

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE DIURON EM ESPERMATOZÓIDES DE ZEBRAFISH (DANIO RERIO)

MARCIANA RUBIRA DA SILVA MACIEL¹; FERNANDA EMANUELE BARRETO DE OLIVEIRA²; CAROLINA VIEGAS PINTO³; IZANI BONEL ACOSTA⁴; CARINE DAHL CORCINI⁵; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – marcianamaciel@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – fernandaemanuelebarreto@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – carolina18@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – izanebonel@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – corcincd@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – varelaejas@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa o terceiro lugar no ranking mundial de uso de agrotóxicos, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China, conforme dados da FAO de 2022. Além disso, de acordo com o último censo agropecuário de 2017 do IBGE, constatou-se que 32% das propriedades rurais brasileiras faziam uso desses produtos, representando um aumento de 20,5% em relação ao censo de 2006.

Aplicação indiscriminada de fertilizantes e herbicidas nas lavouras contribui para a contaminação do solo, resultando na liberação desses compostos para cursos d'água através de escoamento superficial e lixiviação (PARK et al., 2017). Além do uso na agricultura, esses herbicidas e biocidas são frequentemente empregados como algicidas e anti-incrustantes em tintas para embarcações e estruturas marinhas, apesar das evidências de sua toxicidade para diversas espécies marinhas (DINIZ et al., 2014).

O biocida Diuron, devido à sua alta solubilidade em água (42 mg/L) e longa meia-vida aquática de fotólise, é frequentemente detectado em rios, córregos, lagos e água do mar estando presente em vários ambientes aquáticos (), afetando peixes de diversas espécies (FOLADOR et al., 2010; AKCHA et al., 2021).

Os peixes desempenham um papel crucial em testes de toxicidade para avaliar os impactos ecológicos, sendo importantes modelos de biomonitoramento devido à sua capacidade de capturar e acumular contaminantes aquáticos. Além disso, eles possuem uma ampla diversidade taxonômica e funcional e ocupam diferentes níveis tróficos nos ecossistemas aquáticos (DI GIULIO e HINTON, 2008). No entanto, apesar dos estudos sobre a toxicidade do Diuron terem sido conduzidos em diversos organismos invertebrados, há uma escassez de dados sobre a toxicidade espermática em peixes.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar a toxicidade de diferentes concentrações de Diuron nas células espermáticas da espécie de peixe zebrafish (*Danio rerio*).

2. METODOLOGIA

Para a realização deste estudo preliminar, foram selecionados cinco machos do Laboratório de Ictiologia da Universidade Federal de Pelotas. Esses indivíduos passaram por um período de aclimatação de 15 dias em aquários de 20 litros, contendo água potável, desclorada, com aeração constante, temperatura de 23 ± 2,0°C, salinidade ≥ 0,5 (água doce), foto período 12C/12E, e alimentados com ração

comercial, duas vezes ao dia. Ao final do experimento, os peixes serão eutanasiados através de choque térmico – gelo, procedimento este aprovado no Comitê de Ética da UFPel sob número 7836.

Após a coleta do semen as amostras foram acondicionadas individualmente em tubos Eppendorf contendo 1,5 ml de solução de lavagem Beltsville Thawing Solution (Varela et al., 2012) com pH ajustado para 7,4 e osmolaridade de 360 mOsm. Em seguida, as gônadas foram seccionadas para facilitar a liberação dos espermatozoides. Para cada amostra de sêmen, foram adicionadas sete diferentes concentrações de Diuron, em proporção 1:1 (v/v). As concentrações utilizadas foram 0 mg/L (grupo controle, com apenas a solução Beltsville Thawing Solution), 0,01 mg/L, 0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 5 mg/L e 10 mg/L de Diuron. As amostras foram então incubadas a uma temperatura de 25°C por um período de 10 minutos, uma vez que essa temperatura está dentro da faixa de sobrevivência conhecida para os peixes, que varia de 18 a 26 °C (Froese & Pauly, 2014). Vale ressaltar que temperaturas superiores a 22 °C podem ter efeitos prejudiciais na sobrevivência dos espermatozoides.

A análise dos parâmetros estruturais e bioquímicos dos espermatozoides foi realizada por meio da citometria de fluxo utilizando um equipamento Attune® da Life Technologies. Foram avaliados diversos parâmetros, incluindo a integridade da membrana plasmática, a funcionalidade da mitocôndria, a fluidez da membrana plasmática, a integridade do DNA, a lipoperoxidação lipídica e a presença de espécies reativas de oxigênio.

Os resultados deste estudo foram descritos utilizando medidas descritivas, como a média e o erro padrão da média, para cada variável dependente, que incluem a fragmentação do DNA, a fluidez e integridade da membrana, a presença de espécies reativas de oxigênio, a funcionalidade mitocondrial, a motilidade total dos espermatozoides e a peroxidação lipídica. Foi realizado um teste de normalidade (teste Shapiro-Wilks) para todas as variáveis dependentes, e as análises estatísticas serão conduzidas utilizando o software Statistix® 2009.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo preliminar fornecem informações valiosas sobre os efeitos do Diuron nos espermatozoides de zebrafish (*Danio rerio*). Notavelmente, a peroxidação lipídica (LPO) não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sugerindo que a ruptura celular dos espermatozoides expostos ao Diuron não ocorre principalmente por meio do processo de lipoperoxidação.

Um aspecto interessante observado nos resultados foi a variável de espécies reativas de oxigênio (ROS), onde a análise indicou uma diminuição no número de células viáveis e um aumento no número de células rompidas. Isso sugere que a exposição ao Diuron pode levar a um aumento na produção de ROS, o que, por sua vez, pode contribuir para a ruptura celular. Essa descoberta é consistente com pesquisas anteriores que relataram efeitos genotóxicos do Diuron em outros organismos, como o estudo de AKCHA et al. (2012) em ostras. Esses resultados destacam a importância de entender como o Diuron afeta a homeostase oxidativa das células germinativas dos peixes.

A análise da funcionalidade da membrana e da viabilidade mitocondrial revelou diferenças estatisticamente significativas em várias concentrações de Diuron. Especificamente, as concentrações de 0,01 mg/L e 1 mg/L demonstraram um impacto significativo na funcionalidade da membrana, enquanto a viabilidade

mitocondrial foi afetada em concentrações de 0,01 mg/L, 0,1 mg/L, 5 mg/L e 10 mg/L. Esses resultados indicam que o Diuron pode comprometer a integridade da membrana e a função mitocondrial dos espermatozoides, o que pode ser prejudicial para a capacidade reprodutiva dos peixes.

É importante ressaltar que a ruptura celular parece ter um efeito amplamente observado nas diferentes dosagens de Diuron analisadas. Esse fenômeno pode ter implicações significativas na capacidade de fertilização dos espermatozoides e, conseqüentemente, na reprodução desses peixes. Além disso, os achados deste estudo são consistentes com outras pesquisas que demonstraram efeitos adversos de herbicidas, como o Roundup WG, na qualidade das células germinativas de *Danio rerio* (NEZZI, 2019).

Tabela-1. Resultados preliminares dos efeitos do Diuron em espermatozoides de zebrafish (*Danio rerio*)

VARIÁVEIS ANALISADAS	GRUPO CONTROLE	DOSAGENS DE DIURON ANALISADAS					
	BTS	0,01 mg/L	0,1mg/L	0,5 mg/L	1 mg/L	5 mg/L	10 mg/L
LPO	91,43 ± 1,57 ^A	88,69 ± 2,68 ^A	85,81 ± 3,60 ^A	91,51 ± 1,56 ^A	87,11 ± 2,77 ^A	83,64 ± 2,68 ^A	93,35 ± 1,57 ^A
ROS	8317,4 ± 68,4 ^A	8294,6 ± 58,41 ^{AB}	8055,2 ± 60,84 ^{ABC}	7857,4 ± 63,63 ^{ABC}	7769,4 ± 105 ^{BC}	7568,0 ± 211 ^C	7784,4 ± 181 ^{BC}
fumemvia	24,18 ± 4,82 ^A	40,73 ± 7,38 ^B	29,20 ± 4,71 ^A	29,87 ± 5,04 ^A	36,55 ± 6,22 ^B	23,41 ± 3,53 ^A	25,21 ± 2,39 ^A
mitoviave	14,82 ± 0,69 ^A	11,35 ± 0,35 ^B	12,07 ± 0,56 ^B	14,50 ± 0,72 ^A	14,89 ± 1,25 ^A	12,84 ± 0,69 ^B	12,07 ± 0,76 ^B
ruptura	18,44 ± 1,33 ^B	30,03 ± 3,94 ^{AB}	28,08 ± 3,28 ^{AB}	39,23 ± 3,37 ^A	35,05 ± 2,96 ^A	40,70 ± 2,06 ^A	32,88 ± 3,73 ^A

LPO – peroxidação lipídica; ROS - espécie reativa de oxigênio do espermatozoide (células viáveis); fumemvia – funcionalidade de membrana viável; mitoviave – mitocôndria viável; ruptura – ruptura de membrana

4. CONCLUSÕES

Conclui-se com este trabalho que o Diuron afeta os espermatozoides de zebrafish, por meio da ruptura celular, em todas as dosagens deste herbicida empregadas neste estudo, sugerindo que essa substância afete a reprodução e perpetuação dessa espécie quando em contato com esse herbicida.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKCHA F., SPAGNOL C., ROUXEL J. (2012) Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquat Toxicol* 106: 104-113, DOI:10.1016/j.aquatox.2011.10.018.

AKCHA, F.; BARRANGER, A.; BACHÈRE, E., (2021). Genotoxic and epigenetic effects of diuron in the Pacific oyster: in vitro evidence of interaction between DNA damage and DNA methylation. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, p. 8266-8280, 2021.

CORRÊA, Cristina Elena de Souza (2016). Aspectos histológicos de gônadas e fígado de *Danio rerio* como potenciais biomarcadores indicativos de atuação de interferentes endócrinos do pesticida Chlorantraniliprole. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

DI GIULIO, R.T., & HINTON, D.E. (Eds.). (2008). *The Toxicology of Fishes* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203647295>.

DINIZ, L. G. R. et al., (2014). First Appraisal of Water Contamination by Antifouling Booster Biocide of 3rd Generation at Itaqui Harbor (São Luiz - Maranhão - Brazil). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(2), 380–388. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130289>.

FAO. (2022). **FAO Soils Portal**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/soils-portal/about/all-definitions/en/>

FELÍCIO, A. A., et al., (2018). Isolated and mixed effects of diuron and its metabolites on biotransformation enzymes and oxidative stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 149, 248–256. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.12.009.

FOLADOR, Alexandre et. al, (2019). Qual o impacto do uso de herbicidas para anfíbios? Avaliação da sensibilidade de anfíbios aos efeitos letais de herbicidas. *Jornada de iniciação científica e tecnológica*, v. 1, n. 9, 2019.

FROESE, R; PAULY, D. 2014. FISHBASE- World Wide Web electronic publication. <http://www.fishbase.org>.

IBGE. (2017). IBGE, 2017. IBGE - Censo Agro 2017. <https://censoagro2017.ibge.gov.br//2013-agencia-de-noticias/releases/25789censo-agro-2017-populacao-ocupada-nos-estabelecimentos-agropecuarios-cai-8-8.html>

NEZZI, LUCIANE. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2019.

Oliveira, J., Lima, A., Minini, D., & Silva, E. (2018). Usos, efeitos e potencial tóxico dos agrotóxicos na qualidade do solo. *Agrarian Academy*, 5(9). https://doi.org/10.18677/Agrarian_Academy_2018a45.

PARK, J. et al. Comparing the acute sensitivity of growth and photosynthetic end points in three *Lemna* species exposed to four herbicides. *Environmental Pollution*. V. 220, p. 818-827, 2017.

VARELA et al., 2012 - Characterisation, expression and ontogeny of interleukin-6 and its receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental and comparative immunology* 37(1): 97-106.