

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DIQUAT EM EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA

TATIANA ROVANI ^{1*}, ALINE POMPERMAIER ², JENIFER EDUARDA LUTEREK ³,
CRISTINA BRIDI ³, FLÁVIA BERNARDO CHAGAS ⁴, EMELY CARLA DOS
SANTOS ⁵, PAULO AFONSO HARTMANN ⁶, MARILIA HARTMANN ⁷

1 Introdução

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um organismo modelo amplamente utilizado em diversas áreas de estudo, incluindo a ecotoxicologia, afim de avaliar a toxicidade de diferentes compostos em organismos não-alvo (Tamagno *et al.*, 2023; Fortuna *et al.*, 2024). Além disso, compartilha uma variedade de genes com outros vertebrados, possuindo 70% do genoma semelhante ao dos humanos (Howe *et al.*, 2013), tornando-o um excelente modelo para estudos translacionais. A fase embrionária do peixe-zebra é particularmente interessante, pois permite compreender se as exposições durante o período de organogênese são capazes de alterar o desenvolvimento e comprometer funções essenciais da vida do animal.

Nessa linha, o peixe-zebra vem sendo muito utilizado para estudos com pesticidas, pois é inevitável a sua presença nos recursos hídricos, tendo em vista as formas de aplicação, que em alguns casos inclusive é diretamente na água (Kuehne; Heimer, 2023). Além disso, reforçando esse contexto, o Brasil é líder no mercado mundial de agrotóxicos e relatórios recentes do IBAMA mostram que entre os agrotóxicos mais utilizados estão os herbicidas (IBAMA, 2024), o que torna crucial a investigação dos efeitos dessas substâncias sobre os organismos não-alvo. Dentre os agrotóxicos mais utilizados no país está o diquat, que é um herbicida não seletivo, frequentemente usado como alternativa ao Paraquat após seu banimento no Brasil em 2021.

Com base nisso, a presença dos agrotóxicos em corpos d'água é uma realidade (Brovini *et al.*, 2023), mas existem valores de referência que apontam limites máximos para o consumo humano. No Brasil ainda não existem valores máximos para a presença do diquat na água potável (Ministério da Saúde, 2021), portanto, tomamos por base os valores dos EUA, onde é

¹ Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim, contato: tatinanarovaniii@outlook.com

² Pós-doutoranda em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim

³ Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim

⁴ Doutoranda em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim.

⁵ Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim

⁶ Professor na Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim

⁷ Professora na Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim, **Orientadora.**

permitido 20 µg/L de diquat para a água do consumo humano (EPA, 2023).

2 Objetivos

Avaliar se a contaminação da água com o agrotóxico diquat altera a sobrevivência e o desenvolvimento inicial do peixe-zebra.

3 Metodologia

3.1 Obtenção dos embriões

Para a reprodução, peixes-zebra saudáveis (com idade entre 3 e 18 meses), mantidos no Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul, foram utilizados como reprodutores. Na tarde anterior a obtenção dos ovos, os casais reprodutores foram separados e colocados em bacias específicas para reprodução, com fundo de tela para evitar a predação de ovos. Na manhã seguinte, 1 hora após o acendimento das luzes, os embriões foram coletados por sifonagem e lavados com meio E3 (água de osmose reversa + 60 mg/L Ocean Tech Bio Active®, Hong Kong, China) para remoção de detritos e fezes. Os embriões foram lavados, selecionados e mantidos em placas de cultura de células de 24 poços (3 mL/poço), com 10 embriões por poço, e incubados em banho-maria a 28°C até 7 dias pós-fertilização (dpf).

3.2 Agrotóxico e concentração testada

A concentração de diquat selecionada para este estudo é permitida para consumo humano nos EUA (20 µg/L; EPA, 2023). Para a exposição nós utilizamos um produto comercial que contém 200 g/L de diquat e 970 g/L de outros ingredientes em sua formulação. Os embriões foram expostos durante o período de organogênese (3-120h; Pompermaier *et al.*, 2022).

3.3 Avaliação da sobrevivência e desenvolvimento inicial

Para avaliar a sobrevivência, 180 embriões e larvas foram examinados todas as manhãs até o 7º dia de vida. Embriões sem transparência, apresentando coagulação, ausência de formação celular ou ausência de batimento cardíaco e circulação sanguínea foram considerados mortos e removidos.

3.3.1 Movimento espontâneo e Frequência cardíaca

Aos 24 hpf, os embriões apresentam movimentos espontâneos (MS) ainda dentro do córion, os quais foram registrados por 60 s em 20 embriões por grupo usando um estereomicroscópio (Olympus SZ51). Em 72 hpf, nós realizamos a contagem da frequência

cardíaca de 20 larvas por 60 s usando um microscópio biológico binocular (Olympus CX21FS1).

3.4 Análise dos dados

Os dados de sobrevivência foram analisados pelo método de Kaplan-Meier. A movimentação espontânea e a frequência cardíaca foram comparadas utilizando o teste t de Student para amostras independentes, seguido pelo teste de Mann-Whitney (para dados não paramétricos). Todas as comparações foram realizadas em relação ao grupo controle. O nível de significância (α) adotado foi de 0,05.

3.5 Declarações éticas

Este estudo está em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, RS, Brasil (Protocolo 7408041024).

4 Resultados e Discussão

A exposição ao diquat prejudicou a sobrevivência dos animais ($\chi^2 = 8,871$; $p = 0,0029$; Figura 1A), aumentou os movimentos espontâneos ($U = 115,5$; $p = 0,0206$; Figura 1B), mas não afetou a frequência cardíaca ($U = 129,5$; $p = 0,0545$; Figura 1C).

De fato, aqui nós mostramos que uma concentração permitida para o consumo humano (20 $\mu\text{g/L}$) prejudicou a sobrevivência dos animais e os movimentos espontâneos. Alterações nas taxas de sobrevivência indicam que a presença do diquat na água pode reduzir as populações de peixes em ambientes contaminados e em casos graves levar a prejuízos nas cadeias tróficas, impactando o equilíbrio entre as espécies.

A exposição ao diquat também aumentou os movimentos espontâneos, que são induzidos pelo desenvolvimento dos neurônios motores primários e ocorrem sem controle do sistema nervoso central em estágios iniciais do desenvolvimento (Kimmel *et al.*, 1995). Como essa análise é realizada as 24 horas pós-fertilização os animais ainda estão dentro do córion, demonstrando que o diquat penetrou essa barreira protetora semipermeável. A capacidade dos compostos de atravessar o córion e interromper os processos neuromotores durante os estágios iniciais do desenvolvimento reforça o potencial disruptivo dos xenobióticos.

Nesse estudo não foram observadas alterações na frequência cardíaca das larvas, no entanto, não descartamos eventuais efeitos sobre esse parâmetro em outras concentrações e tempos de exposição. Por fim, ressaltamos que a concentração de 20 $\mu\text{g/L}$ é considerada 'segura'

para consumo humano (EPA, 2023), ou seja, pode estar presente nos corpos d'água e como vimos aqui, pode impactar diretamente na vida e no desenvolvimento dos organismos não-alvo. Nosso estudo deixa um alerta sobre os valores utilizados como referência e da importância da investigação sobre diferentes nichos ecológicos para determinar a segurança sobre as espécies.

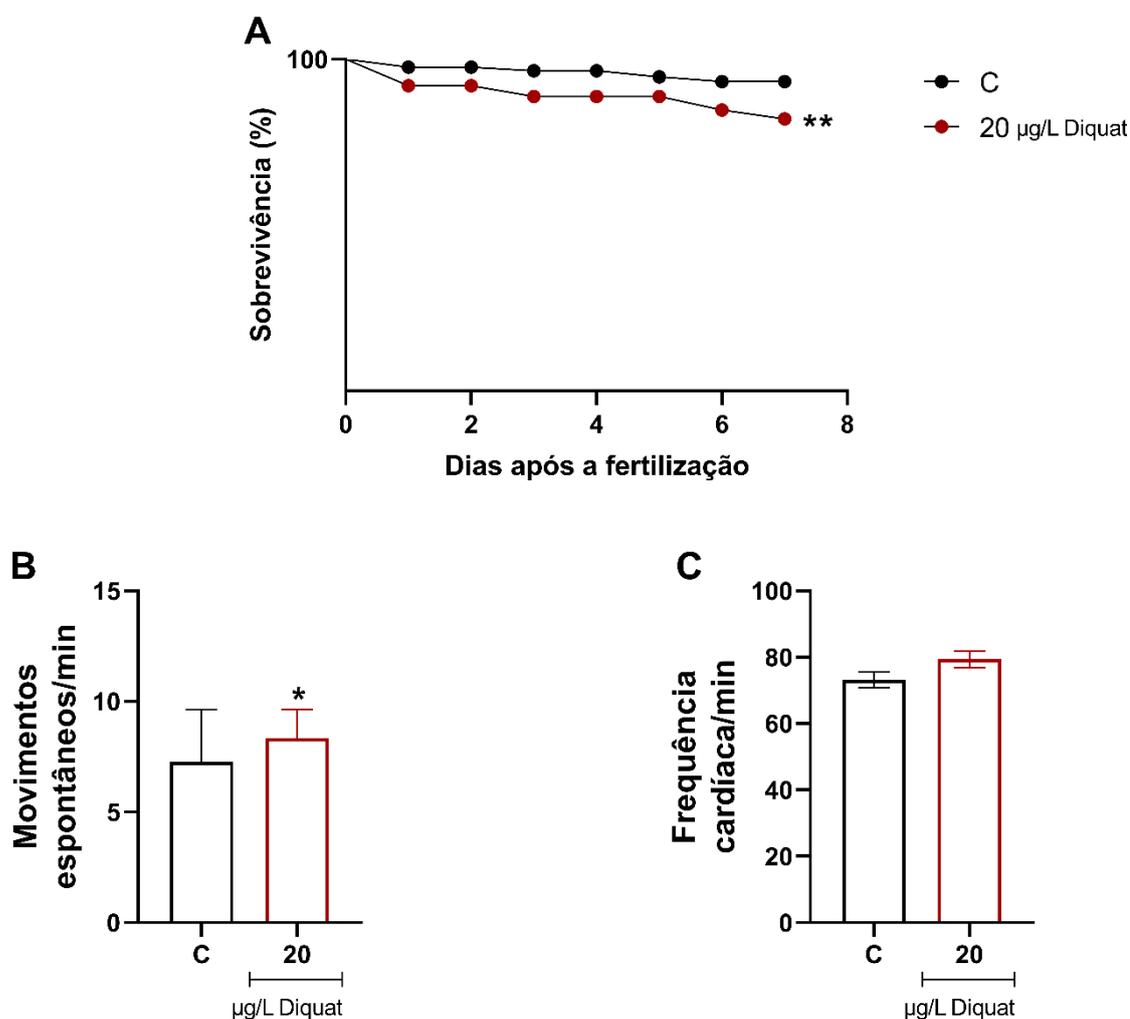


Figura 1. (A) Curva de sobrevivência, (B) movimentos espontâneos (ME) e (C) frequência cardíaca (FC) de embriões e larvas de peixe-zebra expostos ao herbicida diquat. A sobrevivência foi avaliada pela análise de Kaplan-Meier. Os ME e FC foram comparados utilizando teste t de *Student* para amostras independentes, seguido pelo teste *post hoc* de *Mann-Whitney* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5 Conclusão

Aqui nós mostramos que mesmo em níveis regulamentados, a exposição ao diquat compromete a sobrevivência e a movimentação espontânea, mas não afeta a frequência cardíaca dos embriões e larvas de peixe-zebra. Esses achados reforçam a importância de investigações acerca da toxicidade para organismos não-alvo mesmo em concentrações consideradas seguras e permitidas por lei.

Referências Bibliográficas

BROVINI, E. M. et al. Occurrence and environmental risk assessment of 22 pesticides in Brazilian freshwaters. **Aquatic Toxicology**, v. 260, p. 106566, 2023.

EPA. National Primary Drinking Water Regulations | US EPA. 2023. **National Primary Drinking Water Regulations**.

FORTUNA, M. et al. Transgenerational effects of the levonorgestrel-based birth control pill in zebrafish offspring. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 110, p. 104540.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, vol. 496, p. 2–8, 2013.

IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. 2024. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 10, n. 203, p. 253–310, 1995.

KUEHNE, L.; HEIMER, D. Efficacy and rates of diquat for reducing invasive knotweeds and potential for sequential use with imazapyr. **Weed Biology and Management**, v. 23, n. 2, p. 71–80, 2023.

Ministério da Saúde. **PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021**. 2021.

POMPERMAIER, A. et al. Impaired initial development and behavior in zebrafish exposed to environmentally relevant concentrations of widely used pesticides. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 257, 2022.

TAMAGNO, W.A. et al. Household based-pyrethroids on adult zebrafish (*Danio rerio*) exert behavioral and cholinergic changes in different brain regions. **NeuroToxicology**, v. 96, 2023.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Herbicidas. Organismos não-alvo. Sobrevivência. Peixes.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2024-0329

Financiamento

