L que tiveram seu desenvolvimento paralisado na fase de prisma. Esse estágio, nos ouriços-do-mar, é conhecido como pré-pluteus por tratar-se da transição entre o estágio de gástrula e a larva pluteus. A partir da fase de prisma, portanto, inicia-se o desenvolvimento, por exemplo, dos braços da larva (Gilbert, 2003). Assim, mais uma vez, o dano causado pelo contaminante parece estar associado ao mesoblasto por ser este o principal folheto envolvido na formação dos braços, completando a transição entre os estágios prisma-pluteus. Uma vez que o $ZnSO_4$ à 0,13 mg/L interrompeu o desenvolvimento da larva no estágio de prisma, o contaminante nesta concentração parece ser nocivo a etapas específicas do processo de gastrulação, ou seja, é prejudicial à diferenciação dos folhetos embrionários responsáveis pela origem dos componentes estruturais do embrião, bem como das estruturas que serão derivadas deles. Ressalta-se que a exposição a essa concentração de contaminante reduziu a taxa de desenvolvimento dos embriões em 53,9%, em comparação com o grupo controle, e todas as larvas apresentaram desenvolvimento incompleto.

As larvas expostas a 0,19 mg/L apresentaram ocasional rompimento da estrutura corporal externa (ectoblasto). O ectoblasto rompido tem como consequência imediata a liberação do conteúdo celomático, interrompendo a individualização vesicular (processo que ocorre na gastrulação), que é responsável por dividir o arquêntero da larva e, assim, formar as estruturas que irão constituir o seu celoma (Smith, 1993). O celoma integra estruturas vitais para o organismo e, em decorrência das alterações citadas, a concentração 0,19 mg/L revelou-

se muito crítica e danosa ao embrião. Na literatura, ainda não se tem descrito os danos, de forma geral, que o $ZnSO_4$ pode causar ao ectoblasto de invertebrados, como o *E. lucunter*, que justificasse o rompimento. Entretanto, ao que tudo indica, o contaminante utilizado parece impedir a proliferação ativa das células do ectoderma, enfraquecendo a sua estrutura e tornando-o mais propício ao rompimento, uma vez que as células provenientes deste folheto formam o ectoblasto (Vanderley, 2012). Quanto às demais larvas que não apresentaram rompimento do ectoderma, as observações realizadas sugerem que estavam no estágio de gastrulação, devido à presença de folhetos embrionários que se originam nessa etapa, contudo, não foi possível distinguir quais modificações específicas eles podem ter sofrido e que resultaram na paralisação do desenvolvimento. Neste sentido, a paralisação do processo de gastrulação foi o principal dano observado, resultando no desenvolvimento incompleto dos indivíduos. Nessa concentração, a taxa de desenvolvimento foi ainda menor, com redução de 78,5% em comparação com o controle, e nenhum indivíduo apresentou desenvolvimento integral.

Acerca das larvas expostas a 0,25 mg/L, essas também apresentaram interrupção do desenvolvimento embrionário, com destaque para a presença de formas larvais com desenvolvimento anômalo, isto é, larvas com características consideradas “não normais” em relação aos estágios de desenvolvimento embrionário da espécie *E. lucunter*. Um exemplo disso seria a alteração da disposição da bolsa entero-celomática, que é uma estrutura ocorrente na pré-formação da boca e do ânus (Gilbert, 2019). Esta estrutura ficou dispersa no celoma da larva, interferindo no desenvolvimento do tubo digestivo, tornando-o incompleto. Não obstante, as espículas calcárias dos indivíduos estavam dispostas de forma aleatória. Estas deveriam estar posicionadas nas adjacências do blastóporo, conforme sinaliza a descrição embriológica desse organismo (Gilbert, 2003). Esse tipo de ocorrência influencia diretamente na sustentação do corpo da larva pluteus (Vanderley, 2012). Assim, as alterações citadas evidenciam que essa concentração de $ZnSO_4$ traz consequências críticas, tanto para estruturas formadas pelos macrômeros, possivelmente devido ao comprometimento do processo de clivagem, quanto para aquelas formadas pelos micrômeros, que são responsáveis pela formação das espículas calcárias (Vanderley, 2012). Esse nível de exposição resultou em uma redução de cerca de 88,5% na taxa de desenvolvimento dos embriões, em comparação com o grupo controle, e todos apresentaram anomalias graves em seu desenvolvimento. Por último, as larvas expostas a 0,50 mg/L apresentaram danos extremamente severos, como a ausência integral de estruturas. Sem evidência de vitalidade, esse nível de concentração foi gravemente letal aos indivíduos expostos. Neste grau, a redução da taxa de desenvolvimento foi de 98,2%,

comparativamente ao controle, e todas as larvas detectadas evidenciaram ausência total de desenvolvimento ou a formação de espículas calcárias.

Embora alguns metais pesados, como o zinco, sejam vistos como elementos essenciais aos processos biológicos, pois são absorvidos diretamente da água ou indiretamente por meio da cadeia alimentar (Karan et al., 1998; McGeer et al., 2000), em concentrações elevadas podem se tornar tóxicos e letais, a exemplo do evidenciado com ouriços-do-mar e outros organismos aquáticos (Romani et al., 2003). Este processo pode ser agravado pela ocorrência de biomagnificação, que é o processo de acumulação progressiva de um elemento ou composto (inorgânico ou orgânico) ao longo da cadeia alimentar (Zagatto e Bertolotti, 2008). Com isso, pode ocasionar efeitos letais e subletais sobre outros organismos, como alterações no desenvolvimento, crescimento, reprodução e respostas imunológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (Rand & Petrocelli, 1985). Assim sendo, por meio do melhor entendimento dos danos que o $ZnSO_4$ pode provocar aos organismos, o presente estudo também contribui para o aperfeiçoamento de programas de monitoramento ambiental e definição de políticas públicas relacionadas, por exemplo, ao estabelecimento dos limites mínimos aceitáveis de concentração de poluentes, visando a redução dos impactos que esses resíduos podem ocasionar quando inadequadamente despejados no ambiente. Ressalta-se ainda que é de grande urgência compatibilizar o atendimento das necessidades sociais e econômicas do ser humano, incluindo sua saúde e bem-estar, com as necessidades de preservação do ambiente, de modo que se assegure a permanência das espécies e das condições de vida na Terra para as gerações presentes e futuras.

5. Conclusão

O $ZnSO_4$ apresentou alto potencial tóxico ao desenvolvimento embrio-larval de *E. lucunter*, com redução do desenvolvimento e comprometimento diferenciado das larvas pluteus à medida que a concentração do contaminante aumentou. Diferentemente dos trabalhos anteriores, foi realizado detalhamento das alterações observadas a cada concentração, representando um avanço na descrição das classes e intensidade de danos causados ao desenvolvimento embrionário da espécie estudada. Entretanto, sugere-se a realização de estudos complementares para investigar quais são as alterações específicas causadas pelo $ZnSO_4$ às células, tecidos e folhetos embrionários de *E. lucunter*, auxiliando no melhor entendimento do efeito deste contaminante sobre o organismo. O presente estudo contribui com um melhor suporte para futuros estudos envolvendo esse e outros contaminantes tóxicos, uma vez que apenas determinar se o embrião foi ou não desenvolvido

traz um caráter superficial à análise. Vale salientar ainda que, devido a semelhanças embriológicas, é possível que a classificação de danos aqui definida para *E. lucunter* possa se estender a estágios de vida iniciais de outros organismos, ampliando a aplicabilidade do procedimento proposto.

6. Referências

- Abessa, D., et al., 2018. Pollution status of marine protected areas worldwide and the consequent toxic effects are unknown. *Environmental Pollution*, São Paulo, pp. 243, Part B.
- ABNT, 2006. ABNT NBR 15350.2006: Aquatic Ecotoxicology — Chronic short-term toxicity — Test method with sea urchin (Echinodermata: Echinoidea).
- Aslan, F. J., et al., 2017. Pollution of the marine environment: a brief overview of principles, legal instruments and brazilian legislation. *Amazon Planet: International Journal of Environmental Law and Public Policy*. Amapá, v. 9, pp. 175-186.
- Brusca, R.C., Brusca, G.J., 1990. Phylum echinodermata. In: *Invertebrates*. Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts, pp. 801-839.
- Cameron, R.A., 2002. Sea urchin developmental genetics and culture. In Matranga Smolenicka (eds) *The Sea urchin: from basic biology to aquaculture*. Swets and Zeitlinger, Lisse, pp. 31-36.
- Candia Carnevali, M.D., 2005. Regenerative response and endocrine disrupters in Crinoid echinoderms: an old experimental model, a new ecotoxicological test. In: Matranga V (ed) *Echinodermata, progress in molecular and subcellular biology, subseries marine molecular biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 167-199.
- Campelo, C.M.A., et al., 2017. Bioprospecting of benthic macroinvertebrates for ecotoxicological assays of marine and estuarine sediments. *Hydrology Laboratory Bulletin, Maranhão*, v. 27, pp. 1.
- Carvalho, M.M., et al., 2017. Study of metals toxicity (zinc and cadmium) to *Ceriodaphnia dubia*, for multi-exposition and biological recovery of offspring. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, São Paulo, v. 22, n. 05, pp. 961-968.
- Costa, C.R., et al., 2008. Toxicity in aquatic environments: discussion and evaluation methods. *Química Nova*, São Paulo, v. 31, pp. 7.
- Eklöf, J.S., et al., 2020. A spatial regime shift from predator to prey dominance in a large coastal ecosystem. *Communications Biology*, Stockholm, v. 3, pp. 459.
- Gaspar, N., et al., 2013. Assessment of the toxicity of lime dams on the *Paracentrotus lividus*

- sea apparatus (Lamarck, 1816). Prospects for new industrial residential applications. *Journal of the Research, Santarém*, pp. 82-102.
- Gilbert, S. F., 2003. *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Massachusetts, v. 5, pp. 918.
- Gilbert, S.F., et al., 2019. *Developmental Biology - Animals considered as study models in Embryology and Developmental Biology*. Sinauer Associates, v. 11, pp. 181-189.
- González-Fernández., et al., 2021. Floating macrolitter leaked from Europe into the ocean. *Nature Sustainability, Puerto Real*, v. 4, pp. 474–483.
- Karan, V., Vitorovic, S., Tutundzic, V., Poleksic, V., 1998 Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. *Ecotoxicology and Environmental Safety, New York*, v. 40, pp. 49-55.
- Lawrence, J.M., 1975. On the relationship between marine plants and sea urchins. *Oceanography and Marine Biology, Detroit*, v. 13, pp. 213-286.
- Mariante, F.L.F., et al., 2009. Reproductive Biology of *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) na Praia da Costa, Vila Velha, Espírito Santo. *Zoologia, Curitiba*, v. 26 (4), pp. 641–646.
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., Mcdonald, D.G., Wood, C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology, Amsterdam*, v. 50, pp. 231-243.
- Sala, E., et al., 2021. Protecting the global ocean for biodiversity, food and climate. *Nature, Washington*, v. 592, pp. 397-400.
- Scavazzini, C.R.M.F., et al., 2012. Rio+20: Oceans, seas and coastal areas. Brasília: Boletim do Legislativo, Brasília, v. 17, pp. 7.
- Simões, L.N., et al., 2018. *Lippia alba* essential oil as a sedative and anesthetic for the sea urchin *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758). *O Manancial - Repositório Digital da UFESM, Santa Maria*, pp. 21-28.
- Smith, M.J., et al., 1993. The phylogeny of echinoderm classes based on mitochondrial gene arrangements. *Journal of Molecular Evolution, Burnaby*, v. 36, pp. 545-554.
- Pereira, T.M., et al., 2018. Effects of the water-soluble fraction of diesel oil (WSD) on the fertilization and development of a sea urchin (*Echinometra lucunter*). *Ecotoxicology and Environmental Publisher Elsevier, Vila Velha*, v. 162. pp - 59,62.
- Rand, G.M., Petrocelli, S.R., 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Hemisphere Publishing Corporation, Washington, pp. 666.
- Romani, R., et al., 2003 Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus*

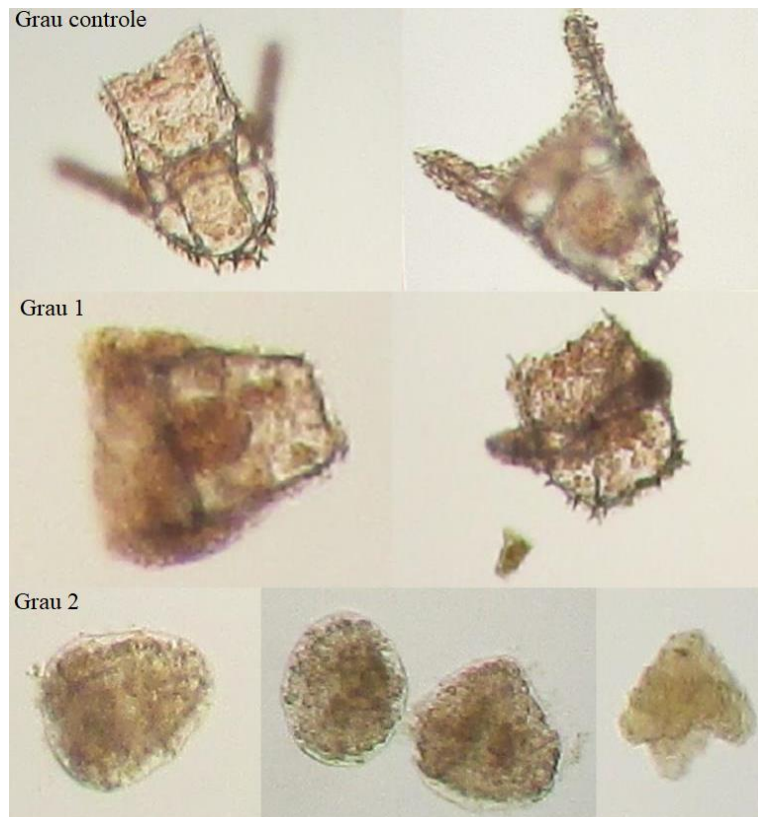
auratus exposed to sublethal copper concentrations. *ChemicoBiological Interactions*, Amsterdam, v. 145, pp. 321-329.

Vanderley, C.S.B.S., Santana, I.C.H., 2012. *Comparative Animal Histology and Embryology. Desenvolvimento de Peixes*, Fortaleza, v. 2, pp. 65-68.

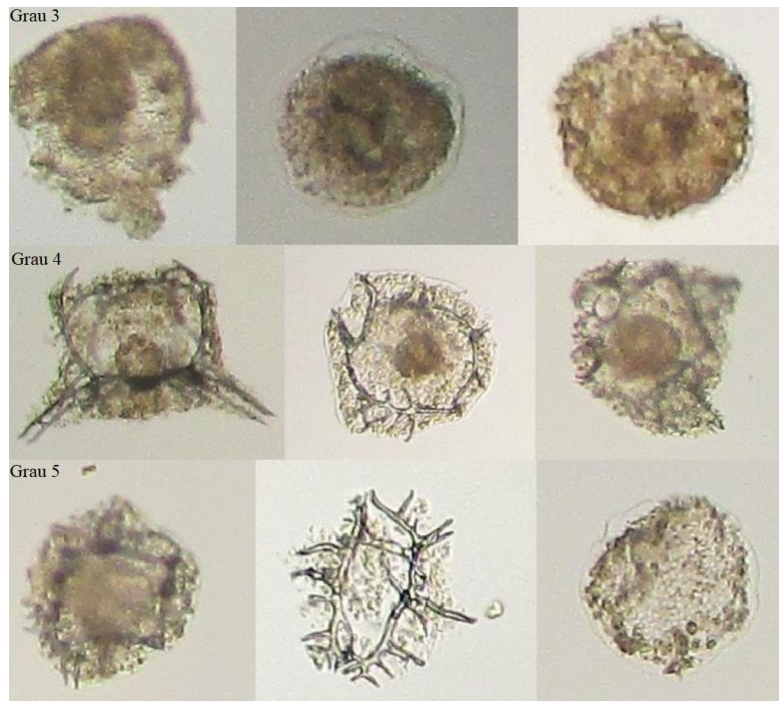
Zagatto, P.A., Bertoletti, E., 2008 *Ecotoxicology Aquatic – Princípios e Aplicações*. São Carlos: Rima, v. 2, pp. 486.

Apêndice

Fotografias originais utilizadas como modelo para a realização das ilustrações científicas apresentadas no presente trabalho.



Apêndice A. Fotografias originais utilizadas como modelo para ilustração científica do grupo controle e dos danos de grau 1 e 2.



Apêndice B. Fotografias originais utilizadas como modelo para ilustração científica dos danos de grau 3, 4 e 5.